

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06024

研究課題名(和文) 未知のスプライシング完了機構をmRNA再スプライシング抑制因子から解明する

研究課題名(英文) Understanding the mechanism underlying splicing termination with mRNA re-splicing repressor

研究代表者

前田 明 (Mayeda, Akila)

藤田医科大学・がん医療研究センター・客員教授

研究者番号：50212204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞で起こるmRNA再スプライシング現象をモデルにして、未知のmRNA前駆体のスプライシング完了機構を解明した。スプライシング後のmRNAに特異的に結合するエクソン接合部複合体(EJC)が、成熟mRNAの再スプライシングを抑制している事実を明らかにした。実際に、EJCの中核因子の発現を正常細胞で抑制すると、正常細胞で本来起こらないmRNA再スプライシングが誘導できる。

成熟mRNAは、EJCが多くのRNA結合蛋白質の結合を誘導し、密集構造をもつmRNA蛋白質複合体(mRNP)を形成するが、EJCが結合しないと密集構造をとれなくなり、スプライシング複合体の再形成を許してしまう、と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質の設計図であるmRNAを作るためのスプライシングが正確でないと、目的の蛋白質を作れず、しばしばがんや重い病気の原因となる。正常細胞において、一旦スプライシングが完了したmRNAを再びスプライシングさせない機構は、未知のmRNA品質管理システムの根幹となっている。

その鍵を握る因子、すなわちmRNA再スプライシング抑制因子としてエクソン接合部複合体(EJC)を同定した。EJC結合が正常なスプライシング完了のシグナルとなっていることが明らかになった。この研究成果により、転写物全体(トランスクリプトーム)の正常化を維持するために、EJCが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We previously discovered cancer-specific mRNA re-splicing that occurs on mature spliced mRNA and generates aberrant transcripts/proteins. The mRNA re-splicing in various cancer cells implies an important mechanism that prevents deleterious extra re-splicing in normal cells. We postulated a repressor of the mRNA re-splicing in normal cells.

We found that knockdown of EJC core proteins, EIF4A3, MAGOH and RBM8A (Y14), markedly induced mRNA re-splicing. We conclude that the EJC is a critical mRNA quality control factor to prevent extra re-splicing on mature mRNA.

The spliced mRNA forms a packed and compacted mRNP structure by binding among EJC core and SR proteins together with other RNA-binding proteins. We thus postulate that EJC core-triggered formation of the highly compacted mRNP protects mature mRNA from reassembly of spliceosome to initiate aberrant mRNA re-splicing, implicating the general termination mechanism of splicing.

研究分野： mRNA前駆体スプライシングの分子機構

キーワード： 遺伝子発現制御 mRNA品質管理 スプライシング完了機構 癌 TSG101 mRNA再スプライシング エクソン接合部複合体(EJC)

1. 研究開始当初の背景

私たちは、成熟 mRNA が再びスプライシングされ、異常な mRNA 産物が生成するという現象が、癌細胞特異的に起こっていることを証明した[1, 2]。この現象が、正常細胞で無秩序で起こったならば、深刻な害を及ぼすことは明白であるから、一旦完成された成熟 mRNA は再びスプライシングされないような仕組みがあると予想できる(図1)。癌細胞内で異常な mRNA 再スプライシング現象が広範に起こっている事実から、mRNA 再スプライシング現象は、正常なスプライシングを保持するメカニズム解明のためには打ってつけのモデル系となっている(図1)。

mRNA 再スプライシングを抑制する因子の探索に成功し、その一つは成熟 mRNA のエクソン接合部に特異的結合する複合体 EJC の中核因子 EIF4A3 であった(図1, 2A) [3-7]。この発見が、本研究課題に取り組む動機となった。

驚くべきことに、mRNA 再スプライシングが起こらない正常細胞で EIF4A3 発現を siRNA で抑制することで、癌特異的ではあるはずの mRNA 再スプライシングが再現した。さらに、他の EJC 中核因子である MAGOH や RBM8A (Y14) の発現を各々抑制しても、EIF4A3 とまったく同様の結果が得られた(図2B)。すなわち、mRNA 再スプライシング抑制因子の実体は、成熟 mRNA 上に形成される複合体である EJC 本体そのものであった。スプライシングが完了した成熟 mRNA が、通常はなぜ再びスプライシングされないのか、という長年の謎を解明する「原理的な第1のブレークスルー」となった。

