

エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法構築と
遺伝性疾患治療薬開発への応用研究

2017

衛生化学

寶田 徹

目 次

目 次	i
略語表	iv
序 論	1
本 論	5
第 1 章 インスリン受容体 (IR) の選択的スプライシング	5
第 1 節 細胞内在性 IR の選択的スプライシング	6
第 1 項 実験試薬および実験方法	7
第 2 項 実験結果	11
1. HeLa 細胞における IR の選択的スプライシング様式の確認	11
2. 転写産物の塩基配列の決定	11
3. PCR サイクル数の設定	12
第 2 節 IR の選択的スプライシングを操作する低分子化合物の探索	13
第 1 項 実験試薬および実験方法	14
第 2 項 実験結果	16
1. 候補低分子化合物の IR の選択的スプライシングへの影響	16
2. RES が有するスプライシング調節作用の経時変化の検討	17
3. RES の細胞培養液中への添加濃度の検討	19
第 3 節 細胞種による RES のスプライシング調節作用	20
第 1 項 実験試薬および実験方法	20
第 2 項 実験結果	22
1. ヒト由来細胞株と IR エクソン 11 の選択的スプライシング	22
2. RES のスプライシング調節作用と細胞種	23
第 4 節 DM1 患者由来細胞のスプライシング異常修正	24
第 1 項 実験試薬および実験方法	24
第 2 項 実験結果	26
1. DM1 患者由来細胞の IR エクソン 11 スプライシング異常	26
2. RES による患者由来細胞のスプライシング異常修正	28
第 5 節 考察	29
第 6 節 小括	32

第2章 RES のスプライシング調節作用の検討-----	33
第1節 RES の代表的シグナル経路と IR スプライシング-----	34
第1項 実験試薬および実験方法-----	35
第2項 実験結果-----	36
1. SIRT1 活性化経路と IR エクソン 11 スプライシング-----	36
2. AMPK 活性化経路と IR エクソン 11 スプライシング-----	37
第2節 MBNL1 のノックダウンと IR スプライシング-----	38
第1項 実験試薬および実験方法-----	39
第2項 実験結果-----	41
1. MBNL1 ノックダウン時の RES のスプライシング調節作用-----	41
2. RES のスプライシング調節作用への新規蛋白質合成の関与-----	42
第3節 インترون 10 配列への CUGBP1 の結合と RES の阻害作用-----	43
第1項 実験試薬および実験方法-----	44
第2項 実験結果-----	47
1. IR エクソン 11 領域と CUGBP1-----	47
2. CUGBP1 と IR エクソン 11 上流配列との相互作用-----	48
3. RES の CUGBP1 結合阻害作用の検証-----	49
第4節 考察-----	50
第5節 小括-----	53
第3章 スプライシング制御因子の同定法の構築とその応用-----	55
第1節 質量分析装置を用いた蛋白質同定法の条件検討-----	61
第1項 実験試薬および実験方法-----	61
第2項 実験結果-----	63
1. BSA を利用した蛋白質同定法の条件検討-----	63
第2節 <i>In vitro</i> binding 反応と RNA-Electrophoretic mobility shift assay -----	66
第1項 実験試薬および実験方法-----	66
第2項 実験結果-----	68
1. RNA プローブの設計-----	68
2. <i>In vitro</i> binding 反応と複合体の分離-----	69
第3節 質量分析法を利用したスプライシング制御因子の同定-----	70
第1項 実験試薬および実験方法-----	70
第2項 実験結果-----	72
1. RNA-蛋白質複合体の解析-----	72

2. RNA 結合ドメインを有する蛋白質の抽出-----	73
第4節 hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合様式の確認-----	76
第1項 実験試薬および実験方法-----	77
第2項 実験結果-----	78
1. 光架橋形成を行った複合体の分離と質量分析法による蛋白質同定--	78
2. 質量分析法を用いた hnRNPA1 の同定-----	79
3. Western blot 法での hnRNPA1 の結合確認-----	86
第5節 低分子化合物を用いた hnRNPA1-RNA 複合体形成阻害-----	87
第1項 実験試薬および実験方法-----	87
第2項 実験結果-----	89
1. hnRNPA1 の RNA への結合を阻害する低分子化合物の探索-----	89
2. QC の濃度依存的阻害作用-----	90
第6節 QC 添加と細胞内在性 IR スプライシング様式の変化-----	91
第1項 実験試薬および実験方法-----	91
第2項 実験結果-----	93
1. QC の IR エクソン 11 認識促進作用の検討-----	93
第7節 考察-----	94
第8節 小括-----	97
総括-----	99
謝辞-----	101
参考文献-----	102

略語表

3-NP	: 3-nitropropionic acid
6-FAM	: 6-carboxy fluorescein amidite
A	: adenine
AICAR	: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AMP	: adenosine monophosphate
AMPK	: AMP-activated protein kinase
AO	: antisense oligonucleotide
APCI	: atmospheric pressure chemical ionization
ATP	: adenosine triphosphate
BSA	: bovine serum albumin
C	: cytosine
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
cDNA	: complementary DNA
CHX	: cycloheximide
CI	: chemical ionization
CID	: collision induced dissociation
CSD	: cold shock domain
CUGBP1	: CUG binding protein 1
DM1	: myotonic dystrophy type 1
D-MEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMPK	: dystrophin myotonia protein kinase
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DNA	: deoxyribonucleic acid
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
EGCG	: epigallocatechin gallate
EI	: electron ionization
EIC	: extracted ion chromatogram
EMSA	: electrophoretic mobility shift assay
ESE	: exonic splicing enhancer

ESI	: electrospray ionization
ESS	: exonic splicing silencer
FAB	: fast atom bombardment
FBS	: fetal bovine serum
FDR	: false discovery rate
G	: guanine
GAPDH	: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HNE	: HeLa nuclear extract
hnRNP	: heterogenous nuclear ribonucleoprotein
hnRNPA1	: heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1
HPLC	: high performance liquid chromatography
HRP	: horseradish peroxidase
HU	: hydroxyurea
IAA	: iodoacetoamide
IP	: indoprofen
IR	: insulin receptor
IR-A	: insulin receptor isoform A
IR-B	: insulin receptor isoform B
ISE	: intronic splicing enhancer
ISS	: intronic splicing silencer
KH	: k-homology
KR	: kinetin reboside
LB	: luria-bertani
LC	: liquid chromatography
MALDI	: matrix-assisted laser desorption/ionization
MBNL1	: muscleblind-like 1
MQ	: milli-Q
mRNA	: messenger RNA
MS	: mass spectrometry
NAD	: nicotinamide adenine dinucleotide
PAGE	: polyacrylamide gel
PBS	: phosphate buffered saline

PCR	: polymerase chain reaction
PDE	: phosphodiesterase
PDN	: prednisolone
PKA	: protein kinase A
PKC	: protein kinase C
PMF	: peptide mass fingerprinting
PIMF	: product ion mass fingerprinting
pre-mRNA	: precursor mRNA
PTB	: polypyrimidine tract binding protein
PTT	: polypyrimidine tract
PVDF	: polyvinylidene difluoride
QC	: quercetin
RBD	: RNA binding domain
RES	: <i>trans</i> -resveratrol
RI	: radioisotope
RNA	: ribonucleic acid
RPLC	: reversed-phase liquid chromatography
RRM	: RNA recognition motif
RT	: reverse transcriptase
RT-PCR	: reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	: sodium dodecyl sulfate
siRNA	: small interfering rna
SIRT1	: sirtuin 1
SMN2	: survival motor neuron 2
snRNPs	: small nuclear ribonucleoproteins
SR	: serine/arginine
SRP	: SRPIN340
STACs	: sirtuin activating compounds
TEMED	: tetramethylethylenediamine
Tnpol	: transportin 1
U	: uracil
UV	: ultraviolet
VPA	: valproic acid

