

## カルシウムシグナルによる選択的 mRNA スプライシング制御の分子基盤解明

増田 誠司

京都大学大学院生命科学研究科

**概要** mRNA の選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムであり、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数(割合)は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる。特に、ヒトでは 70%以上の遺伝子において選択的スプライシングが起こる。また、ヒト遺伝病の 20-50%はスプライシングの異常に起因し、筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症といった難治性疾患も選択的スプライシングの破綻による RNA 病である。このため選択的スプライシング機構の解明は、ヒト遺伝病の原因究明や治療法開発の鍵となるだけでなく、将来的に選択的スプライシングを新たに制御できるようになれば、これまでになかった機能を持つ細胞の創生も可能となると期待されている。これまでに選択的スプライシングに関わる因子はいくつも見いだされているが、その分子機構についてはいまだ統一的概念には至っていない。加えて、Ca<sup>2+</sup>シグナルとmRNA 選択的スプライシングを結びつける知見はこれまではなかった。mRNA スプライシングに関する研究過程で、CHERP が mRNA スプライシングを制御する因子である事を見だし機能解析を開始した。本研究は、網羅的解析法を用いて CHERP により発現の制御されている遺伝子とそのエクソンを明らかにすることを目的とした。

まず、CHERP を効率良くノックダウンすることのできる siRNA を調べ、2種類のうち 3'UTR の部分に対して作成した siRNA の効果が高いことを見出した。次いで CHERP が制御する遺伝子解析としてエクソンアレイを用いた。エクソンアレイ解析の指標となる Splicing Index (SI) 値を基準として、それを満たす遺伝子の個数を調べ、それらの GO term 解析を行った。すると、細胞周期、有糸分裂、減数分裂、細胞周期制御などに関わる遺伝子の発現変動が大きかった。他にも細胞質分裂、DNA 複製、DNA 修復、染色体関連遺伝子の GO term がヒットした。

これらのことから、CHERP は細胞増殖に関する遺伝子の発現や選択的 mRNA スプライシングを制御していることが示唆された。CHERP の有無による細胞周期や細胞の増殖等の解析を進めていく予定である。

### 1. 研究目的

#### 1.1 研究の背景

##### 1.1.1 カルシウムシグナルと遺伝子発現

カルシウム(Ca<sup>2+</sup>)は、刺激をきっかけとして細胞外や小胞体から細胞質に流入することにより細胞内情報伝達を制御する因子である。細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度の変化は幅広い細胞応答へとつながっており、Ca<sup>2+</sup>シグナルの一部は、核に伝えられて特異的な遺伝子群の転写を促進する。これまで Ca<sup>2+</sup>シグナルによる遺伝子発現は専ら転写のレベルで解析されてきた。

##### 1.1.2 遺伝子発現とヒトにおける選択的スプライシングの意義

mRNA の選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムであり、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数(割合)は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる(**Figure 1**)。特に、ヒトでは 70%以上の遺伝子において選択的スプライシングが起こる。また、ヒト遺伝病の 20-50%はスプライシングの異常に起因し、筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症といった難治性疾患も選択的スプライシングの破綻による RNA 病である<sup>(1)</sup>。このため選択的スプラ

イシング機構の解明は、ヒト遺伝病の原因究明や治療法開発の鍵となるだけでなく、将来的に選択的スプライシングを新たに制御できるようになれば、これまでに見いだされていない機能を持つ細胞の創生も可能となると期待されている。これまでに選択的スプライシングに関わる因子はいくつも見いだされているが、その分子機構についてはまだ統一な概念には至っていない。加えて、Ca<sup>2+</sup>シグナルと mRNA 選択的スプライシングを結びつける知見はこれまではなかった。

### 1.2 報告者の研究と CHERP の従来研究

CHERP は発見当初、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナリングの制御に関わる因子として報告された<sup>(6)</sup>。最近、CHERP が mRNA スプライシングを行うスプライソソーム因子であること<sup>(6)</sup>、ならびにスプライシングに関わる因子特有のドメインも存在することが報告された<sup>(7)</sup>。これらの知見と申請者の発見から、Ca<sup>2+</sup>シグナリングを介した遺伝子発現に CHERP が重要な役割を担っていると考えられた。