2. 研究の目的

「細胞核はどうして mRNA 前駆体スプライシングの完了を知るのだろうか？」～この素朴な疑問に対する答えはまだない。本研究はそれに答えることをめざした。遺伝子発現に必須の mRNA 前駆体スプライシングは、スプライソソームと名づけられた巨大構造体が動的に変化しながら正確に遂行される。不要なイントロンが取り除かれた mRNA は核外輸送され、細胞質でリボソームによって蛋白質に翻訳される。イントロンの両端には特徴的なスプライス部位配列があり、そのシグナルはスプライシングの必要条件となる、しかし十分条件ではない。なぜならスプライシングで使われないスプライシング部位に似た配列は mRNA 前駆体上に数多く存在するからだ。スプライシングが完了した成熟 mRNA も例外ではなく、それらのスプライス部位様配列は通常は無視され、スプライシングが完了してスプライソソームは解離し、核外輸送される。スプライソソームを解離させるための蛋白質因子はいくつか知られているが、成熟 mRNA を認識し、スプライシングを完了させる機構の実体は不明である。私たちは、この問題に挑戦するための絶好のモデルとなる mRNA 前駆体基質と関与する候補因子を見いだした。本研究課題の目的は、未解決のスプライシング完了機構を明らかにすることである。その機構は、未知の mRNA 品質管理システムの根幹となり、トランスクリプトームの正常化を維持しているため重要である。

仮説「EJC はスプライシング完了のシグナルになっている」を提起し、それを証明する(図1)。真核生物の遺伝子から転写された mRNA 前駆体は、数多くのイントロンによって分断されている。数多くのイントロンに分断されたエクソンを正しく認識しエクソン同士を正確に結合させるスプライシングは、mRNA が蛋白質合成の鋳型であるが故に、遺伝子発現での必須過程である。スプライシングは厳密に制御されるからこそ高次な生命現象を具現化できるわけで、それがひとたび破綻すれば深刻な結果となる。異常なスプライシングやスプライシングの制御不

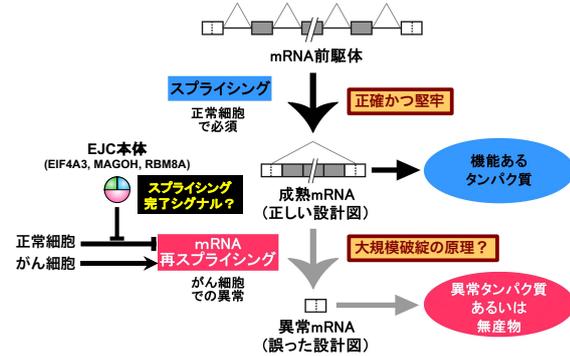


図1. 癌特異的な mRNA 再スプライシング現象と、正常細胞で働いていると想定できる mRNA 再スプライシング抑制機構。その実態は未知であるが、スプライシング過程での mRNA 品質管理として重要である。

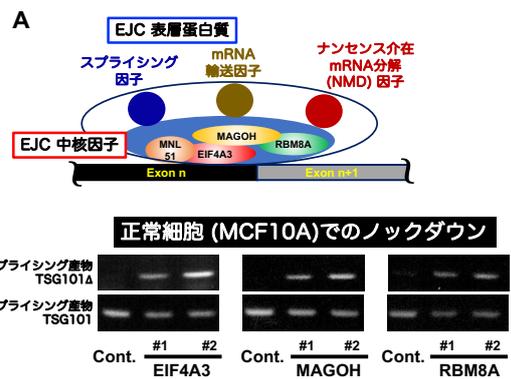


図2. (A) EJC の構造。EJC 中核因子がエクソン接合部上流に結合し、その EJC 本体に EJC 表層蛋白質群が結合している。(B) EJC 中核因子 (EIF4A3, MAGOH, RBM8A) を正常細胞 (MCF10A) でノックダウンすると、癌特異的な mRNA 再スプライシング産物 (TSG101Δ) が出現した。