序 論

ヒトは「選択的スプライシング機構」を有しており、一つの遺伝子から多様な蛋白質を産生することができる。少なくとも遺伝子の約 70%は選択的スプライシングを受けることが知られており、複雑な形態や機能を実現する駆動力となっている¹⁾。スプライシング反応は主に RNA と蛋白質の巨大複合体であるスプライソソームの触媒反応によって進行する。スプライソソームは数種類の snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins)、及び 100 種類以上の補助蛋白質で構成される。これらのスプライソソーム構成因子が適切なエクソンとイントロンの境界部位を認識し、イントロンの除去とエクソンの連結が完了する。エクソンとイントロンの境界を決定する因子として、イントロンの 5'スプライス部位 (スプライシングドナー部位) および 3'スプライス部位 (スプライシングアクセプター部位) が知られている。これらのコンセンサス配列はそれぞれ GU および AG の 2 塩基配列が保存されている。選択的スプライシングを受けるエクソン前後のコンセンサス配列の保存性は低く、複数のスプライシングバリエーションの産生を可能にしている²⁾。それ以外のスプライス部位を決定する因子として「スプライシング制御因子」が知られている。スプライシング制御因子はスプライソソームの機能を補助し、精巧なスプライシング反応を実現する上で極めて重要な役割を担う³⁾。これらの制御因子は主に SR 蛋白質と hnRNP 蛋白質の二群に大別され、前者がスプライソソームのエクソン認識を促進させるのに対し、後者は抑制作用を有する (図 1)。これらの因子が pre-mRNA 上に存在する特定の配列に結合することで複雑なエクソン認識機構を実現している。

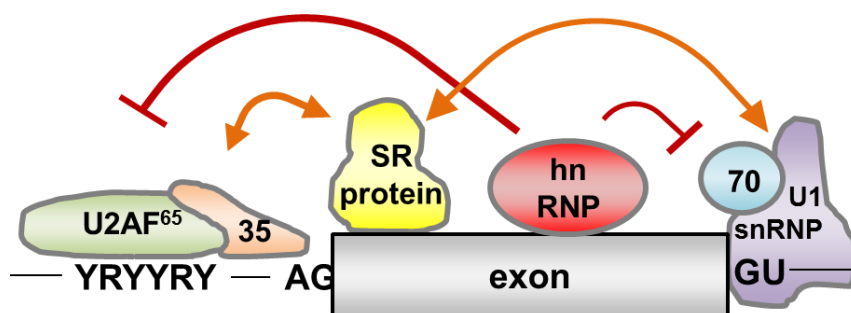


図 1 エクソン認識に関わるスプライシング制御因子の模式図

選択的スプライシングは組織や発生過程において特異的な様式を示す。最近ではその破綻が重篤な疾患を引き起こすことが報告されている。スプライシング異常を修正するための治療アプローチとして核酸医薬品である「アンチセンスオリゴヌクレオチド（antisense oligonucleotide; AO）」を用いた方法がある。AO によるスプライシング異常修正は幾つかの疾患を対象とする臨床試験が行われており、世界標準の治療法となりつつある。最も臨床応用に近づいている対象疾患は **Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）** と **脊髄性筋萎縮症（SMA）** である。両者はともに難治性疾患に分類され、治療法開発が待望されている。DMD を対象とした AO である「Eteplirsen」は 2016 年 9 月に FDA の承認を受けたが、未だデータに関する疑問点が残し、様々な議論が続いている。SMA 治療薬となる「Nusinersen」は 2016 年 12 月 12 日に本国においても製造販売承認申請が行われており、日本初のアンチセンス核酸医薬品になると考えられている。しかしながら、AO は合成費用が高額となるため、患者への経済的負担が大きくなることが問題視されている。

もう一つのスプライシング異常修正法として「低分子化合物」を用いる方法がある。Nishida⁴⁾らは DMD の原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物を発見している。AO と比較した場合の特異性の低さが課題とされているが、利便性やドラッグデリバリーの優位性などから、現在、その実用化が期待されている（図 2）。

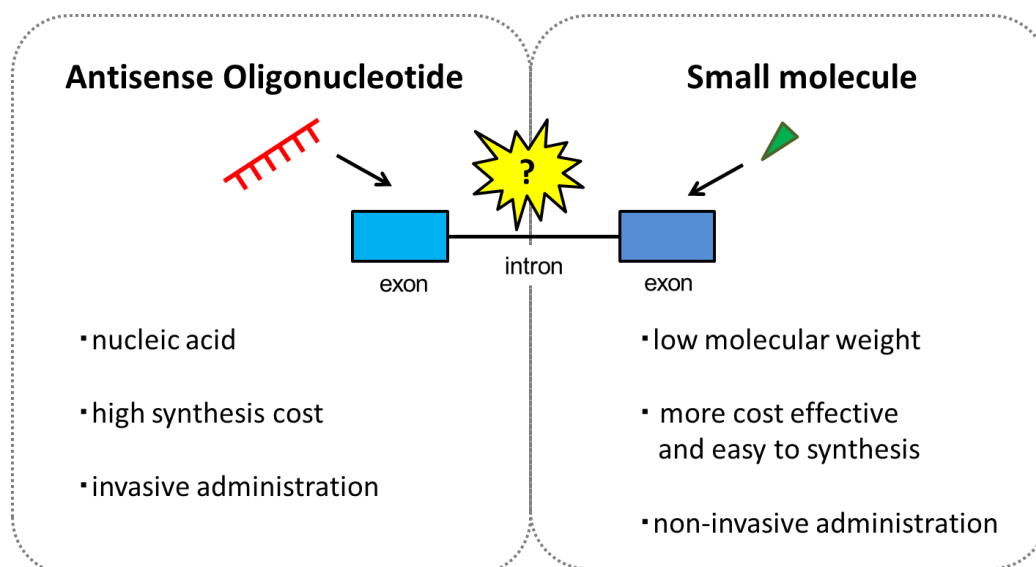


図 2 スプライシング異常修正を目的とした治療アプローチ

そこで本研究の第 1 章ではインスリンレセプター (Insulin receptor; IR) の選択的スプライシング異常に着目し、低分子化合物を用いた異常修正を試みた。最近、栄養物「nutrients」と医薬品「pharmaceuticals」を組み合わせた健康および医療効果をもつ食品「Nutraceuticals」が注目されている⁵⁾。そこで著者は簡単に摂取が可能な食品成分に注目し、スプライシング調節作用を検討した。そして、一つのポリフェノールに辿り着いた⁶⁾。

ポリフェノールは健康への有益な作用から、サプリメントとして市場に幅広く流通している。また、その多くは抗酸化作用だけでなく、細胞内シグナル経路に作用することで薬理作用を示すことが知られている⁷⁻⁹⁾。そこで第 2 章では見出した候補物質の代表的なシグナル経路と IR エクソン 11 における選択的スプライシングの関わりを評価した。そして IR のスプライシング異常を引き起こす原因とされる特定のスプライシング制御因子との関連について評価した。

