

平成 29 年 10 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25460057

研究課題名（和文）スプライシングの正確性制御機構の解明とスプライス部位変異克服への応用

研究課題名（英文）Suppression of the splicing mutation based on the molecular mechanism of pre-mRNA splicing fidelity

研究代表者

米田 宏 (MAITA, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：60431318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,000,000 円

研究成果の概要（和文）：これまでに我々は独自にスプライソソーム調節化合物のスクリーニング系を開発し、スプライシング調節活性を持つと予想される陽性化合物群を化合物ライブラリーのスクリーニングにより取得してきた。本研究ではスプライス部位と呼ばれるイントロン末端に保存された短い配列に注目し、この配列に変異が入るとスプライシングが正常に起こらず遺伝性疾患の原因となることから、そのモデルとなるレポーター遺伝子を構築して、陽性化合物群の効果について詳しい解析を行った。その結果、複数の化合物が3' スプライス部位変異の存在にも関わらず元の場所でのスプライシングを誘導できることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We have developed an assay to find a compound that affect the spliceosome and have obtained several hit compounds by the automated screening of a small compound library. In this study we made a genetic reporter to detect the compound-mediated recovery of defected splicing that is caused by a mutation in the 3' splice site. Some of our hit compounds have shown that they can induce splicing of the mutated intron at the correct site.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の原因変異の 10%以上はイントロン末端の短い保存された配列に集約され、それらの変異はスプライス部位変異と呼ばれる。スプライス部位は 5'側・3'側いずれもスプライソソームにより認識され、イントロンがスプライシング反応で除去される上で必須の配列である。このスプライス部位に変異が入ると、本来の遺伝コードで規定されていたのは別のスプライス部位がスプライシング反応に使用され、除去されるイントロン領域が大きく変化してしまう(図1)。

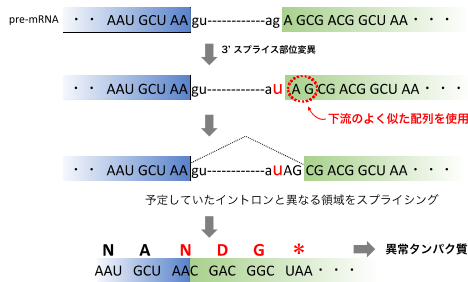


図1 スプライス部位変異のスプライシングへの影響

そのため、タンパク質をコードする領域にこのような変異が入ると多くの場合、機能的なタンパク質を産生することができなくなり、それが細胞機能の維持に必須の場合は疾患へとつながる。このようなスプライス部位変異は報告数は多いものの、特定の家族性の疾患に見つかる希少変異であることがほとんどであり、各変異に応じた薬の開発は疾患の発症機序からのアプローチ以外は困難である。

申請者はスプライソソームがイントロン末端の短い配列をどのように正確に認識するのか、そのメカニズムを酵母を用いて研究を行ってきた。その過程で、酵母においては特定の ATPase などのスプライソソーム構成タンパク質の変異株において、スプライス部位の認識の正確さが低下し、本来はスプライシングされないはずの変異スプライス部位でのスプライシングが回復することを見出していた(図2)。

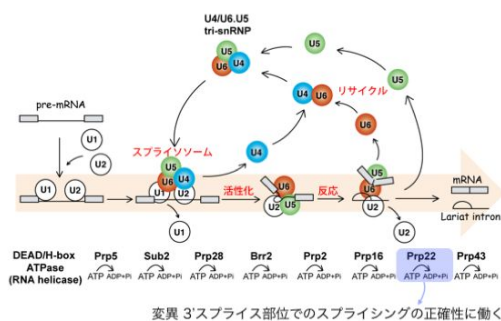


図2 スプライソソームの構造変換と ATPase

このようなタンパク質の変異がスプライシングの正確性を低下させるのであれば、その変異と同様の影響を低分子化合物によって誘導できれば人為的にスプライシングの正

確性を低下させ、疾患原因変異がスプライス部位にある場合の共通の治療戦略になる可能性を考え、そのような化合物の網羅的な取得を試みてきた。

近年の大規模化合物ライブラリーからの生理活性を示す低分子化合物スクリーニング技術の普及もあり、我々は独自のアッセイ系をスクリーニングシステムとして開発し、スプライソソーム量を変動させる化合物を潜在的なスプライシング調節化合物として網羅的に取得する方法を開発し、実際に陽性化合物群を取得してきた。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの陽生化合物が実際にスプライシング調節活性を示すかどうか、さらにスプライス部位変異を有するイントロンのスプライシングに及ぼす影響を指標として、スプライス部位配列認識の正確性を低下させる化合物の同定を目指した。

3. 研究の方法

まずスプライス部位変異を有するイントロンを含むモデル遺伝子を構築した。モデルとするイントロンには通常恒常的にスプライシングされることが知られ、かつクロニングに適した長さであるヒトのファイブロネクチン遺伝子のイントロンを用いた。このレポーター遺伝子は2つのファイブロネクチン由来のイントロンを含み、上流のイントロンは変異を含まず恒常的にスプライシングされることで、下流のイントロンのスプライシングの有無によらず mRNA の核外輸送や翻訳ができるだけ効率よく起こるような設計としてある。そのため、このレポーター遺伝子はエクソン3つからなる遺伝子であるが、第一エクソンは GFP をコードし、第三エクソンにはルシフェラーゼを挿入した。下流側のイントロンが変異によりスプライシングされない場合、GFP は発現するものの、ルシフェラーゼは発現しないこととなり、ルシフェラーゼ活性(発光)の GFP 蛍光に対する比を検出することでスプライシング効率を簡便に検出することが可能となる(図3)。

