

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32624

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670168

研究課題名(和文) Smad依存性のスプライソソーム複合体形成と選択的スプライシング

研究課題名(英文) Smad-mediated spliceosome assembly and alternative splicing

研究代表者

坂田 宣夫 (SAKATA, Nobuo)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00170598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β 細胞内シグナル伝達分子、Smadの新たな役割としてスプライシング制御に関わる可能性を検討した。網羅的解析で同定されたSmad結合タンパク質のうち、スプライソソーム複合体構成分子のLUC7L3とSmad類の結合を免疫共沈降法で詳細に分析したが、その物理的結合を確認することはできなかった。そこでLUC7L3等と複合体を形成する選択的スプライシング関連分子JMJD6に着目し、JMJD6が免疫共沈降法でSmad2,3と物理的結合をすることを確認した。その他のSmad類との結合、及び、その詳細は今後の研究を待つところである。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility that Smads, TGF- β signal transducer, are involved in the alternative splicing events producing splice variants. Among Smad binding proteins identified in proteomic analysis, we analyzed the interaction of LUC7L3, spliceosome components, and Smads by the co-immunoprecipitation (Co-IP) method in detail. Otherwise, the binding of these molecules was not identified. Therefore, we tested the interaction of JMJD6 and Smads, because JMJD6 are involved in alternative splicing and interacted with LUC7L3. JMJD6 was successfully interacted with Smad2 and Smad3 by the analysis of Co-IP. Further study is needed, which will be shed light on a new scheme of Smads and alternative splicing.

研究分野：薬学

キーワード：Alternative splicing Smad LUC7L3 JMJD6

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む真核細胞の染色体 DNA の遺伝子は、通常複数のエクソンと複数のイントロンとに分かれており、前駆体 mRNA に転写された後に、核内に存在するスプライソソーム複合体により、イントロンが取り除かれ、エクソンのみを含む成熟 mRNA が生成され、核から細胞質に移行し、翻訳される。組織特異的または時期特異的に選択的スプライシング(alternative splicing)が起こると、複数個のエクソンから成る遺伝子から、異なるエクソンが組み合わさることで、複数個の転写産物が合成される。この過程により、タンパク質の多様性が生み出され、さらにはこの多様性は生物の高次性に繋がっている (Nat. Rev. Genet., 11:345-355, 2010)。しかしながら、この選択的スプライシングの機構については、未だ不明な点が多い。

TGF- β シグナルの細胞内シグナル伝達分子として知られている Smad は、様々な転写因子と核内で結合し、TGF- β の標的遺伝子の発現を制御している (Growth Factors, 29:163-173, 2011)が、最近では、Smad 分子が Drosha と結合し、miRNA の成熟化を制御するなど、RNA の成熟過程における Smad の機能 (Mol. Cell, 39:373-384, 2010; Nature, 454:56-61, 2008)についても徐々に報告されている。申請者は、Smad 分子が転写制御以外の機能を有している可能性を視野に入れ、Smad 分子と結合する細胞内分子を、産総研 家村 修一郎博士との共同で多数単離している。これらの Smad 結合分子の中に、splicing factor 複合体の構成成分や LUC7L3 と呼ばれる U1 snRNP spliceosomal サブユニットと結合するタンパク質も同定されている。Smad 分子が、スプライシングを制御しているという研究方向は国内外では、まだ報告されておらず、スプライシングに関与するタンパク質が Smad と結合することは我々のみが知りえる情報となっている。そこで我々は Smad 分子の新たな役割としてスプライシング制御に関わる可能性を本研究で検討した。

2. 研究の目的

本研究期間内に、Smad が時空間(または組織)特異的にスプライソソーム複合体の一員として、特定の遺伝子の選択的スプライシングを行い、タンパク質の多様性を導き、細胞(または組織)の恒常性に変化を与えることを明確にする。さらに、Smad 分子を欠損(コンディショナルノックアウト(CKO)マウス)させることで、タンパク質の多様性が喪失し、恒常性の破綻が導かれ、様々な疾患に繋がることを明らかにする。

3. 研究の方法

Smad 分子依存的な選択的スプライシングを検討するために、各種 Smad 欠損 MEF と野生型 MEF をリガンド刺激の有無で比較し、網羅

的に選択的スプライシングが起こっている遺伝子を DNA エクソソームで同定する。同定された遺伝子に対応するミニ遺伝子を作製し、実際 Smad 分子が選択的スプライシングに関わっていること、並びにループアウトされる RNA 領域内のランチ配列を同定することで、Smad 分子の選択的スプライシング機構を明らかにする。加えて、PLA 法により、Smad 分子とループアウトされるイントロン内に存在するランチ配列を含んだ RNA 間の分子相互作用を検出する技術を開発することで、Smad 分子が関与する選択的スプライシングの異常を検出できるようにする。