全によって、細胞機能に重大な影響を及ぼし、さまざまな難病や癌をひき起こしている事実は枚挙にいとまがない[8]。

このように重要な mRNA、その品質を保つために、未成熟終止コドン依存性 mRNA 分解 (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD) に代表される、異常な mRNA を積極的に分解し排除する機構が知られており、かなり研究されている。ところが、スプライシングの精度を上げている一般的な仕組みは未だに不詳である。スプライシングが完了した成熟 mRNA が、通常はなぜ再びスプライシングされないのか? という基本的な疑問に対し、まだ十分な答えがない。スプライシングが完了すると、成熟 mRNA 上に EJC が形成されることが知られ、EJC 表層にはスプライシング因子 (RNPS1、PNN など)、mRNA 核外輸送因子 (ALYREF、NXF1 など)、そして NMD に関与する因子 (UPF1/2/3 など) が会合することが知られている (図 2A)。EJC は、実際にスプライシング後の核外輸送や NMD の機能に重要な役割を果たしているが、スプライシング完了のシグナルになっているかどうかは、実はまだ誰も証明していない。

3. 研究の方法

EJC がスプライシング完了のシグナルになっていることを照明するための準備として、(1) 効率のいい再スプライシングが観察できる mRNA 前駆体が必要であり、(2) その mRNA 前駆体は、内在転写物の RT-PCR 解析、またミニ遺伝子の構築が容易なように長過ぎてはいけない (1 kb 以下)。ところが癌特異的再スプライシングを証明した mRNA 前駆体 (*TSG101* と *FHIT* 遺伝子) は、数多くの長いイントロンを含み長大であり (46 kb 以上)、この仮説を実証する系として用いることはできない。ここで偶然に、別のプロジェクトで始めた研究成果により、「技術的な第 2 のブレークスルー」をもたらした。

そのプロジェクトは、エキシトロン (Exon; Exonic Intron) と新しく命名された、コーディング・エクソン内に埋没しているイントロンに関わるスプライシング研究である。ヒト転写物の大規模 RNA-Seq 解析によってコーディング・エクソンに予想以上 (~55%) のイン・フレームイントロンが存在し、それはエキシトロンと命名された [9]。エキシトロンは癌細胞においてスプライシングによって除外されることが多く、その結果、機能的ドメインや修飾部位に欠落がある蛋白質が作られる。

さて、エキシトロン両端のスプライス部位が弱いにも関わらず利用されているという不可解な事実があるが [9]、このエキシトロンを除く過程がもしスプライシングが完了した mRNA 上での再スプライシングであれば、その不可解を合理的に説明できる (図 3)。そこで siRNA を用いて EJC 中核因子の発現を抑制し、エキシトロンを含む *HNRNPM* mRNA 前駆体を解析したところ、予想通り、エキシトロンを除外するスプライシングが顕著に促進した (図 4)。私たちは、スプライシングが完了した成熟 mRNA 上の再スプライシングによって、エキシトロンが取り除かれると考えた。この *HNRNPM* mRNA 前駆体

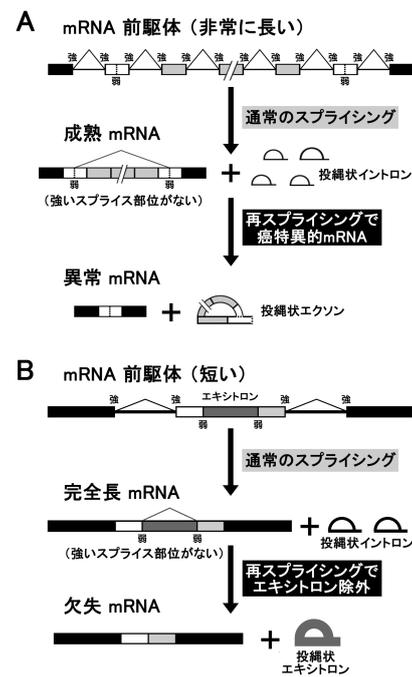


図3. (A) 癌特異的 mRNA 再スプライシング。最初のスプライシングによって競合する強いスプライス部位が除かれ、弱いスプライス部位のみが接近する。(B) 同様の mRNA 再スプライシングでエキシトロンが除外されると、やはり競合する強いスプライス部位が除かる。よって、弱いエキシトロンのスプライス部位が利用される謎が合理的に説明できる。

