

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790068

研究課題名(和文)網膜色素変性症を引き起こすスプライソソーム形成の異常とその調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the assembly and functional defect of the spliceosome associated with Retinitis pigmentosa

研究代表者

米田 宏 (Maita, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：60431318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：スプライシングを担うスプライソソームは5種のsnRNP(U1,U2,U4,U5,U6)からなる巨大タンパク質-RNA複合体であり、その構造は反応に伴いダイナミックに変化する。スプライソソーム量は細胞内で適切に保たれる必要があり、その破綻は網膜色素変性症などの疾患を引き起こす。我々はスプリットルシフェラーゼ法を応用し、ルシフェラーゼ断片の融合遺伝子ライブラリーからPRPF6とU5-40Kの2つのU5 snRNP因子がU5 snRNP量レポーターとして働くことを見出した。このレポーターでU5 snRNPに作用する化合物の検出が可能であることから、今後snRNP調節化合物の同定につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：The spliceosome is a highly dynamic macromolecular ribonucleoprotein (RNP) machine that catalyzes pre-mRNA splicing by assembling U1, U2, U4, U5, and U6 small nuclear (sn)RNPs. To process large numbers of introns, synthesis and recycling of snRNPs must be maintained within an appropriate range to avoid their shortage, which would cause a severe disease such as Retinitis pigmentosa. However, the mechanism that maintains cellular snRNP levels is unknown. We constructed an expression library of a luciferase fragment fused to core components of snRNPs and used it to isolate PRPF6 and U5-40K that specifically reconstitute luciferase activity in the U5 snRNP complex. We revealed that the reporter detects the effects of small molecules on the levels of the U5 snRNP-reporter protein complex. Our assay will be useful to identify the small molecule that can control the snRNP level in an appropriate range.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学 スプライシング snRNP

1. 研究開始当初の背景

pre-mRNA スプライシングは、転写産物である pre-mRNA からイントロンを除き、エキソンをつなぎ合わせることで成熟 mRNA を産生する反応である。この反応を担う巨大複合体スプライソソームは、5 種類のサブユニットに分けられる。各サブユニットは 5 種類の核内低分子 RNA (snRNA) を骨格として各 snRNA に特異的に結合するタンパク質群からなり、それぞれ U1、U2、U4、U5、U6 snRNP と呼ばれる。スプライソソームはこの各 snRNP が pre-mRNA 上に集合し、構成を変えながらスプライシング反応を行う動的な複合体である。

スプライシング反応を触媒する時点でスプライソソームは U2、U5、U6 からなる活性型複合体となるが、そのうち U5 と U6 は U4/U6.U5 tri-snRNP 複合体として供給される。そのため、イントロンの多い高等真核生物では U4/U6.U5 tri-snRNP の供給とリサイクルが必須であり、このサイクルが滞ると細胞機能に支障が生じると予想される。網膜視細胞死による視覚障害を起こす優性遺伝型網膜色素変性症 (AdRP) では、その 10% で tri-snRNP 因子 (Prp3、Prp31、Prp8、Brr2、Prp6、PAP-1) に原因変異が認められ、どの変異も tri-snRNP やその前駆体である U5 snRNP の異常を引き起こすと予想される。

各変異が及ぼす遺伝子機能への影響の報告は研究開始当時は少なかったが、最近になり、変異タンパク質には構造異常や分解されやすいなど、単純に正常な分子の数が減少する性質を持つ場合に加えて、U5 snRNP の成熟に必要な構成因子の切り替えが、変異による分子間相互作用の減少により起こりにくくなるなど、snRNP 形成経路に及ぼすケースも知られてきている。

