

新規遺伝子モジュレーター—環状 RNA の未知の核外輸送経路に 迫る

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヨシモト レイ 芳本 玲
所属等	藤田医科大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究部門 助教
プロフィール	長崎県出身。京都大学薬学部卒業、京都大学理学研究科修了（理学博士）。大学院時代から一貫してスプライシング反応の副産物である、まるい構造を持つ RNA の研究を行っています。

1. 研究の概要

私たちは世界に先駆けて機能性 circRNA である ciRS-7 の生合成機構を解明した。その経験を最大限生かして、本研究提案では circRNA 核外輸送経路を解明することを目的とする。

1) 未知の circRNA 核外輸送アダプター因子の探索：

RNA クロスリンク-免疫沈降法(ChIRP-MS)によって circRNA 結合タンパク質候補データベースから siRNA ノックダウン細胞と核・細胞質分画した RT-PCR によって、核外輸送アダプター因子の探索を行う。

2) 逆位スプライシングと共役した核外輸送アダプター因子のリクルート機構の解明：

In vitro スプライシング法を確立し、スプライシング反応を各段階で粗精製し、どの段階でアダプター因子が呼び込まれるかの解析を行う。

これらの手法はすでにこれまでの研究で確立しており、成果の実現性は高いと考える。

2. 研究の動機、目的

① どのような動機か：国内外における研究動向および位置づけ

コーディング RNA から機能のあるノンコーディング RNA が作られる、しかもその構造は完全な環状である。 高速シーケンサーによる大規模解析によって、ヒトで数千種の環状 RNA(circRNA)が組織・発生段階特異的に発現している事がわかり、アルツハイマー病、ALS(筋萎縮性側索硬化症)といった神経変性疾患、癌、アテローム性動脈硬化症において circRNA とこれら疾患との関係が相次いで報告されている。さらに circRNA の一種 ciRS-7(CDR1as)は、miRNA(miR-7)の吸着剤として働き、miR-7 の遺伝子発現抑制機能を調節しているという。したがって circRNA は新たな機能性ノンコーディング RNA として注目されているが、その生合成機構には不明な点が多い。そこで私たちは世界に先駆けて最初に機能が判明した ciRS-7 をモデルに、生合成機構を解明した。

② どのような問題意識か：これまでの研究成果と着想に至った経緯

1) ciRS-7 は MIR という哺乳類によく保存された反復配列 (SINE) 依存的に産生される

ciRS-7 を発現するヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) 細胞を用いたアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) 阻害実験から、ciRS-7 イントロン内に環状化に必要なシスエレメントの存在が示唆された。バイオインフォマティクス解析とレポーター実験により、MIR と呼ばれる繰り返し配列 (SINE) がスプライシングによる環状化を促進することをあきらかにした。さらに RNA-Seq データ解析から MIR 依存的に産生される circRNA を多数見出し、MIR 依存的な環状化には普遍性があることを示した (Yoshimoto et al., BioRxiv 2019)。

2) circRNA は核から細胞質へ能動的に輸送される

核・細胞質に分画し RNA-Seq を行い、circRNA の多くが細胞質に局在することを見出した。しかしそれらが細胞核から能動的に輸送されているのか、あるいは M 期の核膜崩壊時に受動的に拡散しているのか不明であった。アフリカツメガエル卵母細胞へのプラスミド DNA 注入実験を用いて circRNA の動態を調べた結果、転写後にスプライシング反応によって環状化された circRNA が核から細胞質へ能動的に輸送されることを明らかにした。さらに circRNA の輸送は mRNA 核外輸送因子 TAP に依存していることが競合阻害実験により示された。circRNA には末端構造がないため、未知の circRNA 側の TAP のアダプター因子の存在が予想される。

3. 研究の結果

circRNA の細胞質局在機構を調べるために、アフリカツメガエル卵母細胞へのプラスミド DNA 注入実験を用いて circRNA の動態を調べた。その結果、転写、スプライシングされた circRNA が核から細胞質へ積極的に輸送されること、輸送はレトロウイルスの核外輸送配列 CTE で競合阻害されることから mRNA 型であることが判明した。次に mRNA 型輸送アダプター因子と circRNA の相互作用を HEK293 細胞の CLIP (crosslink and immunoprecipitation) 実験によって検証したところ circRNA には EJC、TREX の両方が結合していた。そこで EJC、TREX の構成因子のノックダウン実験を行ったところ EJC のノックダウンでは ciRS-7 の輸送は阻害されなかったのに対し、TREX のノックダウンでは ciRS-7 の輸送が阻害されたことから TREX が circRNA 輸送のアダプターであることが示唆された。次に TREX の circRNA へのリクルート過程を詳細に調べる目的で直鎖状 RNA 前駆体と HeLa 核抽出液を用いた *in vitro* 逆位スプライシング反応系を立ち上げた。CLIP 実験の結果と同様に circRNA に EJC、TREX の両方が結合していることを確認した。興味深いことに TREX のリクルートは宿主遺伝子の末端構造と逆位スプライシングに依存している。

4. これからの展望

研究を進める上で mRNA 型の輸送に非依存の circRNA も多数見出した。この違いを追い求める予定である。

5. 社会に対するメッセージ

研究を行うにはどうしてもお金（研究費）が必要です。研究費を得るには時間と労力を割いて書類を書かねばなりません。しかし時間と労力割いても獲得できないことが多々あります。その分研究費を獲得できたときの喜びは格別です。また、審査はプロの研究者が行うことから、研究費獲得に成功することは、自分の研究が認められることでもあります。

やりたいことがあるのに研究費がないという辛いときに手を差し伸べていただいたおかげで、研究を続けることができ、さらに翌年度の科研費取得にもつながりました。今回若手研究者奨励金に選んでいただきありがとうございました。