報告者は、mRNA スプライシングに関する研究を行ってきた<sup>(2-4)</sup>。この過程で、スプライシングを制御する U2AF と相互作用する因子として CHERP を同定し、新たに機能解析を開始した。CHERP をノックダウンすると、通常は細胞質に局在する mRNA が核内に滞留した。

### 1.3 目的

本研究は、CHERP の制御する遺伝子を網羅的に解析することを目的として研究を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 動物細胞株と細胞培養法

培養細胞は、56°C で 30 分間非働化した FETAL BOVINE SERUM を 10% 添加した DMEM (High Glucose) (Wako 社) を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。

ヒト培養細胞株として、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 Flp-In™ T-Rex™ 細胞 (invitrogen 社) を使用した。

### 2.2 RNAi によるノックダウン

RNAi は Stealth RNAi siRNA (invitrogen 社) を用いて、Lipofectamine2000 (invitrogen 社) により細胞導入した。導入後、48 時間 37°C で培養した。

本研究で用いた CHERP#1 siRNA は CHERP 遺伝子の CDS 領域、CHERP#2 siRNA は CHERP 遺伝子の 5'UTR 領域を認識する。

### 2.3 ヒト培養細胞からの核タンパク質抽出法

15 cm dish 5 枚に培養したヒト培養細胞を PBS で洗浄した後回収し、遠心後に上清を除いた。細胞量の 2 倍量の hypotonic buffer (10 mM HEPES / 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> / 10

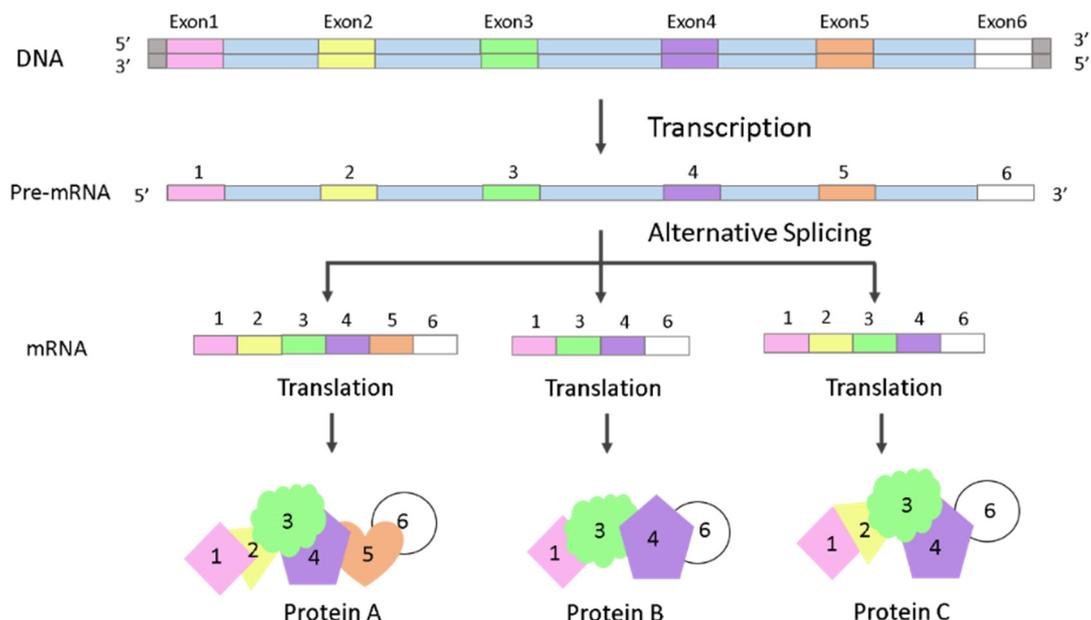


Figure 1. Diagram of alternative splicing

mM KCl / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT) で洗浄し、buffer 置換をおこない、氷上で 10 分間おくことで細胞を膨張させた。次にホモジナイザー (WHEATON 社) を用いてホモジナイズして遠心し、上清を細胞質抽出物として回収した。沈殿物を半量の low salt buffer (20 mM HEPES / 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> / 1.4 M KCl / 0.2 mM EDTA / 25% Glycerol / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT) をゆっくりと添加し、更に 4°C で 30 分攪拌した。この溶液を 14,000 rpm で 15 分間遠心し、得られた上清を核抽出物として回収した。また残りのペレットをソニケーションにかけ、同様に遠心し、得られた上清も核抽出物に加えた。得られた核抽出物は、dialysis buffer (20 mM HEPES / 100 mM KCl / 0.2 mM EDTA / 20% Glycerol / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT) を用いて 4°C で 90 分を 2 回で攪拌し、透析を行った。以上の操作は全て氷上または 4°C で行った。

