

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840008

研究課題名(和文)新規スプライシング調節機構によるDNA損傷修復モデルの立証と解析

研究課題名(英文)Analysis of intron-retaining form of DNA repair-related mRNAs

## 研究代表者

二宮 賢介(Ninomiya, Kensuke)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00437279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は特殊なスプライシング制御による遺伝子発現誘導機構を見出していた。この機構によって発現を制御される遺伝子群が、細胞に対するストレス、特に熱とDNA損傷への応答に関わっている可能性が示唆されていたため、その解析を行った。その結果、それぞれ異なるストレスを引き金として、同様の機構によって必要な遺伝子の発現が誘導されていることが示唆された。また、特定のDNA損傷関連遺伝子における、制御機構に必須なRNA結合蛋白質を見出した。

研究成果の概要(英文)：Signal-induced splicing of nuclear intron-retaining RNA is a novel regulation mechanism of gene expression. However, it was still unclear what kinds of genes are controlled in a similar manner. Next generation sequencing and bioinformatics analyses revealed that some of promising candidates for novel intron-retaining RNAs are related to DNA damage response and regulated by DNA damage agents.

研究分野：分子生物学

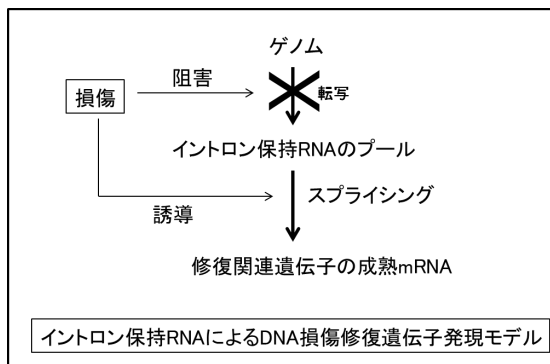
キーワード：スプライシング ストレス応答

## 1. 研究開始当初の背景

核内 intron-retaining RNA とは、一部の遺伝子の pre-mRNA 成熟過程においてみられる、特定のイントロンのみがスプライシングされず保留された状態で、核内に蓄積されている成熟直前の RNA のことである。代表的な例として、Clk1、Clk4 の転写産物の大半は、12 個のイントロンのうち 3 番目と 4 番目だけを保持した状態で核内に留まっている。更に、これらのイントロンは熱ストレスに反応してスプライシングされ、結果として、速やかに成熟 mRNA が産生されることが明らかになっている。この発現様式のメリットとして、シグナルに対する迅速な遺伝子発現応答や、転写アレスト条件下における遺伝子発現誘導が可能である点が考えられる。しかし、他にどの遺伝子が同様の機構で発現を制御されているか、それらがどのような細胞機能に寄与するかについては、殆ど明らかになっていない。

そこで、未知の核内 intron-retaining RNA の大規模探索を試みた。既知の幾つかの核内 intron-retaining RNA に共通の特徴を利用して大規模シークエンスによって、新規の核内 intron-retaining RNA、および、保持されるイントロンの探索・同定を行った。興味深いことに、得られた候補 intron-retaining RNA の遺伝子産物の gene ontology を解析した結果、スプライシングを含む RNA プロセシングに関わる遺伝子の他に、DNA 損傷修復関連遺伝子が多く見られた (代表者ら未発表データ)。

このことは、DNA 損傷応答において、これらの遺伝子の intron-retaining form が何らかの役割を果たしている可能性を示唆していた (下図仮説)。



## 2. 研究の目的

本研究課題は、DNA 損傷時における DNA 損傷関連遺伝子の intron-retaining form のスプライシング制御の有無を解析し、DNA 損傷応答における intron-retaining form の役割を解明することを目的にしている。

(1) DNA 損傷関連遺伝子群の intron-retaining form の DNA 損傷応答性

DNA 損傷関連遺伝子の intron-retaining form の存在は、DNA 損傷時にこれらの RNA がスプライシングされ、速やかに成熟型 mRNA になることを予想させる。そこで、DNA 損傷後のこれらの RNA の発現量、スプライシング・パターンの解析を行う。

(2) DNA 損傷関連遺伝子群の intron-retaining form のスプライシング制御機構の解明

Intron-retaining form の産生・維持やスプライシングによる成熟の分子メカニズムは全く分かっていない。そこで、これらの機構に関わる蛋白質を同定し、ストレスごとに異なる、あるいは、共通する intron-retaining 制御の分子機構の解明を目指す。