スプライシング反応は多様な蛋白質が関わるため、新規治療薬の開発には汎用性の高い標的蛋白質同定法及びその解析法が必要となる。スプライシング異常を修正する低分子化合物はこれまでにいくつか報告されているが、その標的分子は不明なことが多い。そこで第 3 章では質量分析 (Mass spectrometry; MS) 法を用いたスプライシング制御因子同定法の構築を目指した。質量分析法は生体成分の網羅的解析を可能にする。その反面、一度の測定により膨大なデータが取得されるため、目的とした情報を得るための適切な前処理や分離法が必要となる。核酸分子と蛋白質の相互作用解析には古くから Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) が利用されてきた。EMSA 法は蛋白質と相互作用した核酸分子の分子量が増大し、電気泳動時に移動度が低下することを利用した方法である。本研究では *in vitro* で RNA-蛋白質複合体を形成させ、RNA-EMSA 法により、複合体分離を行った。そして結合した候補蛋白質の酵素消化物 (ペプチド断片) を高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) でカラム分離し、質量分析装置を用いた MS/MS 解析により結合蛋白質の同定を行った。図 3 に同定法の概略を示した。分子生物学的アプローチである RNA-EMSA 法と網羅的解析を行う質量分析法を組み合わせた手法により、IR エクソン 11 領域に結合するスプライシング制御因子を同定した。そしてエクソン認識に関わる制御因子の結合を阻害する低分子化合物を探索し、その細胞における IR エクソン 11 の選択的スプライシングへの影響を検証した。

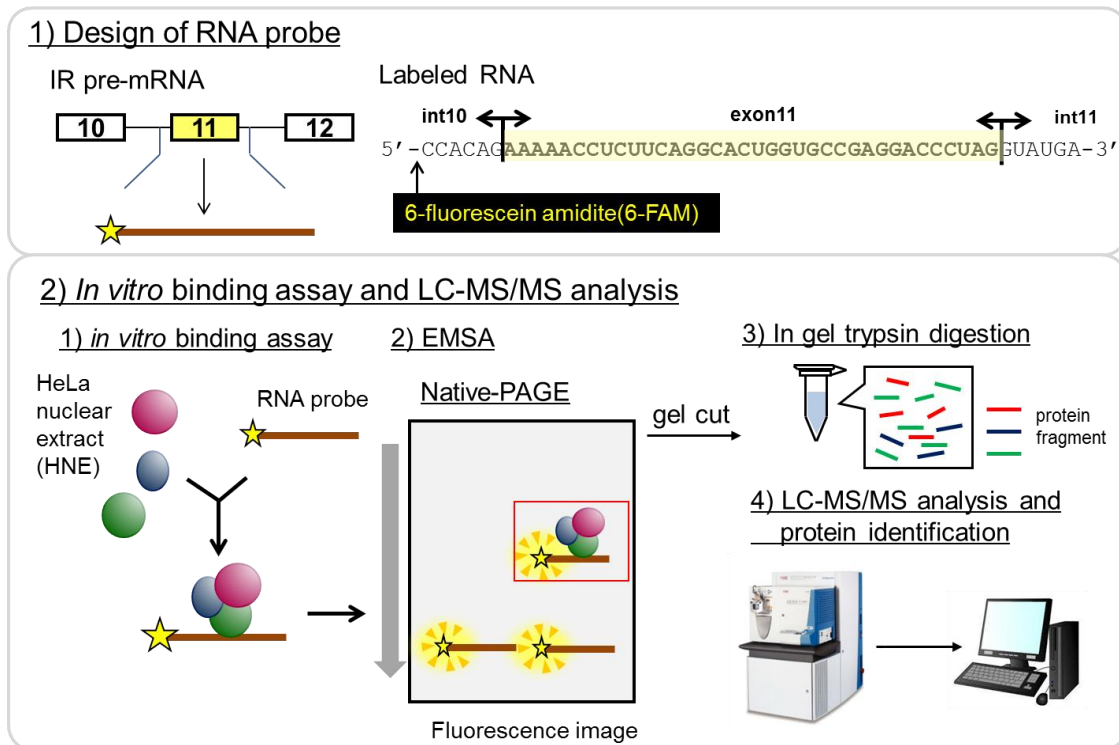


図3 スプライシング制御因子同定法の流れ

以上、エクソン認識を制御する RNA 結合蛋白質解析法の構築と遺伝性疾患治療薬開発への応用に関して研究を行い、多くの点について解明することができた。

以下に、インスリンレセプター (IR) の選択的スプライシング (第1章)、RES のスプライシング調節作用の検討 (第2章)、スプライシング制御因子の同定法の構築とその応用 (第3章) について詳細を論述する。

第1章 インスリンレセプター (IR) の選択的スプライシング

RNA スプライシングは遺伝情報を含まないイントロン配列を除去し、アミノ酸をコードするエクソン配列を連結する mRNA (messenger RNA) 成熟過程の1つである (図 1-1)。ヒトは遺伝子数よりもはるかに多い種類の蛋白質を産生する¹⁾。この多様性は複雑に制御された「選択的スプライシング反応」により実現される。このスプライシング反応の異常は種々の疾患発症を引き起こすことが報告されている¹⁰⁾。

筋緊張性ジストロフィーI型 (Myotonic dystrophy type 1; DM1) はミオトニアプロテインキナーゼ (Dystrophia myotonica protein kinase; DMPK) 遺伝子の3'非翻訳領域に存在する CTG 反復配列の異常延長を起因とするトリプレットリピート病である¹¹⁾。転写された変異 DMPK mRNA は、反復配列領域がステムループ構造を形成することで安定化し、核内に留まり続ける。スプライシング反応に関わる特定の蛋白質 (スプライシング制御因子) は、CUG 配列と親和性が高く、異常延長領域に結合することで細胞内分布異常を生じる¹²⁾。これは様々な遺伝