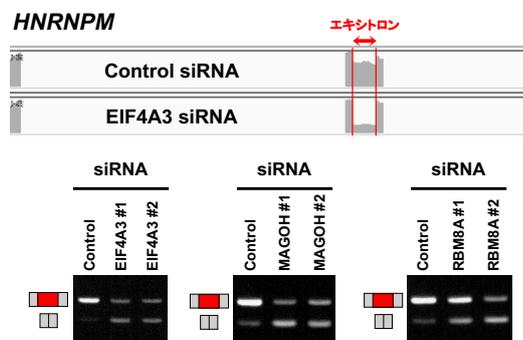


図4. siRNA を用いて EJC 中核因子 (EIF4A3, MAGOH, RBM8A) の発現を抑制すると、*HNRNPM* mRNA のエクソン内に含まれるエキシトロンを除外するスプライシングが促進した。RNA-Seq のリード数グラフ (上図) と RT-PCR 解析データ (下図) を示す。

は、まさに仮説を証明するための単純化モデルとなっている。

スプライシングが完了した mRNA は、EJC 結合だけでなく、SR 蛋白質を中心とする蛋白質群が結合し高次構造を形成、密に梱包された mRNP 構造を作っている (図5) [10]。このような高次構造によって、mRNA にスプライソソームが形成は抑えられ、再びスプライシングされることは困難であると予想できる。そうならば、EIF4A3 発現抑制による mRNA 再スプライシングの促進は、この逆のシナリオだ。すなわち、EJC 中核因子を欠くと、このような高次構造が形成できなくなり、スプライソソームの形成を許し、成熟 mRNA が再スプライシングされる。すなわち、EJC 欠落下で、スプライシング完了後の mRNP 構造の劇的なリモデリングが起こると考えられる。

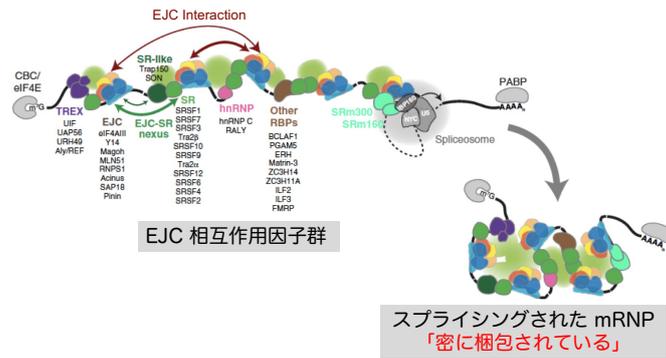


図5. スプライシング完了後の成熟 mRNA は、結合する EJC との相互作用をきっかけに、秩序だった EJC 相互作用因子群の形成が起こり、密に梱包された mRNP ができあがる。

4. 研究成果

(1) mRNA 再スプライシングを抑制する因子の発見

癌細胞で起こる mRNA 再スプライシング現象をモデルにして、今まで未知だった mRNA 前駆体のスプライシング完了機構の解明をめざした。スプライシング後の mRNA に結合する EJC が、成熟 mRNA の再スプライシングを抑制している事実を証明した。実際に、中核 3 因子 (EIF4A3, MAGOH, RBM8A) を正常細胞でノックダウンすると、正常細胞で本来起こらない mRNA 再スプライシングが誘導できる (図2B)。

その mRNA 再スプライシング抑制のメカニズムを、エキシトロンをモデルとして解析した。そのエキシトロンを除くスプライシング (以後エキシトロン・スプライシング) は、実際に EJC 中核 3 因子 (EIF4A3, MAGOH, RBM8A) の発現抑制で促進するので、mRNA 再スプライシングを再現できる系となった (図4) [11, 12]。

EJC は表層因子として NMD 因子や核外輸送因子が結合している (図2A)、EJC 中核因子の発現抑制によって、NMD や核外輸送が阻害されて、それがエキシトロン・スプライシングを間接的に促進する可能性がある。しかし、NMD 因子 (UPF1) や核外輸送因子 (DDX19B) をノックダウンしてもエキシトロン・スプライシングの促進には全く影響しなかったため、この可能性を排除できた。

(2) mRNA 前駆体スプライシングの終了機構の提起

上記のように、成熟 mRNA は密集した mRNA 蛋白質複合体 (mRNP) を形成することが知られている (図5) [10]。そこで、私たちは EJC が結合しないと成熟 mRNA は密集構造をとれなくなり、スプライソソームの再形成を許してしまい、それが mRNA 再スプライシングの原因である、と予想した。

