

スプライシング変異抑制効果を有する生薬由来成分の探索

(申請代表者)	米田 宏	北海道大学大学院薬学研究院	講師
(共同研究者)	富田健司	北海道大学	学生
(共同研究者)	千葉政徳	北海道大学	学生

研究背景

[スプライソソームとその動作機構]

pre-mRNA スプライシングを担うスプライソソームは100種以上のタンパク質を含む巨大複合体であり、5種類のサブユニットから構成される。各サブユニットは5種の核内低分子RNA (snRNA) と、それに特異的に結合するタンパク質からなり、それぞれU1、U2、U4、U5、U6 snRNP (スナールプ) と呼ばれる。スプライソソームはイントロン中の3ヶ所のスプライス部位配列(ブランチ部位も含む)をsnRNPが認識し、集合と解離を繰り返しながら2段階で反応を進行させる¹。この2段階の反応は実際にはどちらの方向にも進行可能であるが、反応の前後でスプライソソームの活性化状態と不活性化状態が切り替わることで反応の方向が規定される。この活性化・不活性化状態に対応する構造はスプライス部位とsnRNAやsnRNP構成タンパク質間の相互作用により維持され、その相互作用が適切なタイミングで切り替わることが反応が進むために必要である。近年、この動作機構が基質配列中のスプライス部位認識の正確性を維持するためにも働くことが明らかとなった²。すなわち、コンセンサスから外れたスプライス部位を取り込んだ場合には、反応の進行より先に不活性化状態への変換が起こり、スプライシングが進行しない。一方、スプライソソーム構成因子に活性化状態を安定化する変異があると、コンセンサスから外れたスプライス部位でも反応が進行し、またそのような状況でも正常配列のスプライシングは影響されない。

[遺伝性疾患原因変異におけるスプライシング異常の位置づけ]

遺伝性疾患の原因変異はアミノ酸置換変異やプロモーター変異など様々であるが、全体の10%以上がスプライシング異常を引き起こす変異であるとされている。このスプライシング異常を引き起こす変異をさらに詳しく分類すると、スプライス部位配列であるイントロン5'末端のドナー部位と3'末端のアクセプター部位の各3塩基ずつに約半分の変異が存在する。残りの半分はそれ以外の部位にあり、変異の周辺エクソンの選択的スプライシングに影響するものが多く、変異がスプライシングに影響する機構は遺伝子ごとに異なる。これに対し、前述のスプライス部位変異についてはスプライソソームがスプライシングを行う際に必ず認識する配列であり、その影響は遺伝子ごとの違いは小さいと考えられる。そのため、スプライス部位変異の存在下で本来のスプライシングを誘導する薬剤があれば、原因遺伝子や疾患の種類によらず遺伝性疾患を治療する可能性が予想される。

研究目的

本研究ではスプライス部位変異により異常となったスプライシングを正常型へ回復させる生薬由来成分、生薬エキスを取得することを目的とする。本研究の探索手法の特色として、一般的なスプライシング関連化合物の探索手法であるスプライシングを指標としたアッセイではなく、スプライソソームの動作機構の理解に基づき、snRNP量変化を指標としたアッセイで陽性化合物を取得することで、スプライソソームを直接標的とする化合物の効率的な同定を試みる点が挙げられる。

アッセイ系の概要

これまでに、上記の仮説に基づき、スプライソソームに直接作用してその正確性を制御できる化合物が得られるような、大規模な化合物スクリーニングに適した実験系の開発を行って来た。スプライシングの調節化合物はこれまでにそれなりの数が知られているが、そのうち、細胞レベルで活性を持ち、スプライソソームを直接の標的と

している化合物はわずかである。その大きな原因として、化合物の探索系に特定のスプライシングが起こる事を指標とした実験系を利用していることが挙げられる。特定の遺伝子のスプライシングを指標にすると、その遺伝子のスプライシングに限定して働く特異的な因子を標的とする化合物が得られることが多く、スプライソームに直接作用するものだけに絞込むことができない。そのため、遺伝子の種類によらずスプライス部位変異を許容させるような化合物を得るには、特定の遺伝子をモデルとした化合物探索は適していない。

そこで我々はスプライソームそのものの変化を指標としたアッセイ系を構築した。スプライソームの構成因子には100種以上のタンパク質が知られているが、そのうち各snRNPの核となる因子群(コア因子と呼ぶ)は各snRNPに5個程度である。このコア因子同士もスプライソームの構造変換に伴って大きく相互作用ネットワークを変化させることが知られており、このコア因子間の相互作用量を検出することで、その相互作用が起こる特定段階のスプライソーム量の指標となると考えた。