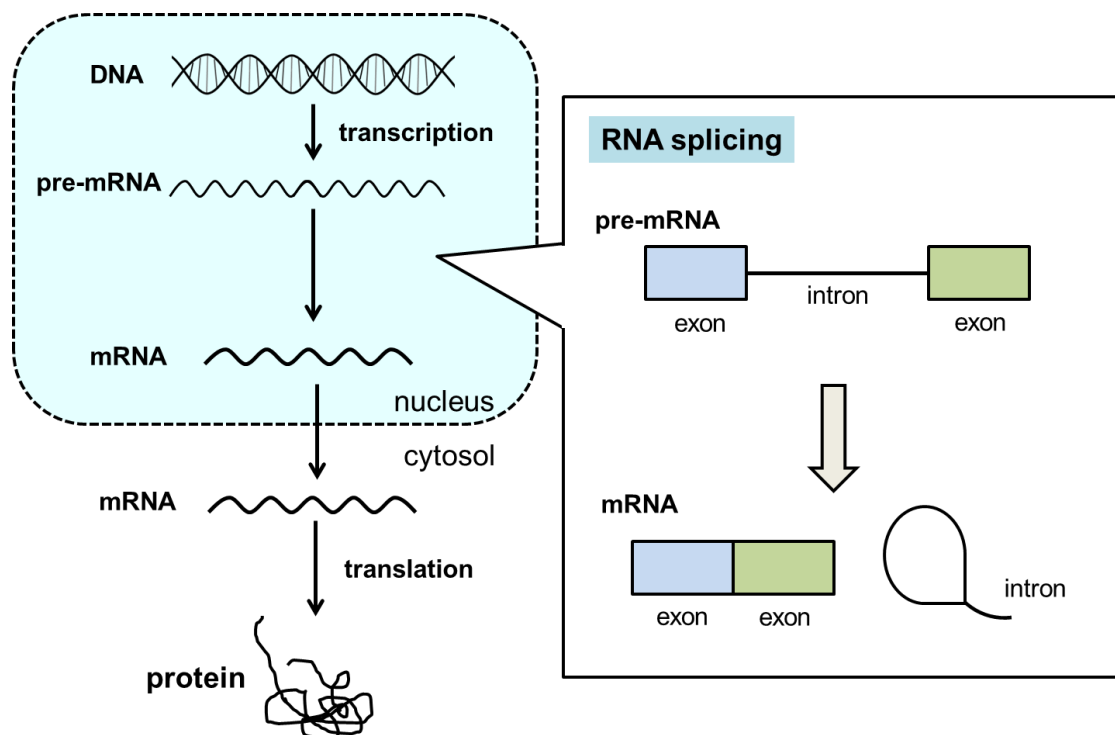


図 1-1 セントラルドグマと RNA スプライシング

子におけるスプライシング異常を引き起こし、DM1 患者において、多彩な臨床症状を発現させる。その一つに耐糖能異常の原因となるインスリンレセプター (Insulin receptor; IR) の選択的スプライシング異常がある¹³⁾。本章では IR の選択的スプライシングに着目し、実験を行った。生体に近い反応を見るため、外来遺伝子であるスプライシング解析用ベクターを利用するのではなく、細胞内在性の IR の選択的スプライシングを解析することにした (第 1 節)。現在、スプライシング異常の修正には核酸医薬品と低分子化合物を用いる 2 つの治療アプローチが提案されている。低分子化合物は核酸医薬品と比較し、安価で合成できることや薬物輸送の優位性から、その実用化に多くの期待が寄せられている。

本章では、まず始めに IR の選択的スプライシングを操作する低分子化合物のスクリーニングを行った (第 2 節)。さらに見出した候補化合物の時間及び濃度依存性を調べ、スプライシング調節作用の最適化を試みた (第 3 節)。また組織 (細胞種) による IR の選択的スプライシングパターンの違いや候補化合物の作用発現の差異を検討した (第 4 節)。最後に候補化合物を用いて DM1 患者由来細胞の IR におけるスプライシング異常修正を試みた (第 5 節)。

第 1 節 細胞内在性 IR の選択的スプライシング

IR は細胞膜表面に存在し、インスリンと結合することで、細胞内へのシグナル伝達を行う。第 19 染色体に存在する *INSR* 遺伝子にコードされ、22 のエクソンから構成される。エクソン 11 は選択的スプライシングを受け、2 つのアイソフォームを産生する¹⁴⁾。エクソン 11 を含むアイソフォーム (isoform B; IR-B) はインスリンの細胞内へのシグナル伝達効率が良く、インスリン感受性組織の肝臓、腎臓、筋肉において多く発現している¹⁵⁾。一方、エクソン 11 を欠失したアイソフォーム (isoform A; IR-A) は細胞増殖に関わり、腫瘍組織での発現上昇が報告されている¹⁶⁾。

DM1 患者では、骨格筋における IR の選択的スプライシングが異常化し、アイソフォームの発現割合が変化する¹³⁾。スプライシング反応時にエクソン 11 の取り込みが抑制されることで、インスリンのシグナル伝達効率が悪いアイソフォームである IR-A が主な産生物となる。そのため、DM1 患者の多くは耐糖能異常を併発することになる (図 1-2)。

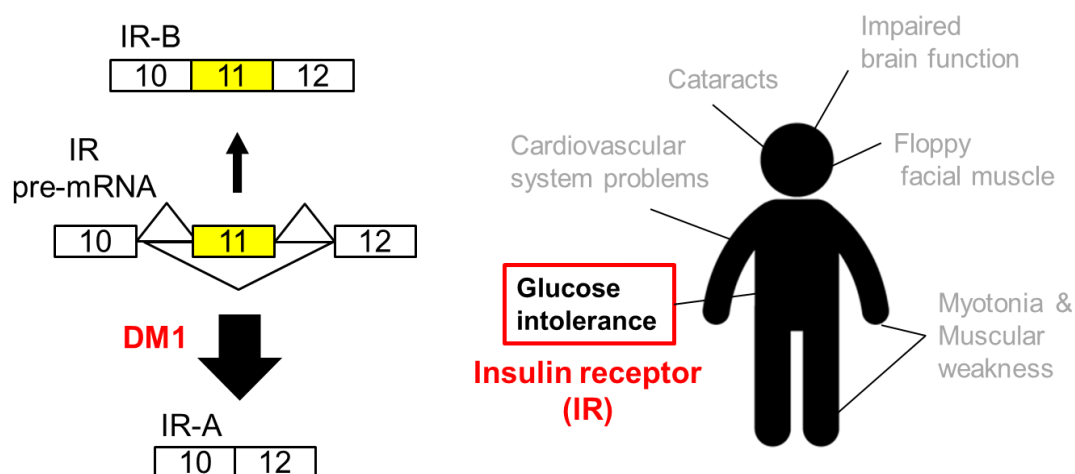


図 1-2 DM1 患者と IR の選択的スプライシング異常

著者は DM1 患者の耐糖能異常は IR のスプライシング異常を原因としていることに着目し、この異常を修正することができれば耐糖能異常の治療につながると考えた。本節では実験を簡便に行うため、増殖能が高くスプライシング研究の分野で幅広く利用されてきたヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞を用いて実験を行った。

第 1 項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

D-MEM high glucose (和光純薬)

Fetal Bovine Serum (Gibco)

Phosphate buffered saline (PBS) (SIGMA-ALDRICH)

0.25% Trypsin-EDTA Phenol Red (Gibco)

(2) 使用した細胞

HeLa 細胞 (ATCC)

(3) 細胞からの全 RNA 抽出

High Pure RNA Isolation Kit (Roche)

(4) 逆転写反応による cDNA 合成と PCR 増幅

Random Hexamer Primer (Invitrogen)

Dithiothreitol (DTT) (Invitrogen)

RNase OUT (Invitrogen)

M-MLV-RT (Invitrogen)

2.5 mM dNTPmix (TaKaRa)

10×Ex Taq buffer (TaKaRa)

Ex Taq (TaKaRa)

Forward primer (IR c10f; 5'-CCA AAG ACA GAC TCT CAG AT-3')

Reverse primer (IR c12r; 5'-AAC ATC GCC AAG GGA CCT GC-3')

MinElute PCR purification kit (QIAGEN)

(5) スプライシング産物の解析

DNA LabChip kit (Agilent Technology)

(6) 塩基配列の決定

E.coli HST08 (TaKaRa)

SOC broth (TaKaRa)

Bacto Tryptone (BD Biosciences)

Bacto Yeast Extract (BD Biosciences)

pT7-Blue T-vector (Novagen)

DNA Ligation kit ver.2.1 (TaKaRa)

BigDye ver3.1 (Applied Biosystems)

5×Sequence buffer (Applied Biosystems)

Hi-Di formamide (Applied Biosystems)

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) (和光純薬)

Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) (和光純薬)