しかし、全身に影響しうる tri-snRNP 異常に伴うスプライシング破綻がなぜ網膜特異的な疾患を引き起こすのかについては依然として不明のままである²。

2. 研究の目的

スプライシング因子の変異が原因である AdRP では 2 つの研究の方向性が考えられる。1 つは網膜特異的な疾患の発症機序を基礎から掘り下げ解明する研究であり、

もう 1 つはその機構は不明のまま、複数のスプライシング因子の変異で起こる snRNP 形成異常を 1 つの病態として捉え、それを改善する方法を探求する研究である。我々は、現状で不足している解析手法を新たに確立することで、変異が引き起こす分子レベルの異常の解析と、変異による snRNP 形成異常を改善する化合物の探索、この 2 つを同時に追求することを旨とした。

このような意図に沿って、本研究では大きく分けて 3 つの目的を設定した。1 つめは AdRP で見られるスプライシング因子の変異が各タンパク質に及ぼす効果とスプライソソームや snRNP の形成に及ぼす影響を分子レベルで明らかにすること、2 つめは、細胞内の snRNP 量がどのような調節を受けているかを明らかにすることである。疾患原因変異の snRNP への影響が snRNP 形成量に対するものである場合、細胞内の snRNP 量レベルがどのくらいの範囲であれば適正で、その範囲にどのようにして細胞は snRNP レベルを収めているのかが分かれば、網膜視細胞が他の細胞とどのように異なるかが理解でき、薬剤による状況改善の方向性が見えてくると予想される。3 つめの目的は、変異によって起こる snRNP への影響を低分子化合物などにより抑制する方法を見出すことである。

3. 研究の方法

変異の影響を分子レベルで理解するために不足している解析手法とは、多数の因子からなるスプライソソームの構成因子間の直接の相互作用を系統的に検出する手法である。スプライソソームの研究は主に酵母の遺伝学による関連因子の遺伝学的相互作用解析と、質量分析技術の進展による構成因子の網羅的同定に支えられてきた。一方でスプライソソームは、100 種以上の構成因子が複雑な相互作用ネットワークを有し、それがダイナミックに構成を変える複合体であるがゆえに、個々の分子の相互作用の解析は遅れていた。とくに、蛋白質間相互作用の解析方法の多くが間接的な相互作用も含めて検出するものであり、100 種以上の分子につ

いて直接相互作用の有無を迅速に検討できる網羅的手法は酵母ツーハイブリッド法に限定されていた。そのため、酵母ツーハイブリッド法で結合因子が発見されていない分子についてはその役割は酵母の遺伝学的解析から推測するだけであった。

また、変異がスプライソソームやsnRNPに及ぼす影響とそのメカニズムが理解されても、最終的にsnRNPを簡便に検出する方法がないため、変異の影響を抑制するような化合物を大規模な化合物ライブラリーからスクリーニングすることは不可能であった。

我々は、これら2つの問題を同時に解決する方法として、スプリットルシフェラーゼによる分子間相互作用検出の応用に着目し、本研究では下記の通り、3つの具体的な目標を定めて実施した。

- スプリットルシフェラーゼによる間接分子間相互作用に基づいたsnRNP検出法の確立
- 直接分子間相互作用の検討
- snRNP検出法による化合物スクリーニング

4. 研究成果

スプリットルシフェラーゼでは、ルシフェラーゼのN末端・C末端断片を相互作用する2つのタンパク質に融合させ、その両者が結合した場合に、ルシフェラーゼ活性が再構成されるため、そのルシフェラーゼ活性による発光量で分子間結合量を検出する。そこで、snRNP内の異なる2分子にルシフェラーゼのN・C末端断片を連結したルシフェラーゼ融合レポーター遺伝子のライブラリーを作成した。ライブラリーにはsnRNPの核となる恒常的な構成因子15種類を選び、それぞれにルシフェラーゼのN末端、C末端を目的分子のN末端、C末端に融合するため、ライブラリーは15 x 4で60種類のコンストラクトからなる。もし任意の二分子がsnRNP内で直接もしくは間接に相互作用するならばルシフェラーゼ断片が近接し、活性が再構成されるはずである。まず293T細胞内にそれら融合遺伝子群を組み合わせさせて発現させ、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を検出した。snRNP内の二分子が間接的に相互作用する場合