#### 2. 4 Western blotting 法

抽出したタンパク質は 10% SDS-PAGE gel で電気泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (ImmobilonTM-P) (Milipore 社) にセミドライ式ブロッキング装置 (Bio-Rad 社) を用いてブロッキングした。メンブレンを 5% スキムミルク / 0.1% Tween20 / PBS を用いて 1~2 時間ブロッキング後、0.1% Tween20 / PBS で軽くリンスし、0.1% / PBS で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。次にメンブレンを 0.1% Tween20 / PBS で 10 分 3 回洗浄し、0.1% Tween20 / PBS で希釈した HRP 融合二次抗体を常温で 1~3 時間反応させた。メンブレンを 0.1% Tween20 / PBS で 10 分 3 回洗浄した後、Immobilom Western (MILLIPOLE 社) を用いて化学発光させ、LAS-4000 mini (GE Healthcare 社) を用いて撮影した。

用いた抗体  $\alpha$ -CHERP ラビットポリクローナル抗体は名古屋大学 牧 正敏教授より分与して頂いた。

#### 2. 5 培養細胞からの total RNA 抽出法

培養細胞を回収し、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク社) を 1 ml 加え、ボルテックスミキサーで 2 分間攪拌後、5 分間室温に静置した。次に 200  $\mu$ l クロロホルムを加え転倒混和し、3 分間室温で静置した。次に室温、14,000 rpm、20 分間遠心して、上層 (水相) 700  $\mu$ l を収集した。等量の 2-プロパノールと 3 M NaOAc を 50  $\mu$ l 加え、転倒混和して室温で 10 分間静置した。15,000 rpm 4°C で 10 分間遠心し、上清を除いた。そこへ 75% エタノールを 1 ml 加え、ゆっく

りと攪拌し懸濁した。15,000 rpm 4°C で 6 分間遠心し、上清を除いた。完全に乾燥させ、RNA 用の water に 20 倍希釈した。その後 DNaseI 処理を行い、total RNA を抽出した。

#### 2. 6 リアルタイム PCR 法

調製した total RNA を鋳型として、後述の方法で cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートとして、Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) を使用してリアルタイム PCR を行った。解析は ABI Prism 7700 (Applied Biosystems 社) により行った。

#### 2. 7 Exon array 解析

U2OS 細胞を 24 時間培養後、各因子を siRNA でノックダウンした。ノックダウン後 48 時間で total RNA を抽出した。Nano drop によって total RNA の濃度を測定した。次いで、アガロースゲル電気泳動によって RNA の状態が良いサンプルを選んだ。その後の操作は三重大学生命科学研究支援センターの小林裕子博士に Exon array 解析を依頼した。RNA Integrity Number (RIN 値) が 8.5 以上のサンプルを選び、ラベル化、ハイブリダイゼーション、スキャン、数値化をおこなって頂いた。Exon array 解析には Sure Print G3 Human Exon マイクロアレイキット 4 $\times$ 180K G4832A (Agilent 社) を使用した。生データ (CEL file) を Gene Spring GX 13.0 (Agilent 社) を用いて解析した。

#### 2. 8 RT-PCR 法

抽出した total RNA を鋳型として、Rever Tra Ace (TOYOBO 社) を用いて逆転写 PCR を行った。プライマーには Ramdom9 (TOYOBO 社) を用いた。合成した cDNA を鋳型として、プライマーを用いて KOD plus (TOYOBO 社) もしくは KOD FX NEO (TOYOBO 社) により PCR を行い、評価した。