Ampiciliin (Zymo Research)

(7) その他の試薬

SIGMA-ALDRICH、TaKaRa、または和光純薬の特級品を使用した。

2. 実験方法

2-1 HeLa 細胞の培養

継代培養を行ったヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.25% Trypsin で培養シャーレから剥がし、細胞数の計測を行った。12 well プレーートの各 well に 2×10^5 個となるように細胞を播種し、5% FBS 含有 D-MEM を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。

2-2 RT-PCR 反応とスプライシング産物の解析

i) 全 RNA の抽出

HeLa 細胞の全 RNA 抽出には High Pure RNA Isolation Kit (Roche) を使用し、付属のプロトコールに従った。抽出した全 RNA 濃度を NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) で 260 nm における吸光度から算出した。

ii) cDNA の作製

全 RNA を 500 ng となるように MQ (Milli-Q) 水を用いて 6 μ L に調製した。2 \times Random Hexamer Primer 2 μ L と 2.5 mM dNTPmix 5 μ L を加え、65°C で 5 分間、25°C で 10 分間反応させた。さらに逆転写酵素である M-MLV-RT 1 μ L、RNase OUT 1 μ L、0.1 M DTT 1 μ L と 5 \times First strand buffer 4 μ L を加え、37°C で 55 分間、70°C で 15 分間加熱し、cDNA を合成した。

2-3 PCR による DNA の増幅

PCR は IR エクソン 11 の有無を検出できるように設計したプライマーを使用した。エクソン 10 内に Forward primer を、エクソン 12 内に Reverse primer をオープンソースである Primer 3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) を利用して設計した。

cDNA 2 μ L に対し、10 \times Ex Taq buffer 2 μ L、2.5 mM dNTPmix 1.6 μ L、Forward primer (IR c10f) 10 pmol と Reverse primer (IR c12r) 10 pmol、Ex Taq ポリメラーゼ 0.5 U、MQ 12.3 μ L を加え、総量を 20 μ L に調製し、PCR を行った。PCR 条件は 94°C 3 分加熱した後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 90 秒を 28 サイクル行い、72°C 3 分加熱し、DNA を増幅した。PCR のサイクル数は 25 サイクル、28 サイクル、30 サイクルで検討を行い、28 サイクルで増幅させた PCR 産物はプラトー域に到達していないことを確認している。同 cDNA サンプルを用いてハウスキーピング遺伝子の GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を増幅して内部標準とした。

2-4 キャピラリー電気泳動を用いた PCR 産物の分離

増幅した PCR 産物を Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technology) および DNA1000 LabChip kit (Agilent Technology) を使用し、付属のプロトコールに従って PCR 産物を分離した。

2-5 PCR 産物の塩基配列の確認

i) TA クローニングと大腸菌形質転換

精製した PCR 産物と T ベクターの pT7-Blue T-vector を混和した液に Ligation solution I (TaKaRa) を加えて 16℃で一晩インキュベートし、TA クローニングを行った。ライゲーションした反応液を *E.coli* HST08 10 µL と混和、4℃で 20 分間静置、42℃で 50 秒加熱、4℃で 2 分間静置した後、SOC broth を 75 µL 添加して 37℃で 1 時間振盪培養した。その後、X-Gal 2 mg/mL、IPTG 20 mg/mL、Ampicillin 50 mg/mL の最終濃度となるようにあらかじめ添加しておいた LB プレートに播種した。その後、37℃で一晩培養した。

ii) コロニーPCR

形成された単一コロニーを滅菌済みの爪楊枝で拾い、10×Ex Taq buffer 2 µL、2.5 mM dNTPmix 1.6 µL、Forward primer (IR c10f: 5'- CCA AAG ACA GAC TCT CAG AT -3') 10 pmol と Reverse primer (IR c12r: 5'- AAC ATC GCC AAG GGA CCT GC -3') 10 pmol、Ex Taq ポリメラーゼ 0.5 U、MQ 12.3 µL を加え、総量を 20 µL に調製した反応液で colony PCR を行った。PCR 条件は 94℃ 3 分加熱した後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 90 秒を 35 サイクル行い、72℃ 3 分加熱し、DNA を増幅した。これを Agilent 2100 bioanalyzer を使用し、PCR 産物の単離を確認した。単離が確認された PCR 産物を MinElute PCR purification kit (QIAGEN) を用い、付属のプロトールに従い精製した。

iii) サイクルシーケンシング

塩基配列を決定するため、精製した PCR 産物のサイクルシーケンシングを行った。Forward primer もしくは Reverse primer (1 pmol/µL) 1 µL、精製済み PCR 産物 0.5 µL、BigDye (v3.1) 1.1 µL、5×Sequence Buffer 1.75 µL、MQ で総量 10.6 µL に調製し、反応を行った。反応条件は 96℃ 1 分加熱した後、96℃ 10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 4 分を 25 サイクル行った。

iv) シーケンス解析

得られた反応液を PERFORMA DTR Gel Filtration Cartridge (Edge Bio) を用いて製品付属のプロトコールに従い精製を行った。Hi-Di formamide 16 µL に再溶解し、70℃で 5 分間加熱、3 分間氷上静置した。これを DNA シーケンサー 310 (ABI) により、塩基配列を決定した。得られた塩基配列を BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により、目的の PCR 産物が増幅されているかを確認した。

第 2 項 実験結果

1. HeLa 細胞における IR の選択的スプライシング様式の確認

培養した HeLa 細胞から全 RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を得た。エクソン 11 の有無の検出が可能なプライマー (IR c10f-IR c12r) を用いて、PCR を行った。図 1-3 は PCR 産物をキャピラリー電気泳動で分離した結果である。その結果、異なるサイズ (Upper band; 約 170bp, Lower band; 約 130bp) の 2 本のバンドが観察された。

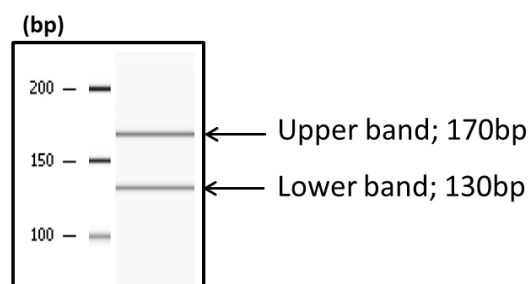


図 1-3 HeLa 細胞内在性 IR の選択的スプライシング

2. 転写産物の塩基配列の決定

Upper band および Lower band が IR の mRNA 由来の PCR 産物であるかどうかを確認するために塩基配列を決定した。TA クローニング法によりサブクローニングを行い、Upper band および Lower band をそれぞれ単一の PCR 産物とした後、DNA シーケンサーで塩基配列を決定した。解析結果から Upper band (約 170 bp) はエクソン 11 を含む mRNA 由来の PCR 産物 (Exon11+IR; 165 bp) であり、Lower band (約 130 bp) はエクソン 11 を欠く mRNA 由来の産物 (Exon11-IR; 129 bp) であると確認された (図 1-4)。