4. 研究成果

(1) 網羅的解析で同定された Smad 結合タンパク質のうち、スプライソソーム複合体構成分子の LUC7L3 と Smad 類の結合を COS7 細胞での大量発現系を用いる免疫共沈降法 (Co-IP) で分析した。1) V5-Smad2、V5-Smad3、V5-Smad4 と Flag-LUC7L3 を用いた Co-IP で、LUC7L3 と Smad2、LUC7L3 と Smad3、LUC7L3 と Smad4 との結合は確認できなかった (V5 で IP)。2) V5-Smad2、V5-Smad3 と Flag-LUC7L3 を用いた Co-IP で、LUC7L3 と Smad2、LUC7L3 と Smad3 との結合は確認できなかった (Flag で IP)。3) V5-Smad2、V5-Smad3、V5-Smad4 と Flag-LUC7L3 を用いた Co-IP で、LUC7L3 と Smad2、LUC7L3 と Smad3 との結合を TGF- β 型受容体構成的活性化体 (ALK5ca) 存在下、LUC7L3 と Smad4 との結合を ALK5ca 存在下、及び、BMP 型受容体構成的活性化体 (ALK6ca) 存在下検討したが結合を確認できなかった。4) V5-Smad1、V5-Smad5、V5-Smad8 と Flag-LUC7L3 を用いた Co-IP で、LUC7L3 と Smad1、LUC7L3 と Smad5、LUC7L3 と Smad8 との結合を ALK6ca 存在下検討したが結合を確認できなかった。5) V5-Smad6、V5-Smad7 と Flag-LUC7L3 を用いた Co-IP で、LUC7L3 と Smad6、LUC7L3 と Smad7 との結合を確認できなかった。6) 前記の 5) と同様な Co-IP で、LUC7L3 と Smad6、LUC7L3 と Smad7 との結合を ALK5ca 存在下、及び、ALK6ca 存在下検討したが結合は確認できなかった。

(2)

実験計画の最初のステップであるスプライソソーム複合体構成分子 LUC7L3 と Smad 類の物理的会合を確認出来なかった。その理由として次のような事が考えられる。1) LUC7L3 と Smad との結合を他のスプライソソーム構成分子が干渉している。2) Smad は LUC7L3 とは結合せず、他のスプライソソーム構成分子と結合し、スプライシング機構に影響を与えている。そこで LUC7L3 と複合体を形成するスプライソソーム複合体構成分子として JMJD6 に着目した。LUC7L3 と JMJD6 は Smad 結合性プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーター活性を、TGF- β 刺激下、及び、JMJD6 は BMP6 刺激下においても、上昇させた

((CAGA)₁₂-luc, (SBE)₄-luc) さらに、LUC7L3 と JMJD6 が複合体を形成する事を Co-IP で確認した。そこで、さらに JMJD6 と Smad2、及び Smad3 との結合をみたところ、微弱ながらその物理的会合が Co-IP で確認された。以上の事を総合すると、Smad 類分子が LUC7L3 及び、JMJD6 と 3 者複合体を形成する事が示唆された。今後さらに LUC7L3 と JMJD6 の結合に対する他の Smad 分子の影響を検討するなど詳細な検討を進める必要がある。

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 3 件)

Nobuo Sakata, Satoshi Kaneko, Souichi Ikeno, Yutaka Miura, Hidekazu Nakabayashi, Xue-Yuan Dong, Jin-Tang Dong, Taiki Tamaoki, Naoko Nakano, Susumu Itoh: TGF- β signaling cooperates with AT motif-binding factor-1 for repression of the α -fetoprotein promoter.

J. Signal Transduct., 2014, 970346 (2014), DOI:10.1155/2014/970346

査読有

Naoko Nakano, Kota Maeyama, Nobuo Sakata, Fumiko Itoh, Ryosuke Akatsu, Miki Nakata, Yuki Katsu, Souichi Ikeno, Yoko Togawa, Thao Thanh Vo Nguyen, Yukihide Watanabe, Mitsuyasu Kato, Susumu Itoh: C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- β Signaling.

