

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06049

研究課題名（和文）RNAスプライシングによる病気発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Effects of disease-associated mutations in splicing proteins on RNA splicing

研究代表者

尾林 栄治（Obayashi, Eiji）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授

研究者番号：50321740

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）：本研究では、MDSやがん患者に見られるスプライシングタンパク質のアミノ酸変異が、なぜスプライシング異常を引き起こし、病気の原因になりうるのかを結晶構造解析を中心とした手法で明らかにすることを目的とした。研究対象となったU2AF1およびZRSR2タンパク質に関して、実際に構造解析まで至らなかったが、新たにU2AF1のメチル化修飾のスプライシングへの影響や、ZRSR2のアミノ酸変異がスプライシングタンパク質SF3B1との相互作用に影響を与えることが明らかになった。これらの結果が、MDSや腫瘍発生にかかわる異常スプライシングを引き起こすことが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、造血系悪性疾患の一つである骨髄異形成症候群（MDS）の患者や、肺がんなどの固形腫瘍を持つ患者のゲノム解析がなされ、その患者の多くがスプライシングタンパク質に特異的なアミノ酸変異を持つことが報告された。実際にこれらのいくつかのアミノ酸変異は、細胞におけるスプライシングパターンに大きな違いを引き起こすことが報告されているが、それぞれの変異タンパク質がどのように働く、もしくは働かないことで違い（異常）を産むのかは明らかではない。そのため、これらアミノ酸変異のスプライシングへの影響を知ることは、病気の早期診断・新規薬剤開発につながり、学術的のみならず社会的な意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to clarify why amino acid mutations in splicing proteins seen in MDS and cancer patients cause splicing abnormalities and can be the cause of disease, using methods centered on X-ray crystallography. Although we were unable to actually analyze the structures of the U2AF1 and ZRSR2 proteins focused in this study, we were able to clarify the effect of methyl-modification of U2AF1 on splicing and that amino acid mutations in ZRSR2 affect the interaction with the splicing protein SF3B1. It strongly suggest that these results induce the abnormal splicing related to MDS and tumor development.

研究分野：構造生物学

キーワード：RNAスプライシング 立体構造解析

1. 研究開始当初の背景

私たち人間を形作るために必要な遺伝情報は、DNAとして細胞内に保存され、必要な時に必要な部分だけがRNAとして写しとられる。しかし、私たち人間を含む高等生物の遺伝子には、エキソン配列を分断するように、所々にイントロンが存在する。イントロンはスプライシングと呼ばれる反応によりRNAに転写後取り除かれる。しかし、イントロンの除去は存在する場所や刺激により制御され、エキソンの組み合わせを変えることができる。これは選択的スプライシングと呼ばれ、高等真核生物において多種多様なタンパク質を産み出す原動力となっている。最近の研究から、ヒトの90%以上の遺伝子が何らかの選択的スプライシングを受けることが明らかになっている。そのため、その機構の解明はヒトを含む高等生物の基本的な生命現象を理解する上で非常に重要であるだけでなく、スプライシング異常による疾患に対する治療薬開発の足がかりになると期待される。

近年、造血系悪性疾患の一つであり悪性腫瘍を引き起こす骨髄異形成症候群(MDS)の患者のゲノム解析がなされ、その患者の多くがスプライシングタンパク質、中でもイントロンを認識するタンパク質に特異的なアミノ酸変異を持つことが報告された。さらに、肺がんなどの固形腫瘍を持つ患者も同様のアミノ酸変異を持つことが数多く報告されてきた。実際にこれらのいくつかのアミノ酸変異は、細胞におけるスプライシングパターンに大きな違いを引き起こすことが報告されているが、それぞれの変異タンパク質がどのように働く、もしくは働かないことで違い(異常)を産むのかは明らかではない。そのため、これらアミノ酸変異のスプライシングへの影響を知ることは、病気の早期診断・新規薬剤開発につながり、世界的に注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、MDSやがん患者に見られるスプライシングタンパク質のアミノ酸変異が、なぜスプライシング異常を引き起こし、病気の原因になりうるのかを結晶構造解析を中心とした手法で明らかにしていく。

1、U2AF1のQ157R/P変異：U2AF1はエキソンとイントロンの境界である3'スプライス部位を認識する働きを持つ。MDS患者に多く見られるアミノ酸変異はS34F/YとQ157R/Pであることが知られている。私はすでにU2AF1のS34Y変異体および変異のない野生型とRNAとの複合体の結晶構造解析を行い、なぜS34におけるアミノ酸変異が異常なスプライシングを引き起こすのか、その構造的要因を明らかにした。そこで本研究では、もう一つのアミノ酸変異であるQ157R/Pがどのようにスプライシングに影響を与えているのかを調べていく。

2、ZRSR2のN261Y変異：ZRSR2は、存在比率が1-2%と少ないマイナーイントロンと呼ばれる通常のスプライシングとは異なるスプライシングに関わるタンパク質として発見された。しかし最近、ZRSR2が通常のスプライシングにおいても働いていることが報告され、その働きが注目されている。マイナーイントロンのスプライシングにおいてZRSR2は、U2AF1と同じ3'スプライス部位を認識する働きをすると考えられてきた。私はこれまでに、その働きを知るために、ZRSR2を精製し、マイナーイントロンRNAとの結合能を調べた。するとZRSR2はマイナーイントロンの3'スプライス部位には結合しなかった(論文未発表)。そこで本研究では、ZRSR2の機能解析を、精製したタンパク質を用いたタンパク質相互作用解析およびRNA相互作用解析を行うことで進めていく。