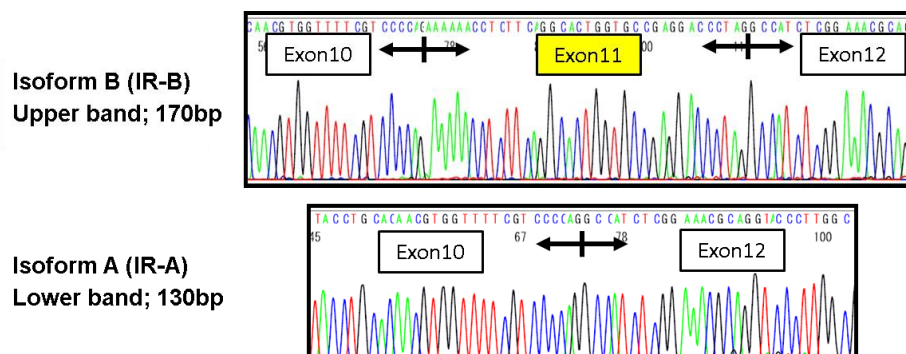


図 1-4 PCR 産物の塩基配列の決定

3. PCR サイクル数の設定

エクソン 11 の有無を検出する際の PCR サイクル数を設定するため、25、28、30 サイクルで検討を行った。図 1-5a は PCR 産物を電気泳動して得られた electropherogram を示している。各ピークは Control (サイズマーカー) と Exon11-IR および Exon11+IR の 3 つのバンド由来の蛍光強度を示している。1-5b のグラフは縦軸に Exon11+IR の蛍光強度を Control の強度で除した値、横軸には検討した PCR サイクル数を示している。この結果より、プラトー域に到達していないことが確認できた 28 サイクルで以降の PCR を行うことにした。

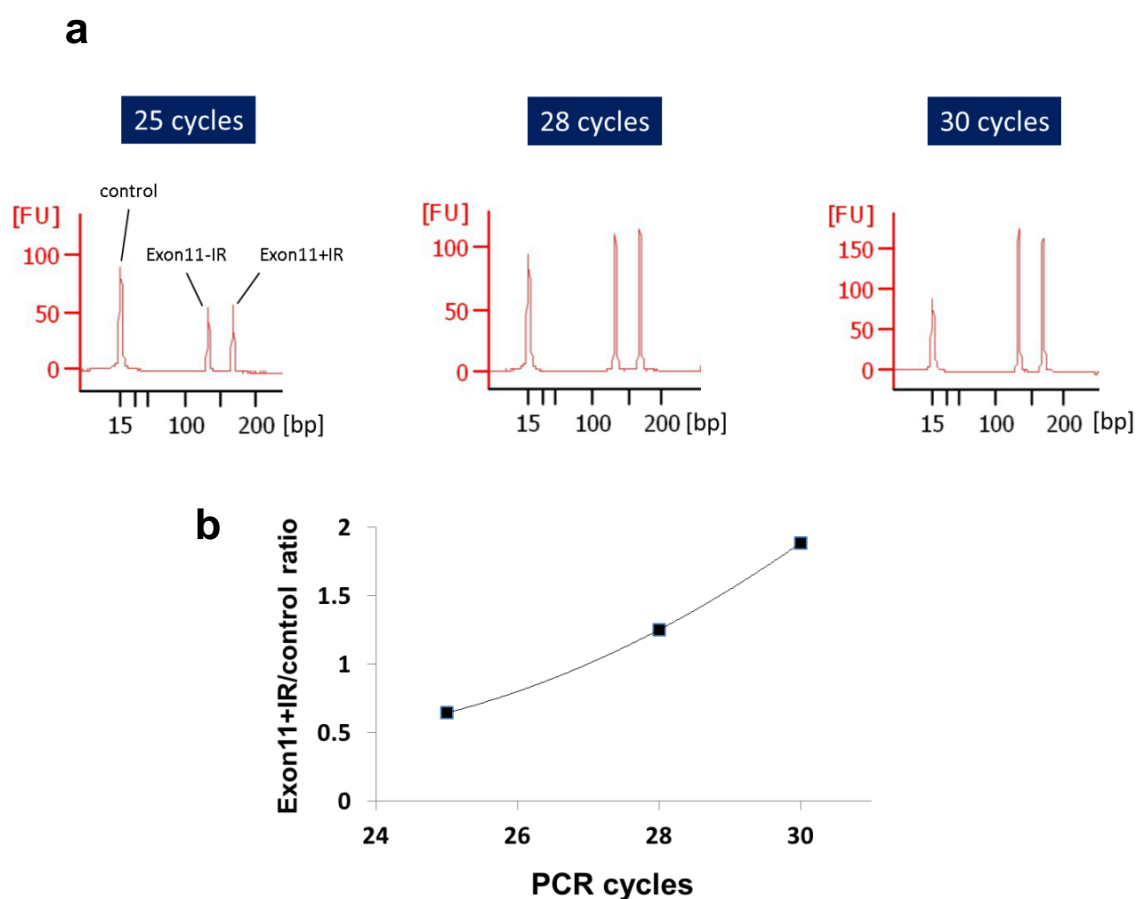


図 1-5 PCR サイクル数の検討

これらの結果から、HeLa 細胞では IR-A と IR-B の両者のアイソフォームが発現していることがわかった。次節では、HeLa 細胞を用いて IR の選択的スプライシングを調節する低分子化合物の探索を行った。

第 2 節 IR の選択的スプライシングを操作する低分子化合物の探索

スプライシング異常を原因とした疾患治療アプローチとして AO や低分子化合物を用いた方法が提案されている。AO は核酸分子で構成され、スプライシング反応に必要となる pre-mRNA 上の特定配列をブロックすることでスプライシング異常を修正する。現在ではデュシャンヌ型筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症の治療法として幾つかの候補が臨床試験へ進むなど、世界標準の治療法となりつつある¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、AO は核酸分子であるため、合成費用が高額となる点や高分子であるために薬物輸送の問題が指摘されている²¹⁾。そこで、もう一つの治療法である低分子化合物を用いた方法が注目されている。低分子化合物は低分子ゆえの利便性やドラッグデリバリーの優位性からその実用化が期待されている。そこで、著者は IR エクソン 11 の認識を促進する低分子化合物を発見することができれば、DM1 患者で併発する耐糖能異常の治療薬になると着想した (図 1-6)。本節では、第 1 節で検討した HeLa 細胞を用いて IR エクソン 11 の認識を促進する低分子化合物の探索を試みた (図 1-6)。さらに見出した候補化合物が有するスプライシング調節作用の経時変化や濃度依存性を確認した。

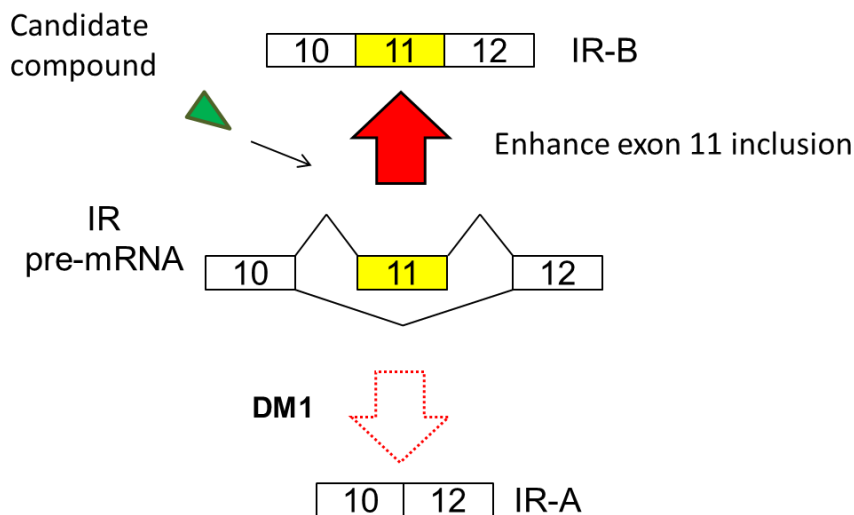


図 1-6 スプライシング異常を修正する低分子化合物の探索

第 1 項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

第 1 節と同様の試薬を用いた。

(2) 使用した細胞

HeLa 細胞 (ATCC)