は、発光量がその二分子を含むsnRNP形成量の指標となる。実際に発光する組み合わせについて、さらに密度勾配遠心や免疫沈降で複合体を回収し、複合体画分での発光を確認したところ、これまでにそのようなレポーター遺伝子のセットを5種類発見した。そのうちの1つはU5 snRNP量と相関するレポーターとなることが分かり、その実験系については論文報告を行った。

また、試験管内で合成したレポーター分子を混合した後に発光を検出した。この場合は発光が見られるのは直接相互作用がある分子が含まれる場合と予想される。全てを総当たりで検討すると500以上の組み合わせがあるため、レポーター分子をsnRNPのグループ毎に分け、グループまとめて混合した実験から発光したグループを選択し、そのグループから各遺伝子を除いた場合に発光が減弱する組み合わせを選ぶことで、発光する遺伝子セットの探索を実施した。その結果、これまでに結合因子が全く知られていなかった分子について結合が確認された。また、この手法ではレポーター遺伝子はPCR断片でも試験管内合成の鋳型となること、混合液中に二つのレポーター分子だけでなく、ルシフェラーゼを融合してないどちらかの分子を加えると競合阻害により発光が減弱することから、発光に關与するタンパク質中のドメイン決定も迅速に行うことが可能であった。これらは多種の分子間で直接相互作用を検出する上でのスプリットルシフェラーゼの優位性を示す結果となっている。

この新規に発見された分子間相互作用の片側の因子はAdRPの原因遺伝子の1つであったので、変異体の結合への影響を上記の試験管内での競合実験により検討したが、RP変異の影響は確認されなかった。このことから、今回発見された分子間相互作用はRP発症に關わるsnRNP形成経路と直接關わる可能性は低い。しかし、最近の報告からその相互作用の役割がユビキチン化によるスプライソソーム形成制御と關連する可能性があり検討を続けている。

3つめの目的である、化合物探索に関しては、論文報告したU5 snRNPの指標となるレポーター遺伝子の安定発現株やtri-snRNPの指標となるレポーター遺伝子の安定発現株を293T細胞を用いて樹立し探索系として利用した。細胞抽出液を用いたスプリットルシフェラーゼ活性検出は、snRNP検出のように、活性が間接的な相互作用による場合は、抽出液の保存状況などで発光が大幅に減弱する場合があります、自動化には緩衝液の検討など、いくつかの段階で検討が必要であったが、化合物ライブラリースクリーニングを実施可能な精度とスケールの実験系を組むことができた。化合物ライブラリーは東京大学オープンイノベーションセンターが保有するライブラリーを使用してスクリーニングを行った結果、レポーター活性を変動させる陽性化合物が複数得られた。さらに内在性のsnRNPへの影響を検討する実験系を構築し、化合物の絞り込みを行い、細胞内のsnRNPレベルに対して、既知のスプライシング阻害剤とは異なる効果を示す化合物が得られている。この化合物によるsnRNP量の調節がスプライシング因子にAdRP変異を有する患者細胞においてどのように働くかは不明であり、今後そのような解析を行うことで、スプライシング因子の異常が原因となるAdRPにおける新たなアプローチの治療薬となる可能性を検討できると期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Maita H., Tomita K. and Ariga H. (2014) A split luciferase-based reporter for detection of a cellular macromolecular complex. *Anal. Biochem.* 452:1-9. [cover art] (査読: 有)

[学会発表](計 3 件)

- 1) Tomita K., Ariga H. and Maita H. Analysis of the spliceosome formation by a newly developed snRNP reporter. 日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日 福岡
- 2) Shiida M., Ariga H. and Maita H. A possible role for Prp3-Sad1/USP39 interaction in the spliceosomal

assembly 日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 14 日 横浜

- 3) Maita H. and Ariga H. Detection of Cellular U5 snRNP Levels Using Split Luciferase. The 16th Annual Meeting of the RNA Society June 14-18, Kyoto, Japan (2011)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 宏 (MAITA HIROSHI)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 60431318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし