

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06018

研究課題名（和文）熱ストレスに応答した選択的スプライシング機構の研究

研究課題名（英文）Study of the splicing regulation in response to heat stress.

研究代表者

井上 邦夫（INOUE, KUNIO）

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：40252415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：選択的スプライシングは、熱ストレス応答に重要な役割を担うと考えられるが、その制御機構や生理的役割については多くの未解明な問題が存在する。ヒトtnrc6a遺伝子における熱ストレス応答性スプライシング制御をモデル系とし、制御因子として同定したSRSFタンパク質について、リン酸化-脱リン酸化制御を介した選択的スプライシング誘導に重要な役割を担うアミノ酸配列を同定するとともに、新規の熱ストレス応答性の選択的スプライシングや、制御因子の同定を行った。また、ゼブラフィッシュにおいて、熱ストレス応答性の選択的スプライシングを可視化するレポーター系を構築し、その改良を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は各種ストレスを含む細胞環境に応答して遺伝子発現制御を行っている。本研究では温度に依存した選択的スプライシングの誘導機構に関する新たな知見や個体レベルでの理解に結びつく成果をあげつつあり、今後、さまざまな細胞ストレス応答や細胞死における選択的スプライシングを介した遺伝子発現制御機構や、がん化・疾患における異常スプライシング機構の理解にも結びつくものと期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that alternative splicing of various genes is regulated in response to heat stress in mammalian cells. Our previous study identified RNA-binding proteins required for the splicing regulation of human hsp105 and tnrc6a genes upon heat stress. However, it has been remained to fully solve the mechanism how the heat stress-responsive alternative splicing is regulated by the RNA-binding proteins such as hnRNPK and SRSF proteins. In the present study, we have identified the amino acid motif of the SRSF proteins, necessary for inducing the heat stress-responsive splicing in mammalian cells. In addition, we are constructing a reporter system to visualize the heat stress-responsive alternative splicing with high sensitivity in zebrafish.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：遺伝子発現 熱ストレス 選択的スプライシング

1. 研究開始当初の背景

細胞は各種ストレスを含む細胞環境に応答して遺伝子発現制御を行う。真核生物の遺伝子の多くは、介在配列イントロンで分断されており、機能的な mRNA が生成するには、核内において、イントロンを除去するスプライシング反応が必須である。選択的スプライシングの制御は、プロテオームの変化を介し、細胞環境に応じた細胞の振る舞いや恒常性の維持に働く遺伝子発現制御機構として重要と考えられるが、その分子基盤や個体レベルでの役割については多くの未解明な問題が存在する。

熱ストレスに対する応答機構は、細胞応答のモデルとして多くの研究が行われてきた。熱ストレスによってシャペロンをコードする hsp 遺伝子群の発現が誘導されるが、多くの遺伝子の発現は抑制される。スプライシングについても抑制が起こると考えられ、Manley らは、熱ストレスを受けた細胞や細胞周期 M 期では、スプライシング調節因子 SRSF10 がスプライシング必須因子 U1 snRNP と結合し、その機能を阻害することでスプライシングがグローバルに抑制されるモデルを提示した (引用文献 1)。しかしながら、熱ストレス条件下においてもスプライシングされる遺伝子が存在している。さらに、熱ショックタンパク質をコードする hsp105 遺伝子は熱ストレスに応じて選択的スプライシングを受け、通常発現する HSP105 タンパク質は細胞質局在するが、熱ストレスによる選択的スプライシング産物の HSP105 タンパク質は核局在して HSP70 の発現促進に働くことが報告されており (引用文献 2)、少なくとも細胞レベルでは選択的スプライシングが熱応答機構として生理的に重要なことが示唆される。

研究代表者らは、ヒト hsp105 遺伝子の熱応答性の選択的スプライシングに必要な制御因子が RNA 結合タンパク質 hnRNP K と SFPQ (PSF) であることを示すとともに、ヒト培養細胞で 42°C の熱ストレスによって約 4 千の遺伝子が選択的スプライシング誘導を受けること、このうち 700 弱の遺伝子が hnRNP K 依存的に熱応答性の制御を受けることを明らかにした (図 1)

(引用文献 3)。また、miRNA サイレncing 因子をコードする ヒト tnrc6a 遺伝子の選択的スプライシング制御因子がスプライシング調節因子 SRSF ファミリーの SRSF2 と SRSF10 であることを見出した。しかし、これら制御因子はいずれも温度条件に関わらず豊富に存在する RNA 結合タンパク質であり、どのように熱ストレスに応答して選択的スプライシングを誘導しているのか不明であった。

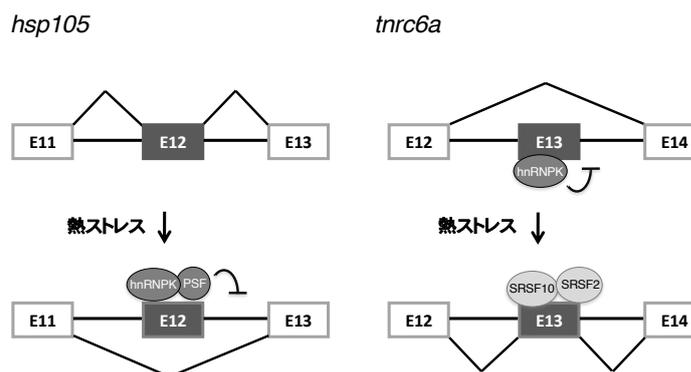


図1. 熱応答性の選択的スプライシング

2. 研究の目的

本研究では、熱ストレスに応答して選択的スプライシングが誘導される機構を解明することを第一の目的とした。熱ストレスによる hsp 遺伝子の転写誘導機構や HSP タンパク質のシャペロン機能について多くの知見が蓄積しているのに比べ、スプライシング制御機構に関する研究は少ない。ヒト hsp105 や tnrc6a を熱ストレス応答性スプライシング制御のモデル系として用い、熱ストレスに応答した RNA 結合タンパク質の翻訳後調節機構、特にリン酸化-脱リン酸化による制御が重要との作業仮説に基づいた解析を行うことにより、どのように温度によってスプライシング制御が行われているのか、分子基盤の理解を大きく進めることを目指した。

一方、熱ストレスを含め、細胞ストレスによる選択的スプライシングについては、これまで主に培養細胞レベルでの研究が中心であり、多細胞動物個体での生理的意義についての知見に乏しい。その原因として、選択的スプライシング制御因子の変異体解析では熱応答制御に特化した役割の解明が困難なことがあげられる。そこで本研究の第二の目的として、個体内での選択的スプライシングを可視化する実験系の構築や、選択的スプライシングにより生成するタンパク質の機能が多細胞動物のストレス応答に果たす役割を解析する新たな実験系の構築などにより、熱ストレスによる選択的スプライシングの生理的意義を個体レベルで理解することを目指すととした。

3. 研究の方法

ヒト hsp105 遺伝子や tnrc6a 遺伝子の選択的スプライシングが行われるエキソン・イントロンを含むゲノム DNA を CMV プロモーターに連結したレポータープラスミドや、選択的スプライシング制御に働く RNA 結合タンパク質やリン酸化酵素 CLK、脱リン酸化酵素 PP1c などの発現ベクターをヒト HeLa 細胞や HEK293 細胞などの培養細胞にトランスフェクションにより導入し、通常温度 (37°C)、熱ストレス条件 (42°C)、および、熱ストレスから通常温度に戻した回復条件下で培養後、それぞれ全 RNA を抽出して、RT-PCR により、内在遺伝子やレポーター遺伝子に由来するスプライシング産物を解析した。また、ウェスタンによるタンパク質の検出や定量、免疫染色によるタンパク質の細胞内局在の解析、免疫沈降実験による相互作用タンパク質の解析などを行った。SRSF2 や SRSF10 タンパク質について、リン酸化候補部位や PP1c の予想相互作用部位への変異の効果についても同様の解析により検討した。また、培養細胞に siRNA を導入し、選択的スプライシング制御に働く RNA 結合タンパク質のノックダウン実験を行って、選択的スプライシングへの影響を検討した。熱ストレス応答による選択的スプライシングを蛍光タンパク質の発現によって可視化するレポーターコンストラクトを作製し、培養細胞へのトランスフェクション実験を行なって、蛍光の定量的観察、および RT-PCR によるスプライシング産物の検出を行った。さらに、小型淡水魚ゼブラフィッシュの受精卵へのレポーター DNA のインジェクション実験を行い、通常飼育温度、および、高温処理下での蛍光観察や RT-PCR によるスプライシング産物の検出を行った。また、ゼブラフィッシュにおいて、ゲノム編集により、RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の変異体系統の作製、表現型解析などを進めた。

4. 研究成果

ヒト培養細胞において、ヒト tnrc6a 遺伝子における熱ストレス応答性スプライシング制御をモデル系とし、アミノ酸配列にアラニン残基への置換変異やリン酸化状態を模した置換変異を導入した変異型 SRSF2, SRSF10 の効果の検討、及び、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素の強制発現やノックダウン実験などから、リン酸化-脱リン酸化制御を介して温度による選択的スプライシング誘導に重要な役割を担うアミノ酸配列を同定した。現在さらにこのリン酸化-脱リン酸化制御による選択的スプライシング誘導の詳細な分子機構について解析を進めている。