(3) 候補低分子化合物

DMSO (和光純薬)

trans-Resveratrol (RES) (和光純薬)

SRPIN340 (SRP) (gift from prof. M. Hagiwara)

TG003 (SIGMA-ALDRICH)

Kinetin (FLUKA AG)

Epigallocatechin gallate (EGCG) (Nagara science)

3-Nitropropionic acid (3-NP) (SIGMA-ALDRICH)

Kinetin riboside (KR) (SIGMA-ALDRICH)

Prednisolone (PDN) (Shionogi pharmaceutical)

(4) 細胞からの全 RNA 抽出

第 1 節と同様の試薬を用いて全 RNA を抽出した。

(5) 逆転写反応による cDNA の獲得と PCR 増幅

第 1 節と同様の試薬を用いて cDNA を合成後、PCR を行った。

(6) スプライシング産物の解析

2100 expert software (Agilent Technology) を使用し、PCR 産物の半定量を行った。

2. 実験方法

2-1 細胞の播種、RT-PCR

第 1 節と同様の方法で行った。

2-2 スプライシング産物の解析

増幅した PCR 産物を Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technology) および DNA1000 LabChip kit (Agilent Technology) を使用し、付属のプロトコールに従って分離した。

PCR 産物の半定量には 2100 expert software で得られる electropherogram の peak height を利用した。IR エクソン 11 を含む mRNA を Exon11+IR、欠失した mRNA を Exon11-IR とした。Exon11+IR の割合は以下の式によって算出した。

$$\text{Exon11+IR の割合 (\%)} = (\text{Exon11+IR} / \text{Exon11+IR} + \text{Exon11-IR}) \times 100$$

2-3 候補低分子化合物の細胞培養液中への添加

i) 候補化合物の調製

IR エクソン 11 のスプライシング調節作用を有する低分子化合物を探索するため、計 8 つの候補化合物を細胞培養液中に添加した。RES、SRP、TG003、Kinetin、EGCG は DMSO に、3-NP、KR および PDN は PBS に溶解した。各濃度は、RES 100 μM 、SRPIN340 50 μM 、TG003 50 μM 、Kinetine 100 μM 、EGCG 100 μM 、3-NP 200 μM 、KR 2 μM 、PDN 2 μM で検証を行った（表 1-1）。

ii) 候補化合物の添加

スプライシングを調節する低分子化合物の探索

12 well プレートの各 well に 2×10^5 個となるように播種し、一晚培養した HeLa 細胞の培地を除去し、5% FBS 含有 D-MEM 培地を各 well に 1 mL 加え、DMSO 及び PBS が最終濃度 0.1% となるように調製した候補化合物を添加した。24 時間培養後、細胞を回収し、第 1 節と同様の方法で全 RNA の抽出と RT-PCR によりスプライシング解析を行った。

2-4 RES のスプライシング調節作用と経時変化

2-3 と同様の方法で細胞を播種し、RES を最終濃度 100 μM となるように添加した。0、2、4、8、12 時間培養後、細胞を回収し、第 1 節と同様の方法で全 RNA の抽出と RT-PCR によりスプライシング解析を行った。

2-5 RES のスプライシング調節作用の濃度依存性

細胞を播種し、一晚培養後、RES を最終濃度 10 μM 、20 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM となるように添加した。8 時間培養後、細胞を回収し、第 1 節と同様の方法で全 RNA の抽出と RT-PCR によりスプライシング解析を行った。

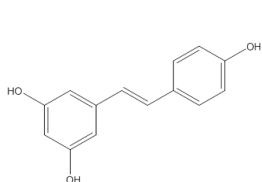
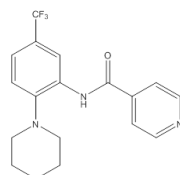
第 2 項 実験結果

1. 候補低分子化合物の IR の選択的スプライシングへの影響

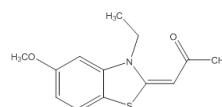
スプライシング調節作用が報告されている候補化合物から種々の機能を代用する 8 つの化合物 *trans*-Resveratrol (RES)、SRPIN340 (SRP)、TG003、Kinetin、Epigallocatechin gallate (EGCG)、3-Nitropropionic acid (3-NP)、Kinetin riboside (KR)、Prednisolone (PDN) を候補とした^{4, 22-27)}。表 1-1 に化合物名と性質およびスクリーニング時の最終濃度を示した。

表 1-1 候補低分子化合物の名称、性質および最終濃度と構造式

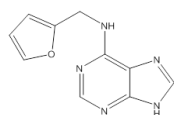
Compound	Function	Final concentration
<i>trans</i> -Resveratrol (RES)	A kind of stilbenoid	100 μ M
SRPIN340 (SRP)	SRPK inhibitor	50 μ M
TG003	Clk1 inhibitor	50 μ M
Kinetin	A kind of cytokinin	100 μ M
Epigallocatechin gallate (EGCG)	A kind of flavonoid	50 μ M
3-Nitropropionic acid (3-NP)	Succinate dehydrogenase inhibitor	100 μ M
Kinetin riboside (KR)	A kind of cytokinin	2 μ M
Prednisolone (PDN)	Synthetic adrenal steroid hormone	2 μ M

*trans*-Resveratrol

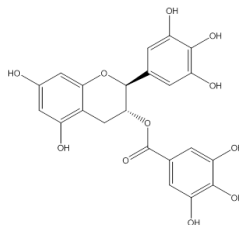
SRPIN340



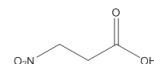
TG003



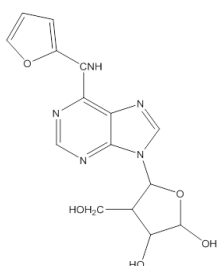
Kinetin



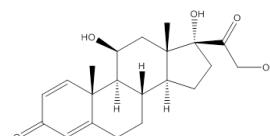
Epigallocatechin gallate



3-Nitropropionic acid



Kinetin riboside



Prednisolone

そして第 1 節で検討したスプライシング解析条件により、候補化合物の IR エクソン 11 の選択的スプライシングへの影響を検討した。HeLa 細胞培養液中に候補化合物を添加し、24 時間培養後、RT-PCR とキャピラリー電気泳動によってエクソン 11 の選択的スプライシング様式を解析した。図 1-7 にキャピラリー電気泳動の結果を示す。第 1 節で示したように IR mRNA 由来の二本の band が観察された。8 つ中 7 つの候補化合物はスプライシングに大きな変化を与えなかった。しかしながら、スチルベン誘導体の 1 つである Resveratrol (RES) が IR エクソン 11 の取り込みを強く促進させることを見出した。電気泳動時に得られた蛍光強度を比較し、化合物添加によって転写産物の量的変化がないことを確認している。