### 3. 研究結果

#### 3. 1 CHERP の特異的なノックダウンの確認

はじめに CHERP が RNAi によって特異的にノックダウンされているかを確認した。コントロールとして EGFP をノックダウンした細胞を用いた。ノックダウンした HeLa 細胞の抽出液中の CHERP を特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った (Figure 2)。CHERP がノックダウンされていることを確認したことから、siRNA を使用して CHERP の発現量を大きく減少させることができるとわかった。

### 3. 2 エキソンアレイ解析用サンプルの調整

次に RNA-FISH によって、CHERP ノックダウンで mRNA の核への蓄積が見られている細胞は U2OS であった。以後の解析に使用する細胞種を統一するため、エキソンアレイ解析では U2OS 細胞を用いて行うこととした。U2OS 細胞を用いてこれらの siRNA を使用してノックダウンを行い、48 時間後に細胞を回収し、total RNA 回収を行った。なお、昨年度の助成により行った LC-MS/MS 法による解析で CHERP は多くのスプライシング関連因子と相互作用していることが示唆された。U2snRNP 関連因子の数が多かったことから、CHERP は mRNA スプライシングの初期段階である 3'スプライス部位の認識に関わることが考えられる。そこで CHERP の他にも mRNA スプライシングに関連する U2AF65, UAP56, URH49 についても比較対象として解析を行った。

Total RNA を逆転写によって cDNA 化した。その後、リアルタイム PCR を行い、ノックダウン効率を調べた。その結果、10%程度までノックダウンできていることが確認でき

た (Table 1)。結果として、エキソンアレイに用いた3つの lot はノックダウン効率が全て約 10%程度となっており、効率よくノックダウンできていると考えられた。後述のエキソンアレイ解析の結果からも、それぞれの発現量が減少していることを実際に確認した。

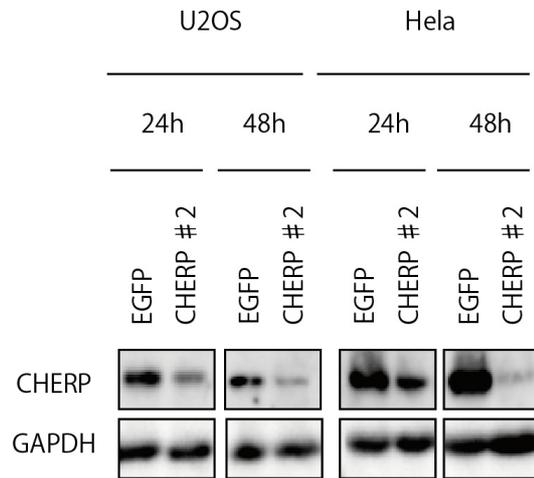


Figure 2. The depletion of CHERP by unique siRNA

Table1 CHERP mRNA expression is knocked down by siRNA

lot1	egfp	uap56	urh49	cherp	u2af65
pgk1	1	0.999496	1.002577	0.999406	1.000751
uap56	1	0.075146	1.481295		
urh49	1	1.612664	0.057728		
cherp	1			0.102949	
u2af65	1				0.082856

lot2	egfp	uap56	urh49	cherp	u2af65
pgk1	1	0.99937	0.999586	0.998992	0.99937
uap56	1	0.077676	1.751244		
urh49	1	1.659087	0.052525		
cherp	1			0.115643	
u2af65	1				0.051485

lot3	egfp	uap56	urh49	cherp	u2af65
pgk1	1	0.996575	1.001588	0.996766	0.996934
uap56	1	0.070749	2.095248		
urh49	1	1.512881	0.060672		
cherp	1			0.119728	
u2af65	1				0.080621

次に total RNA の完全度を調べることにより RNA の品質評価を行った。そのために RIN (RNA Integrity Number) 値で評価することとし、RIN 値が 8.5 以上のサンプルを選んだ (Table 2)。RIN 値は Agilent2100 バイオアナライザを用いて測定した。エクソンアレイ解析には RIN 値が 8.0 以上のサンプルが必要であるが、今回調製した RNA サンプルは全て基準を満たしていた。以上の結果より、今回の RNA の純度はアレイ解析に用いるサンプルとして適していると判断し、解析を進めた。