この仮説を検証するために、HNRNPM ミニ・レポーター遺伝子を作成した。そのエキシトロンを含むエクソンの両端に通常のイントロンを挿入すると、エキシトロン・スプライシングが抑制された (図6A)。両端イントロンでのスプライシング完了に伴う EJC 結合が想定さ

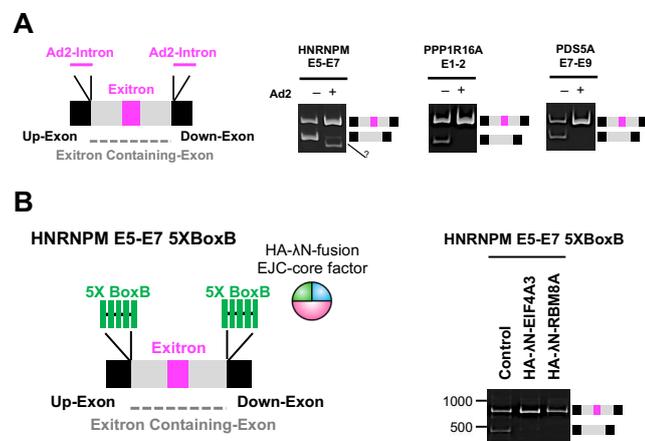


図6. (A) エキシトロンを含むエクソンの両端にイントロンを挿入すると、エキシトロン・スプライシングを抑制した。EJC はスプライシング後にエクソンに結合するので、この結果は EJC 結合が mRNA 再スプライシング抑制因子であることを示唆する。(B) エキシトロンを含むエクソンの両端に、EJC 中核因子の EIF4A3 や RBM8A を強制結合させるテザリング実験で、エキシトロン・スプライシングが抑制された。これにより、EJC が mRNA 再スプライシング抑制因子であると結論した。

れ、それがエキシトロン・スプライシングを抑制すると考えられる。そこでエキシトロン両端にテザリングで EJC 中核因子を強制結合させることにより、実際にエキシトロン・スプライシングの抑制を再現できた (図 6B)。以上の結果から、EJC が誘導する mRNP の密集構造が、スプライソソームの再形成を阻止し、エキシトロン・スプライシングの抑制が起こることがわかった。もちろん、この結論は単純化モデルであるエキシトロンを含む mRNA 基質で証明された結果ではあるが、エキシトロン・スプライシングは mRNA 上での再スプライシングによって起こっているのは確実なので、実際の癌細胞特異的 mRNA 再スプライシングにおいても、同様のメカニズムが働いていると想定できる。

mRNA 再スプライシング抑制因子として EJC の最初の報告は、2019 年に Annual Meeting of the RNA Society と日本分子生物学会年会で口頭発表した[3, 4]。さらにデータを加え 2021 年に Annual Meeting of the RNA Society と日本 RNA 学会年会でオンライン発表し[5, 6]、専門家から高い評価を得ることができた。一方、国際一流雑誌をめざした論文発表は、追加データの補足ならびにデータベースへのデータ登録などに時間がかかり、予想以上に難航したが、2021 年に *Int. J. Mol. Sci.*誌に出版することができた[7]。EJC 結合が mRNA の品質管理機構に重要な役割を果たしていること、さらにそれが正常なスプライシング完了のシグナルとなっていることを示す、重要な成果となった。mRNA 再スプライシング現象の単純化モデルとしてのエキシトロンを用いた mRNA 再スプライシング研究の成果は 2023 年に Eukaryotic mRNA Processing Meeting で口頭発表し、また同年の日本分子生物学会年会で開催されたシンポジウムで口頭発表した[11, 12]。現在、それらの成果をまとめた論文を準備中である。