相互作用を検出する手法にはスプリットルシフェラーゼを用いた。ルシフェラーゼ遺伝子をN末、C末側に分離して相互作用する二分子に融合させると、その融合させた二分子の相互作用により近接したルシフェラーゼ断片同士が酵素活性を再構成する。そこに基質を添加すると発光が起こり、相互作用量を検出できる。これがスプリットルシフェラーゼである³。

本来はこの実験系は直接相互作用する二分子間の結合検出系として報告されていたが、我々はレポーターライブラリーの構築とスクリーニングにより、ルシフェラーゼ融合遺伝子ペアがsnRNP複合体上でのみ間接的に相互作用して酵素活性を再構成する遺伝子ペアを複数発見した。このレポーター遺伝子ペアの安定発現細胞株を作成し、その発光量が特定のsnRNP量と相関する事を報告している⁴。このアッセイ系を化合物探索に供することとした。これにより得られた化合物はsnRNP量を変化させると考えられ、その作用機序にはスプライソームに直接作用し、スプライシング反応の構造変換効率に影響する化合物も含まれると予想した。この構造変換効率を変化させる化合物には前述の機構に基づき、スプライシングの基質正確性を変化させる可能性が期待される。

結果と考察

[アッセイ概要とデータの評価方法]

今回使用したsnRNP検出系にはU5 snRNP因子であるPRPF6とU5-40Kの間接的な相互作用に基づいたU5 snRNP量検出系を使用した。この実験系では、PRPF6にルシフェラーゼのN末端部位を連結した融合遺伝子とU5-40KにルシフェラーゼのC末端部位を連結した融合遺伝子の2つの遺伝子を安定発現させた293T細胞をレポーター細胞として使用した。実験は96穴プレートを用い、各試験サンプルに対して3連で実験を行った。また、このレポーターでは化合物添加後のU5 snRNP量の変動を増減どちらも検出することができる。そのため、生薬由来化合物については化合物添加時と同濃度(0.5%)のDMSO処理サンプルを対照群として、生薬エキスについてはエキス添加量と等量の純水を加えたサンプルを対照群とし、対照群を100%としたときの各サンプルの値を示した。

また、96穴プレートでの手動アッセイの短所として、同じ試料であっても列内で中央に近いほど値が高くなり、上下端のウェルでは値が低くなる系統誤差が見られた。そのため、列ごとにデータが山型となり、前後のウェルの数値との比較で著しく変化するもの以外はそのままの値では評価が難しくなっていた。そこで、各列の平均値を求め、その平均値で各値を除いた後、その値を異なるプレートの同列で比較し、その中央の2点の値でさらに各値を除いた。この方法により、データは平坦化し、試料の効果も比較しやすくなった。その結果もデータ中に示している。

[細胞変性について]

比較的高濃度で試料化合物を処理したため、一部の試料処理では細胞変性が見られた。4時間と短時間の処理であったため、細胞が完全に死滅する様子はどの化合物でも見られなかったが、一部の化合物では細胞が丸くなり、もう数時間処理を続けた場合には細胞が剥がれると予想される状況であった。またそのために回収できる細胞量にも差が出る可能性を考えたが、細胞の円型化が見られたウェルであってもレポーターの値に変

化が無い場合もあり、細胞の形態が単純に常にアッセイに影響を及ぼす可能性は低く、形態の変化は記録しつつ、アッセイは最後まで実施した。

[各陽性化合物についての考察]

最終的に陽性と判断した化合物が11種、エキスが1種得られた。データの判定に当たっては、まず、生データのグラフで山型の並びから大きく外れているものを陽性とし、さらに、平坦化したデータで20%以上変化していたものについて、再度生データを確認し、陽性と考えても良さそうなものを選択した。Swertiamarinについては、平坦化した場合に40%の増加が見られるが、生データではあまり変化が顕著でないため、注意が必要である。また、Luteolinに関しては平坦化したデータでは変化が見られないが、これは比較した他のウェルも値がぶれているために、結果的にLuteolinの効果がマスクされているためであり、生データの変動具合を見ると、はっきり陽性と判断できる。このように、データ解釈、陽性判定には流動的な部分が含まれるのは今回のスクリーニングの注意点、今後改善すべき点であると考えられる。再現性試験、その他のレポーター遺伝子セットでの検討、スプライシングへの関与など、複数の視点から再度検討して真の陽性を絞り込むことが望ましい。