### 3. 3 CHERP ノックダウンによって発現量が大きく変動した遺伝子の GO term 解析

CHERP ノックダウンによって発現量が大きく変動した遺伝子についてどのような特徴があるか、GO term 解析を行った。CHERP ノックダウンによって 2 倍以上増加、減少した遺伝子の生物学的プロセスに分類される GO term を解析した。フィッシャー検定によって P 値 < 0.05 を有意であると定め、表に示した (Table 3 and 4)。

その結果、発現量が減少した遺伝子群は有糸分裂や減数分裂など細胞周期に関わる GO タームが多く見られた (Table 3 にセルを灰色に塗りつぶして示す)。その他、

DNA 修復に関わる遺伝子や腫瘍形成に関わる遺伝子が検出された。BP00203:Cell cycle の GO term の P 値が 3.00E-21 と非常に低いことから CHERP ノックダウンによって細胞周期に関与する遺伝子の発現が特異的に減少したことが分かる。

一方、発現量が増加した遺伝子群は、アポトーシス関連の GO term が最も P 値が低く、その他細胞の構造に関与する GO term が良く見られた。

### 3. 4 CHERP ノックダウンによって Splicing Index が大きく変動した遺伝子の GO term 解析

エクソンごとの発現量の変化に着目した。CHERP ノックダウンによって Splicing Index (SI) が大きく変動した遺伝子についてどのような特徴があるか、GO term 解析を行った。

はじめに  $SI > |2.0|$  の遺伝子の GO term 解析を行った。CHERP ノックダウンによって特定のエクソンの発現量が 4 倍以上変化した遺伝子の生物学的プロセスに分類される GO term を解析した。フィッシャー検定によって P 値 < 0.05 を有意であると定め、表に示した (Table 5)。

Table 2 RIN value for each total RNA sample

		concentration(ng/μl)	RIN value	28S/18S
EGFP KD	lot1	446	8.8	1.8
	lot2	214	8.7	1.9
	lot3	248	9	2.1
CHERP KD	lot1	452	8.8	1.8
	lot2	306	8.5	1.6
	lot3	308	9	2.2
U2AF65 KD	lot1	438	9	1.7
	lot2	388	9	1.8
	lot3	376	9.1	2.2
UAP56 KD	lot1	458	8.9	1.7
	lot2	46	9	1.8
	lot3	372	8.8	1.6
URH49 KD	lot1	446	8.8	1.8
	lot2	402	8.8	1.8
	lot3	414	8.7	1.8

**Table 3** GO term analysis which is decreased more than 2 fold when CHERP was knocked down

ID	Term	P-value
BP00203	Cell cycle	3.00E-21
BP00034	DNA metabolism	1.20E-10
BP00035	DNA replication	2.30E-10
BP00282	Mitosis	1.30E-09
BP00031	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	5.30E-08
BP00273	Chromatin packaging and remodeling	3.00E-05
BP00206	Chromosome segregation	6.00E-05
BP00207	Cell cycle control	6.50E-05
BP00036	DNA repair	6.90E-04
BP00204	Cytokinesis	7.80E-03
BP00224	Cell proliferation and differentiation	1.60E-02
BP00281	Oncogenesis	2.50E-02
BP00195	Meiosis	4.60E-02

**Table 4** GO term analysis which is increased more than 2 fold when CHERP was knocked down

ID	Term	P-value
BP00253	Induction of apoptosis	3.50E-03
BP00120	Cell adhesion-mediated signaling	1.10E-02
BP00285	Cell structure and motility	1.40E-02
BP00107	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	2.30E-02
BP00292	Other carbon metabolism	3.20E-02
BP00145:	Small molecule transport	3.70E-02
BP00286:	Cell structure	3.90E-02
BP00289	Other metabolism	4.10E-02

#### 4. 考 察

遺伝子レベルの解析とエクソンレベルの解析において、細胞周期関連の GO タームが上位に見られた (Table 3)。一概に細胞周期と言っても、細胞周期制御のメカニズムは複雑であり、数多くの様々なタンパク質が関与している。また“cell cycle”, “mitosis”, “cell division”などの GO タームはいずれも大意であり、様々な意味を含む。よって細胞周期にどのように関与する遺伝子が含まれているのかを調べるために細胞周期関連遺伝子のみを GO term 解析にかけた。遺伝子レベルとエクソンレベル共に発現量が変化していた細胞周期関連の遺伝子は、有糸分裂の M