Figure

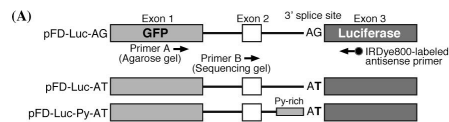


図3 スプライス部位変異レポーターの構造

4. 研究成果

(1) 上記のようなレポーターを構築し、化合物ライブラリーから得られた陽性化合物の二次スクリーニングを行うこととした。この二次スクリーニングを実施するにあたり、実際にこのアッセイ系が予想通りに動くか検討する意味も含めて、小規模の生薬由来の低分子化合物を富山大学和漢医薬研究所から供与いただき、その化合物群を手動でスクリーニングした。その結果、いくつかの化合物が一次スクリーニングに使用したスプラ

イソソーム量のアッセイと本研究で構築したスプライス部位変異レポーターの2つの実験系でヒットし、そのうちのルテオリンについてさらに詳しく解析を行った。

ルテオリンは食物などに含まれるフラボンで他にもアピゲニンやナリングニンなど多数の類縁化合物が知られている。複数のフラボンを入手して解析したところ、ルテオリンと同じくスプライス部位変異レポーターのスプライシング回復活性を示したのはアピゲニンで、ナリングニンやゲニステインにはそのような効果は見られなかった(図4)。他のグループの報告で、ルテオリンとアピゲニンはスプライシングの調節因子として働くRNA結合タンパク質であるhnRNP A2の機能を抑制することが知られており、本研究結果はその報告のhnRNP A2結合活性のフラボン間での構造活性相関と矛盾しないことから、スプライス部位認識の正確性とhnRNP A2の関係に興味を持たれる結果であった(発表論文)。

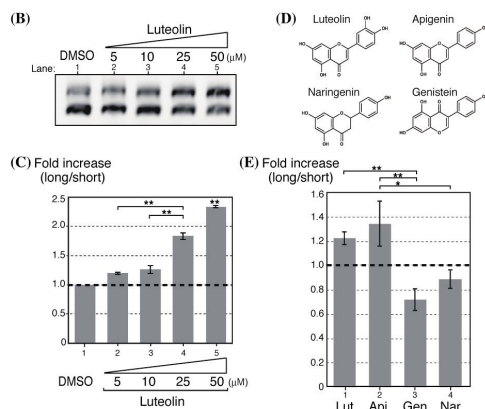


図4 ルテオリンの変異スプライス部位でのスプライシング回復活性の検討(発表論文より引用)

ルテオリンの作用機序についてはhnRNP A2のファミリー分子であるhnRNP A1について3'スプライス部位認識に関与することが報告されており、相同性の高いhnRNP A2も同様の作用機序で3'スプライス部位の認識に関わっており、それがルテオリンで阻害される可能性、もしくはhnRNP A2の活性がルテオリン存在下で低下するため、ファミリー分子であるhnRNP A1がA2の代わりに機能する場面が増えるために、相対的に3'スプライス部位の認識に関わる分子数が減少してこのような現象が起こる可能性などが考えられる。

(2) 上記の結果によりレポーター遺伝子を用いたアッセイのコンセプトの検証ができたので、二次スクリーニングを行った。その結果、東京大学創薬機構から提供された化合物ライブラリーのスクリーニングにより得られたヒット化合物中にも同様の活性を示す化合物があることを確認した。活性が一番高いものについてさらに解析を行い、免疫沈

降法によるスプライソソームの構成因子の解析ではこの化合物の添加により特定の段階でスプライソソームが停止していることを示唆する変化が見られた。今後この化合物の転写産物全体への影響について解析を行うことで化合物の応用可能性を検討していきたいと考えている。

(3) これ以外にも、スクリーニングで得られた化合物について他の指標も用いて二次スクリーニングを行い、様々なタイプのスプライシング関連の細胞機能の調節化合物を取得することに成功した。各化合物のスプライシングへの影響の精査はこれからであり、今後、疾患原因のスプライス部位変異を持つモデル細胞や、近年急速に明らかになってきたスプライシング因子の異常が原因で起こる腫瘍にこれらの化合物がどのような効果を示すか検討していきたい。

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)

千葉 政徳、有賀 寛芳、米田 宏、A Splicing Reporter Tuned to Non-AG Acceptor Sites Reveals that Luteolin Enhances the Recognition of Non-canonical Acceptor Sites., Chemical Biology and Drug Design (査読あり)、87 巻、2016 年、275-282、DOI: 10.1111/cbdd.12656.

〔学会発表〕(計 3 件)

米田 宏、Identification of small compounds that affect the cellular snRNP levels, RNA society meeting 2016、2016 年 6 月 30 日、京都国際会館(京都府京都市)

富田 健司、千葉 政徳、有賀 寛芳、米田 宏、アクセプター部位変異存在下でスプライシングを回復させる化合物の探索、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 16 日、ホテルライフオーソ札幌(北海道札幌市)

米田 宏、有賀 寛芳、細胞内 snRNP 量を変化させる化合物の探索 第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日、愛媛県民文化会館・ひめぎんホール(愛媛県松山市)

〔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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()