(3) DNA 損傷刺激時における intron-retaining form の役割の解明

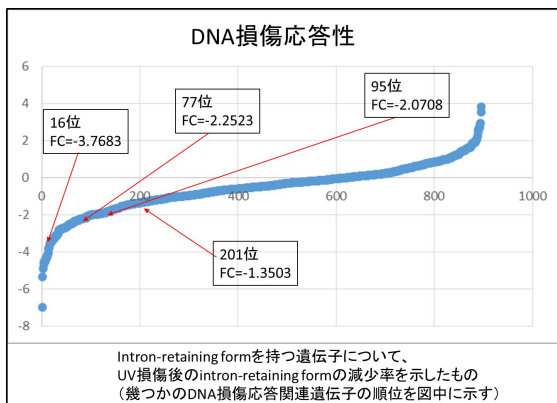
DNA 損傷関連遺伝子の幾つかが intron-retaining form を持つことの生理的意義は依然として不明である。この点を明らかにするために、この form の有無による、これらの遺伝子の成熟型 mRNA の存在量や細胞の DNA 損傷修復過程への影響を解析する。

## 3. 研究の方法

次世代シークエンスとバイオインフォマティクス的手法により、DNA 損傷関連遺伝子群の intron-retaining form について、DNA 損傷、および比較対象として熱ストレスを模した条件の下において、スプライシング制御の有無を解析した。また、RNA 結合蛋白質の siRNA ノックダウンにより、intron-retaining form の蓄積、維持に関わるトランス因子の同定を行った。Intron-retaining form の有無が、細胞の DNA 損傷応答や、転写阻害時の成熟型 mRNA の量にどのような影響を与えるかを分子生物学的、生化学的手法により解析し、DNA 損傷時における役割を推定した。

#### 4. 研究成果

DNA 損傷刺激やその他のストレスによって発現誘導される遺伝子群を次世代シーケンサーによって取得し、比較解析を行った。また、既を取得していた intron-retaining form を持つ遺伝子群について解析した結果、intron-retaining form を持つ DNA 損傷修復関連遺伝子の中に、DNA 損傷刺激によってスプライシングが変化するものを見出した(下図)。



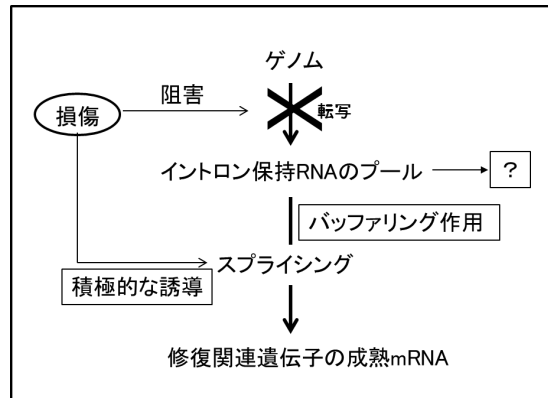
ここで見られた変化は、熱ストレスや、熱ストレス時のスプライシング制御を模した阻害剤投与においては、認められなかった。

また、特定の DNA 損傷関連遺伝子の intron-retaining form の蓄積に必須な RNA 結合蛋白質を siRNA スクリーニングによって見出した。これらは、熱ストレスによって起こる intron-retaining RNA のスプライシング制御に関わる因子群とは、今のところ、重複が認められない。これらの結果は、ストレスや遺伝子の種類によって、それぞれ異なる制御因子が関わっていることが示唆される。

また、いくつかの DNA 損傷関連遺伝子については、Intron-retaining form が存在することによって、転写阻害時に成熟型 mRNA の減少が抑制されることが示唆された。このことは、転写アレストが起きる DNA 損傷時において、修復関連遺伝子の mRNA の存在量を一定期間維持することに寄与している可能性を示唆している。

以上の結果は、intron-retaining form が、ストレス依存的なスプライシングによって成熟型 mRNA を速やかに産生するという従来の仮説以外に、転写停止時に mRNA 量を一定に保つバッファーとしての作用がある可能性を示唆している。また、上記以外の挙動を示す intron-retaining form も存在し、何ら

かの未知の役割を担っている可能性も存在する(下図)。



#### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

(1)  
ポスター発表  
第1回北大・部局横断シンポジウム  
新規核内 intron-retaining RNA の探索  
二宮賢介、飯田慶、萩原正敏  
2016年3月7日 北海道札幌市 北海道大学・フラテホール

(2)  
ポスター発表  
第17回 RNA 学会年会  
新規核内 intron-retaining RNA の探索と解析  
二宮賢介、飯田慶、佐久間真紀、佐古有季哉、萩原正敏  
2015年7月15日 北海道札幌市 ライフオートホテル札幌

[図書](計 1件)

(1)  
和文総説  
ヒートショック誘導性 lncRNA と核内構造体  
二宮賢介 廣瀬哲郎  
実験医学増刊「ノンコーディング RNA テキストブック」p94-95 羊土社  
2015年11月27日

6 . 研究組織  
(1)研究代表者

二宮 賢介 (Kensuke Ninomiya)  
(北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教)

研究者番号 : 00437279