ヒト tnrc6a 遺伝子では熱ストレスに反応してカセット型エキソンのスプライシング制御が起こり、エキソン挿入が促進されるが、tnrc6a と高い相同性を有するヒト tnrc6c 遺伝子について解析したところ、対応するエキソンの配列は相同性が高いにも関わらず、熱ストレスによってカセット型の選択的スプライシング誘導が起こらないことがわかった。しかし、3' スプライス部位が上流側に 24 塩基シフトする選択的スプライシングが熱ストレスに反応して誘導されることを見出した。RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の siRNA ノックダウン実験を行なった結果、SRSF2 や SRSF10 の発現を阻害すると、通常温度下においても、上流側スプライス部位の使用が起こることが観察されたことから、tnrc6a の場合と異なり、tnrc6c では、これらのタンパク質が通常温度下でのスプライス部位選択に関与し、熱ストレスによってその機能が低下することが示唆された。

また、ヒト SRSF2 遺伝子の熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御機構について解析を行い、siRNA を用いたノックダウン実験から、SRSF3, SRSF7, SRSF10 が熱ストレスによって誘導されるエキソンスキップ誘導に必要なことを見出した。

一方、ヒト hsp47 遺伝子およびヒト hsp105 遺伝子における熱ストレス応答性スプライシングを蛍光タンパク質の発現によって可視化するレポーターコンストラクトを作製した。各遺伝子について熱応答性のシス配列に塩基置換を導入した変異型レポーターを作製して比較検討を行い、ヒト培養細胞において熱ストレス応答制御を蛍光量によって評価できることを確認した。そこで、より検出感度の高い hsp105 遺伝子のレポーター DNA をゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションによって導入したところ、通常温度下や変異型レポーターでも一定レベルの蛍光が観察されたことから、熱ストレス応答性の蛍光のみを感度よく検出できるよう、使用するイントロン領域の改変などを進めている。また、ゼブラフィッシュにおいて、いくつかの srsf 遺伝子、および、hsf1 遺伝子が熱ストレス応答性の選択的スプライシングを受けることが示唆されており、これらのゲノム配列を用いたレポーターコンストラクトの作製について検討中である。

藤田医科大やミュンヘン工科大グループとの国際共同研究により、きわめて短いイントロンにおける新規スプライシング機構の解明にも貢献した。すなわち、短いイントロンの一群が既知のスプライシング因子 U2AF 二量体に代わって、新しいスプライシング因子 SPF45 でスプライシングされていることなどが明らかとなった。この SPF45 タンパク質は、抗がん剤耐性に関わる因子として知られていた。今後、短いイントロンのスプライシングが熱ストレスなどの細胞ストレ

スによる制御を受けるか検討を進めたい。

引用文献

1. Shin, Feng, and Manley, Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature* 427, 553-558 (2004)
2. Yamagishi, Fujii, Saito, and Hatayama, Hsp105 β upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS J.* 276, 5870-5880 (2009)
3. Yamamoto, Furukawa, Fukumura, Kawamura, Yamada, Suzuki, Hirose, Sakamoto, and Inoue, Control of the heat stress-induced alternative splicing of a subset of genes by hnRNP K. *Genes Cells* 21, 1006-1014 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miwa Takashi, Ohtani Keigo, Inoue Kunio, Sakamoto Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 The germ cell specific TAP like protein NXF 2 forms a novel granular structure and is required for tra 2 3 UTR dependent mRNA export in Caenorhabditis elegans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 621 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani-Matsuhana Saori, Kawata Yuga, Inoue Kunio	4. 巻 495
2. 論文標題 The cardiac neural crest gene MafB ectopically directs CXCR4 expression in the trunk neural crest	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2022.12.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukumura Kazuhiro, Yoshimoto Rei, Sperotto Luc, Kang Hyun-Seo, Hirose Tetsuro, Inoue Kunio, Sattler Michael, Mayeda Akila	4. 巻 12
2. 論文標題 SPF45/RBM17-dependent, but not U2AF-dependent, splicing in a distinct subset of human short introns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24879-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷 啓悟, 巳波 孝至, 井上 邦夫, 坂本 博
2. 発表標題 The RNA transport-related factor NXF-2 forms a novel granular structure in C. elegans germ cells
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巴波 孝至, 井上 邦夫, 坂本 博
2. 発表標題 線虫C. elegansにおいてクロモドメイン蛋白質MRG-1の阻害はストレス応答系の活性化に伴う成長遅延を誘導する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福村和宏, 芳本 玲, 廣瀬 哲郎, 井上邦夫, 前田 明
2. 発表標題 新しい分子機構によってスプライシングされるヒトの短いイントロン群
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松花 沙織 (Matsuhana Saori) (70767251)	神戸大学・理学研究科・講師 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ユタ大学			
ドイツ	ミュンヘン工科大学			