J. Biol. Chem., 289(18), 12680-12692 (2014), DOI:10.1074/jbc.M114.558981

査読有

Yakov Chudnovsky, Dohoon Kim, Siyuan Zheng, Warren A. Whyte, Mukesh Bansal, Mark-Anthony Bray, Shuba Gopal, Matthew A. Theisen, Steve Bilodeau, Prathapan Thiru, Julien Muffat, Omer H. Yilmaz, Maya Mitalipova, Kevin Woolard, Jeongwu Lee, Riko Nishimura, Nobuo Sakata, Howard A. Fine, Anne E. Carpenter, Serena J. Silver, Roel G.W. Verhaak, Andrea Califano, Richard A. Young, Keith L. Ligon, Ingo K. Mellinghoff, David E. Root, David M. Sabatini, William C. Hahn, Milan G. Chheda; ZFH4 Interacts with the NuRD Core Member CHD4 and Regulates the Glioblastoma Tumor-Initiating Cell State. *Cell Rep.*, 6(2), 313-324 (2014), DOI:10.1016/j.celrep.2013.12.032

査読有

[学会発表] (計 8 件)

Nobuo Sakata, Satoshi Kaneko, Souichi Ikeno, Yutaka Miura, Hidekazu Nakabayashi, Xue-Yuan Dong, Jin-Tang Dong, Taiki Tamaoki, Naoko Nakano, Susumu Itoh: Transcriptional Repression

Mechanisms of TGF- β Signaling and ATBF1 on the *AFP* Promoter. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer "Signal Network in Tumor Microenvironment" 2015/1/12-13 Tsukuba International Congress Center (Tsukuba, Ibaraki)

Naoko Nakano, Kota Maeyama, Nobuo Sakata, Fumiko Itoh, Ryosuke Akatsu, Miki Nakata, Yuki Katsu, Souichi Ikeno, Yoko Togawa, Thao Thanh Vo Nguyen, Yukihide Watanabe, Mitsuyasu Kato, Susumu Itoh: The functional relationship between C18ORF1 and TMEPAI in TGF- β /Smad signaling. Ludwig TGF- β Meeting in Leiden 2014 "TGF- β signal transduction in human disease" 2014/5/7-10 Leiden (NL)

Nobuo Sakata, Satoshi Kaneko, Souichi Ikeno, Yutaka Miura, Hidekazu Nakabayashi, Xue-Yuan Dong, Jin-Tang Dong, Taiki Tamaoki, Naoko Nakano, Susumu Itoh: Negative regulation of α -fetoprotein gene transcription by TGF- β signaling with AT motif binding factor 1 (ATBF1). Ludwig TGF- β Meeting in Leiden 2014 "TGF- β signal transduction in human disease" 2014/5/7-10 Leiden (NL)

Nobuo Sakata, Satoshi Kaneko, Souichi Ikeno, Yutaka Miura, Hidekazu Nakabayashi, Xue-Yuan Dong, Jin-Tang Dong, Taiki Tamaoki, Naoko Nakano, Susumu Itoh: TGF- β signaling cooperate with ATBF1 in *AFP* transcription. The 3rd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling" 2013/10/28 Yamatoya-Honten (Matsuyama, Ehime)

中野なおこ、赤津俊介、中田美紀、伊東史子、坂田宣夫、葛祐紀、池野聡一、戸川陽子、伊東進：TMEPAI ファミリーによる TGF- β シグナル制御機構、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014/10/4、昭和薬科大学 (町田、東京)

坂田宣夫、金子哲士、池野聡一、三浦裕、中林秀和、Xue-Yuan Dong、Jin-Tang Dong、玉置大器、中野なおこ、伊東進：

転写因子 ATBF1 と TGF- β シグナル伝達系による α -fetoprotein 遺伝子プロモーターの協調的抑制、第 58 回日本薬学会関東支部大会、2014/10/4、昭和薬科大学(町田、東京)

坂田宣夫、金子哲士、池野聡一、三浦裕、中林秀和、Xue-Yuan Dong、Jin-Tang Dong、玉置大器、中野なおこ、伊東進：TGF- β /Smad シグナル伝達系と転写因子 ATBF1 による α -fetoprotein 遺伝子転写抑制、第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12/3、神戸国際会議場(神戸、兵庫)

Nobuo Sakata, Satoshi Kaneko, Souichi Ikeno, Yutaka Miura, Hidekazu Nakabayashi, Taiki Tamaki, Naoko Nakano, Susumu Itoh: TGF- β Signaling Cooperates with AT Motif Binding Factor 1 (ATBF1) to Repress α -Fetoprotein Gene in Human Hepatoma Cells. 第 86 回日本生化学会大会、2013/9/12、パシフェコ横浜(横浜、神奈川)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

坂田 宣夫 (SAKATA, Nobuo)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号： 00170598

(2)研究分担者

伊東 進 (ITO, Susumu)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号： 70223154

(3)連携研究者

()

研究者番号：