<引用文献>

1. T. Kameyama, H. Suzuki, A. Mayeda (2012): Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites: *Nucleic Acids Res.* **40**, 7896–7906.
2. 亀山 俊樹, 前田 明 (2015): がん細胞で異常なタンパク質が作られる仕組みを「mRNA 再スプライシング」現象から探る. *ファルマシア* **51**, 22–26.
3. Y. Ohtani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna, A. Mayeda (2019): EJC core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: EJC as a signal to terminate splicing. Eukaryotic mRNA Processing Meeting, Cold Spring Harbor, New York, USA.
4. Y. Ohtani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna, A. Mayeda (2019): EJC represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: EJC as a guardian to maintain the integrity of mRNA. 第 42 回 日本分子生物学会年会, 福岡.
5. Y. Ohtani, T. Kameyama, A. Mayeda (2021). The exon junction complex core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: A potential key role in terminating splicing. The 26th Annual Meeting of the RNA Society (online meeting).
6. Y. Otani, T. Kameyama, A. Mayeda (2021): The exon junction complex (EJC) core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: Playing a key role in terminating splicing. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society of Japan (online meeting).
7. Y. Otani, K.-i. Fujita, T. Kameyama & A. Mayeda (2021): The exon junction complex core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: A potential key role in terminating splicing. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6519.
8. 片岡 直行, 前田 明. mRNA 前駆体スプライシング (2016) : 分子機構とその破綻による疾患まで. *実験医学* **34**, 3108–3115.
9. Y. Marquez, M. Hopfler, Z. Ayatollahi, A. Barta, N. Kalyna (2015): Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity. *Genome Res.* **25**, 995–1007.
10. G. Singh, A. Kucukural, C. Cenik, J.D. Leszyk, S.A. Shaffer, Z. Weng, M.J. Moore (2012): The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus, *Cell* **151**, 750–764.
11. K.-i. Fujita, Y. Otani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna & A. Mayeda (2023): EJC core-triggered compacted mRNP structure represses cancer-specific splicing in exitron. Eukaryotic mRNA Processing Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.
12. 藤田賢一, 大谷勇太, 亀山俊樹, P. Venhuizen, M. Kalyna, 前田明 (2023): エクソン接合部複合体 (EJC) から形成される mRNP 密集構造はエキシトロン(エクソン内イントロン)で起こる異常スプライシングを抑制している. 第 46 回 日本分子生物学会年会. 神戸ポートアイランド, 神戸市, 兵庫.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Otani, K.-i. Fujita, T. Kameyama, A. Mayeda	4. 巻 22
2. 論文標題 The exon junction complex core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: A potential key role in terminating splicing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22126519	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 -

1. 著者名 H.H. Chua, T. Kameyama, A. Mayeda, T.H. Yeh	4. 巻 23
2. 論文標題 Epstein-Barr virus enhances cancer-specific aberrant splicing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052516	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

1. 著者名 福村 和宏, 前田 明	4. 巻 94
2. 論文標題 「イントロンの長さ」の不思議に端を発する新しいスプライシング機構の発見.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 806-813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU/2022.940806	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Y. Ohtani, T. Kameyama, A. Mayeda
2. 発表標題 The exon junction complex core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: A potential key role in terminating splicing.
3. 学会等名 The 26th Annual Meeting of the RNA Society (online meeting). (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ohtani, T. Kameyama, A. Mayeda
2. 発表標題 The exon junction complex (EJC) core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: Playing a key role in terminating splicing.
3. 学会等名 The 22nd Annual Meeting of the RNA Society of Japan (online meeting)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Mayeda
2. 発表標題 45 years of splicing, 40 years of my studies, leading to the recent discovery of new splicing.
3. 学会等名 Tokyo RNA Club: The 31st Meeting (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K.-I. Fujita, Y. Otani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna, A. Mayeda
2. 発表標題 EJC core-triggered compacted mRNP structure represses cancer-specific splicing in exon.
3. 学会等名 Eukaryotic mRNA Processing Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田 賢一, 大谷勇太, 亀山俊樹, P. Venhuizen, M. Kalyna, 前田 明
2. 発表標題 エクソン接合部複合体(EJC)から形成されるmRNP密集構造はエキソントロン(エクソン内イントロン)で起こる異常スプライシングを抑制している。
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田 明
2. 発表標題 遺伝子の無意味なイントロンの意味を調べて42年余-たかがスプライシングされどスプライシング.
3. 学会等名 The 3rd Kansai RNA Club (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室のホームページ
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~mayeda/>

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

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		
その他の国・地域(台湾)	National Taiwan University Hospital		
オーストリア	Univ. of Natural Resources & Life Sci.		