3、変異特異的モノクローナル抗体の作製：本研究ではU2AF1およびZRSR2のアミノ酸変異特異的モノクローナル抗体を作製する。これらのアミノ酸変異体がどのように病気を引き起こすのか、その機序は不明であるが、その変異を持つことが発症のリスクを高めていることは確かであろう。そのためアミノ酸変異の早期発見は、その発症を防ぐ、遅らせる、また発症後の治療への対策に非常に有用である。しかし、スプライシングタンパク質の遺伝子配列を患者一人一人に対して網羅的に解析することには手間と費用がかかりすぎる。そこでモノクローナル抗体を使って変異体の存在有無を特異的に検出できれば、簡便に多くの人を網羅的に診断することが可能になる。

3. 研究の方法

本研究において行われる手法は、主にタンパク質-RNA 相互作用解析と X 線結晶構造解析である。どちらの手法においても、安定なタンパク質が多く必要とされる。本研究のターゲットである、U2AF1 および ZRSR2 タンパク質は、基本的な生命反応の一つであるスプライシングに必須であり、また、選択的スプライシングにも強く関わっていることから、古くから注目され研究が進められてきた。しかし、それらはその物性の悪さから、実際の働きが詳しく理解されていなかった。そのためには組換え DNA を用いた組換えタンパク質の発現系を構築することが不可欠である。私はこれまでに、単体では不安定な二種類以上のタンパク質を複合体として共発現することで、タンパク質複合体を安定かつ大量にとる系を作製し、成果を上げてきた。本研究のターゲットである U2AF1 も、U2AF1 と相互作用する U2AF2 との複合体として共発現することで安定に精製することに成功し、構造解析を行った。さらに私はすでに、ZRSR2 と SF3B1 が相互作用することを明らかにし（論文未発表）、SF3B1 の ZRSR2 結合部位を ZRSR2 と共発現することで、ZRSR2 を安定に精製することに成功しており、その構造解析が期待される。

4. 研究成果

1、U2AF1 : U2AF1 の Q157R/P 変異体に関しては、その結晶化に成功したものの、高分解能のデータを得ることができず、残念なことに期間内における構造解析に至らなかった。しかし、この試料を用いて RNA との相互作用解析をしたところ、イントロンとエキソンの境界部におけるエキソン側の塩基配列に、Q157R/P 変異体が好む特徴的な配列が明らかになった。S34F/Y がイントロン側に好む配列があるのとは対照的であった。実際に、U2AF1 野生型の構造を見てみると、Q157 はエキソン側の配列に近いところに位置している。今後 Q157R/P 変異体の構造が明らかになれば、なぜその配列を好むのか詳細な機構が明らかになるであろう。また近年、U2AF1 はメチル化修飾を受け、そのメチル化修飾が S34F/Y 変異と似た影響をスプライシングに与えていることが報告された。そのため本研究において、メチル化修飾 U2AF1 を発現・調製する系の構築に成功したが、期間内における構造解析および相互作用解析まで至らなかった。

2、ZRSR2のN261Y変異 : ZRSR2に関して、当初発現・調製に成功していた既存のドメイン（ZRSR2の亜鉛結合ドメインとRNA結合ドメイン）のみを用いて結晶化を試みていたが、その作成は成功しなかった。そこで機能未知部分も含めた発現系の構築を試みた結果、既存のドメインだけのものよりも安定な良質の試料を得ることに成功した。この発現系を用いてN261Yを含む病気関連変異体を調製し、ZRSR2の相互作用相手であるSF3B1及びRNAとの結合を調べた。その結果、以下のことが明らかになった。

- 1、SF3B1のN末端部位（330-350）がZRSR2と結合している。
- 2、ZRSR2の亜鉛結合ドメインとRNA結合ドメインがSF3B1との結合に重要である。
- 3、ZRSR2の亜鉛結合ドメインとRNA結合ドメインにおけるアミノ酸変異は、ZRSR2の安定性を著しく低下させることでSF3B1との結合を妨げている。
- 4、機能未知部位が存在してもしなくてもZRSR2のRNA結合能に変化はなく、機能未知部位のアミノ酸変異によるスプライシングへの影響は不明。

また、この試料を用いて結晶化も試みてきたが、期間中に構造解析可能な結晶を得ることはできなかった。

3、変異特異的モノクローナル抗体の作製 : モノクローナル抗体の作製には、私が構築した大腸菌による大量発現系を利用した組換えタンパク質を抗原として用いた。これまでに U2AF1 を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成には成功したが、MDS 患者に見られるアミノ酸変異部位とは異なる部位を認識するものであり、アミノ酸変異を区別できる特異的なモノクローナル抗体の作製には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchida Yuki, Nariai Yuko, Obayashi Eiji, Tajima Yoshitsugu, Koga Tomohiro, Kawakami Atsushi, Urano Takeshi, Kamino Hiroki	4. 巻 727
2. 論文標題 Generation of antagonistic monoclonal antibodies against the neoepitope of active mouse interleukin (IL)-18 cleaved by inflammatory caspases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109322 ~ 109322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2022.109322	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 -

〔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 吉田 尚史; 朴 三用; 坂下 暁介; 成相 裕子; 桑迫 香奈子; 武藤 裕; 浦野 健; 尾林 栄治
2. 発表標題 スプライシングタンパク質U2AF1によるイントロン認識機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田 尚史; 朴 三用; 坂下 暁介; 成相 裕子; 桑迫 香奈子; 武藤 裕; 浦野 健; 尾林 栄治
2. 発表標題 The Structural basis of 3' splice site recognition by splicing factor U2AF1
3. 学会等名 第23回RNA学会年会/2022-07-20
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川本江那, 佐藤理央, 吉永匡希, 朴三用, 尾林栄治, 吉田尚史
2. 発表標題 スプライシング異常を伴う骨髄異形成症候群におけるSRSF2変異体の結晶構造解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	浦野 健 (Urano Takeshi) (70293701)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

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
---------	---------