エキスについてはレポーター活性の減弱が見られたのはオウレンであり、その主要な成分として知られるBerberineが同じくレポーター活性を減弱させる化合物として得られていることから、その作用がBerberineによるものであるなら化合物の結果と相関したことになる。このことは陽性化合物が存在すれば、単品・エキスとその状態に依らずにこのレポーターアッセイが陽性化合物として取得できることを示している。

レポーター活性を増加させる化合物のうち、Luteolinは昨年hnRNPA2との結合が報告されたフラボノイドであり⁵、今回見られたU5 snRNPレポーターへの作用がどのような機構で起こるかは興味深い。

BerberineとShikoninについてもスプライシングへの影響が報告されており^{6,7}、その作用と今回見られたsnRNPへの作用の関わりに興味が持たれる。とくにShikoninは類似の化合物であるAlkanninでもほぼ同じ強度の作用が見られたことから、細胞が変性して丸くなる様子も見られたものの、アッセイ結果の再現性は高く、低濃度で作用させた場合のスプライソソームへの影響を検討したい。また、これまでに既知のスプライシング阻害剤としてNSC663284のようなキノン系の化合物が報告されていることから⁸、今回見られたShikoninの作用とNSC663284のような化合物との作用の類似性があるかも今後の課題である。

Bufalin, Bufotalin, Cinobufagin, Cinobufotalinについては強心配糖体群にすでに選択的スプライシングの調節活性が報告されている⁹。しかし、過去の強心配糖体とスプライシング阻害を報告した論文と我々の実験系では化合物探索に用いた検出系が全く異なり、選択的スプライシングの調節に関わる機構と今回のsnRNP量変動がどのように関係するかは不明である。今回、ライブラリ中のこの4種のよく似た化合物がほぼ同様の値の変化を示したことは、レポーターアッセイに影響する擬陽性の可能性もあるが、作用自体は確かであることを示唆しており今後の解析対象として興味深い。

この他の化合物はいずれもスプライシングとの関係性はこれまで知られていなかった化合物ばかりである。DehydrocostuslactoneはShikonin同様、細胞が丸くなり変性して死滅する寸前の様子に見えたことから、今後低濃度で作用させることで、細胞変性による間接的なレポーターへの影響であった可能性を排除できるか検討したい。

結論

今回の結果をまとめると、これまでに我々のグループが行った大規模な化合物探索と比較して、陽性化合物のヒット率が非常に高かった。当然、詳しく検討すればレポーターアッセイに伴う擬陽性も明らかになると思われるが、生薬成分がそもそも生体への作用を有することを考えると、スプライシングという真核細胞に共通の遺伝子発現機構が生薬成分の標的となっている様々な経路の影響を受けることを今回の結果は示している可能性がある。今後、スプライソソームの構成因子を直接標的とする真の陽性化合物の絞り込みと、本来の目的である変異により異常となったスプライシングの回復への効果を調べることで、生薬由来成分によるスプライシング制御とその治療への応用の可能性を示していきたいと考えている。

引用文献

1. Staley J. P. and Guthrie C. *Cell* (1998) 92:315-326.
2. Mayas R. M., Maita H., Staley J. P. (2006) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:482-490.
3. Ozawa T., Kaihara A., Sato M., Tachihara K. and Umezawa Y. (2001) *Anal. Chem.* 73:2516-21.
4. Maita H., Tomita K. and Ariga H. (2014) *Anal. Biochem.* 452:1-9.
5. Arango D., Morohashi K., Yilmaz A., Kuramochi K., Parihar A., Brahimaj B., Grotewold E. and Doseff A. I. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110:E2153-62.
6. Li H., Chen W., Zhou Y., Abidi P., Sharpe O., Robinson W. H., Kraemer F. B. and Liu J. (2009) *J. Lipid Res.* 50:820-31.
7. Chiu S. C., Yang N. S. (2007) *Mol. Pharmacol.* 71:1640-5.
8. Berg M. G., Wan L., Younis I., Diem M. D., Soo M., Wang C. and Dreyfuss G. (2012) *Mol. Cell. Biol.* 32:1271-83.
9. Stoilov P., Lin C. H., Damoiseaux R., Nikolic J. and Black D. L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:11218-23.