期に関わる GO タームが上位を占めた。CHERP ノックダウンにより細胞分裂に何らかの異常が起きていることが考えられる。CHERP は mRNA スプライシングに関与する因子であり、間期で働く因子であるが、細胞周期に関わる遺伝子の発現を制御することを通して M 期での機能を調節している可能性が考えられた。

現在、CHERP ノックダウン時の細胞周期への影響をフローサイトメトリーにて解析中である。CHERP ノックダウンによる細胞周期への影響が見られる場合、その原因を探索していきたいと考えている。

**Table 5** GO term analysis : GO term which is SI > | 2.0 | when CHERP was knocked down

ID	Term	P-value
GO:0001539	Ciliary or flagellar motility	2.00E-04
GO:0001568	Blood vessel development	4.70E-03
GO:0001944	Vasculature development	5.40E-03
GO:0007420	Brain development	1.10E-02
GO:0030334	Regulation of cell migration	1.40E-02
GO:0045765	Regulation of angiogenesis	1.60E-02
GO:0048699	Generation of neurons	2.00E-02
GO:0030856	Regulation of epithelial cell differentiation	2.50E-02
GO:0021932	Hindbrain radial glia guided cell migration	2.50E-02
GO:0022008	Neurogenesis	3.10E-02
GO:0045601	Regulation of endothelial cell differentiation	3.30E-02
GO:0006464	Protein modification process	3.50E-02
GO:0016310	Phosphorylation	3.70E-02
GO:0030900	Forebrain development	4.00E-02
GO:0006865	Amino acid transport	4.10E-02
GO:0021535	Cell migration in hindbrain	4.20E-02
GO:0051260	Protein homooligomerization	4.70E-02

## 5. 文献

- Nishida A et al. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun.* 2011;2:308
- Yamazaki, T. et al. The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol. Biol. Cell.* 2010: 21, 2953-2965
- Okamura, M, Inose, H. and Masuda, S. RNA export pathways in eukaryotes. *Genes*, 2015: 6, 125-149,
- Inose, H., Mukai, K., Ito, M. and Masuda, S. Gene Regulation through mRNA Expression. *Adv. Biol. Chem.*, 2015: 5, 45-57,
- O'Rourke FA1, LaPlante JM, Feinstein MB. Antisense-mediated loss of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP; ERPROT213-21) impairs Ca<sup>2+</sup> mobilization, nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and cell proliferation in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J.* 2003, 373: 133-143.
- Lin-Moshier Y.et al. Re-evaluation of the role of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) in cellular calcium signaling. *J Biol Chem.* 2013, 288: 355-367
- Sasaki-Osugi K. et al. Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca<sup>2+</sup> homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca<sup>2+</sup>-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA. *J Biol Chem.* 2013, 288: 33361-33375

## Analysis of Alternative Splicing Regulated by Ca<sup>2+</sup> Signaling

Seiji Masuda

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

### Summary

Alternative mRNA splicing is a fundamental mechanism to produce plenty of protein more than those encoded in its genome. Alternative splicing increases as living organism becomes higher. The understanding of alternative splicing will make us to develop the therapy strategy for diseases based on the inadequate miss-splicing.

CHERP is first identified as Ca<sup>2+</sup> signaling related protein in the endoplasmic reticulum. Then, CHERP is also localized in the nucleus, suggesting CHERP has another function in the nucleus. Here, I examined the CHERP regulating genes and alternative splicing. CHERP expression was efficiently knocked down by specific siRNA recognizing 3' UTR of CHERP mRNA. To analyze the genome wide expression change of each mRNA and exon, we performed the exon array analysis. In the absence of CHERP by the siRNA mediated knock-down, the expression of genes and exons were greatly altered. To know the function of CHERP, GO term analysis was performed. It was indicated that the depletion of CHERP caused the decreased expression of cell cycle, mitosis, cytokinesis, meiosis, DNA repair, DNA replication, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism GO term and increased the induction of apoptosis GO term, suggesting that CHERP has a role for cell proliferation and survival. The mechanism of the regulation of gene expression by CHERP is under the investigation.