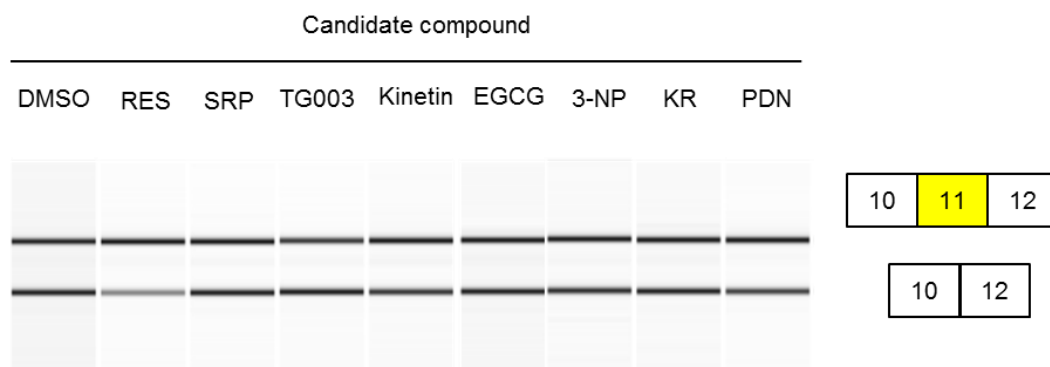


図 1-7 薬物スクリーニングの結果

2. RES が有するスプライシング調節作用の経時変化の検討

RES の時間経過に伴うスプライシング調節作用を検討した。薬剤添加から全 RNA 回収までの反応時間（インキュベーション時間）を 0 時間、2 時間、4 時間、8 時間、12 時間とし、IR スプライシングの調節作用を確認した。その結果を図 1-8a に示す。縦軸はエクソン 11 を含む mRNA 由来 PCR 産物の割合（%）（Exon11+IR）、横軸を RES の反応時間（hr）とした。

DMSO を添加した細胞では添加から 12 時間後においても Exon11+IR の割合に大きな変化は認められなかった。一方、RES 100 μ M を添加した細胞では添加から 8 時間後までに Exon11+IR の割合が直線的に増大し、以降はプラトーに到達した。これらの結果から次節以降の HeLa 細胞を用いた RES のスプライシング

調節作用の検討は添加 8 時間後に細胞を回収し、スプライシング産物の解析を行うことにした。

RES 添加から 8 時間後の IR エクソン 11 のスプライシング産物の解析結果を図 1-8b に示した。左はキャピラリー電気泳動を行った結果を、右には Exon11+IR の割合を縦軸としたスプライシング産物の半定量解析を行った結果を示した。内在性コントロールにはハウスキーピング遺伝子である GAPDH を利用した。スプライシング産物の半定量解析を行った結果、RES の添加はコントロールである DMSO と比較し、Exon 11+IR の割合を 34.3% から 63.9% まで増大した ($p<0.001$)。

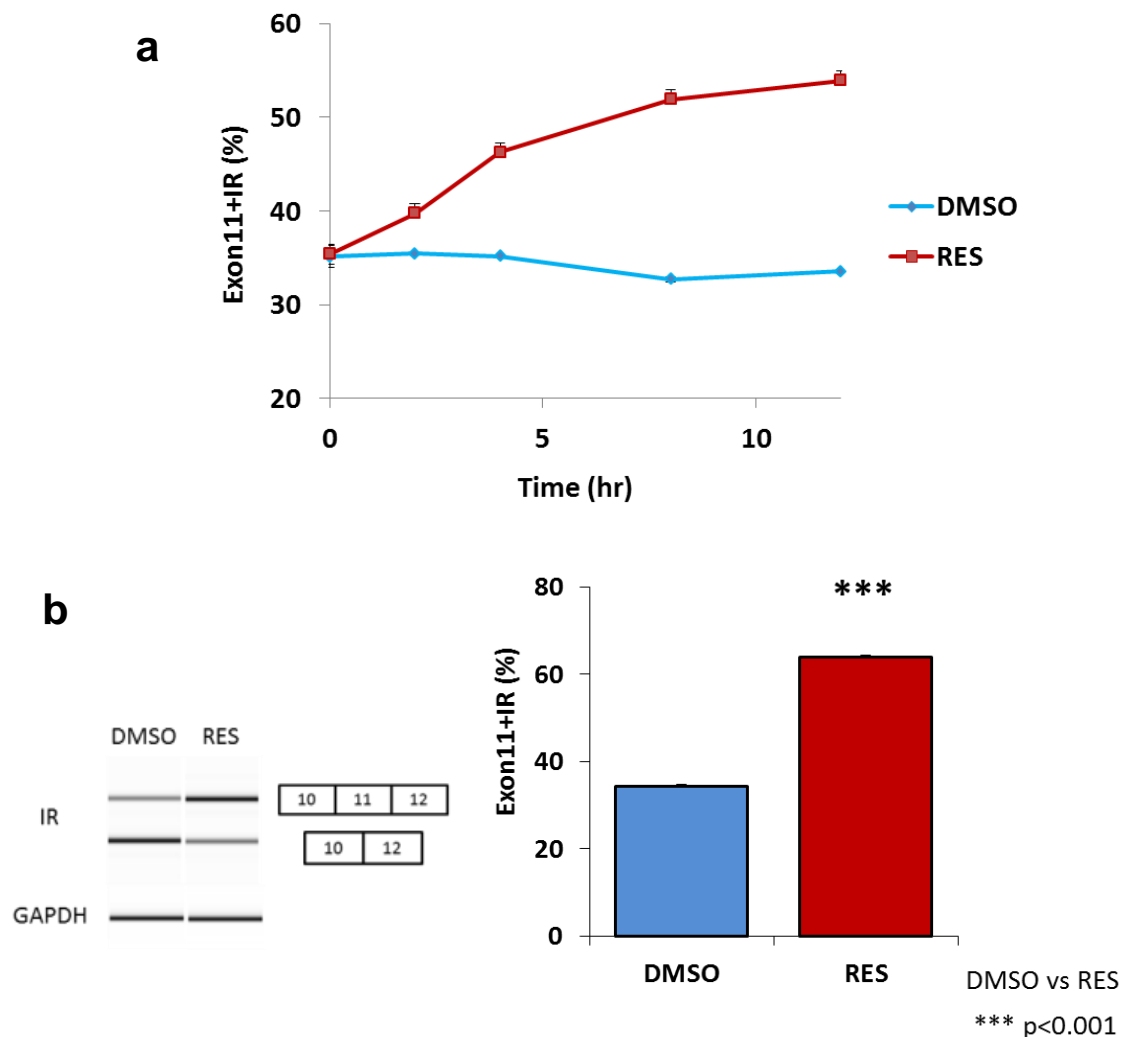


図 1-8 RES のスプライシング調節作用の経時変化と
添加 8 時間後のスプライシング解析結果

3. RES の細胞培養液中への添加濃度の検討

RES の効果が濃度依存性を示すかどうかを検証するため、異なる濃度の RES を細胞培養液中に添加し、そのスプライシング調節作用を解析した。その結果を図 1-9 に示した。縦軸は Exon11+IR の割合、横軸は RES の添加濃度とした。濃度は添加なし、10 μ M、20 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M の 6 種類で検討した。0 μ M から 100 μ M までは Exon11+IR の割合は直線的に増大し、その後、プラトーに到達することが確認された。これらの結果から、次節以降の HeLa 細胞を用いた RES のスプライシング調節作用の検討には 100 μ M を添加し、スプライシング産物の解析を行うことにした。

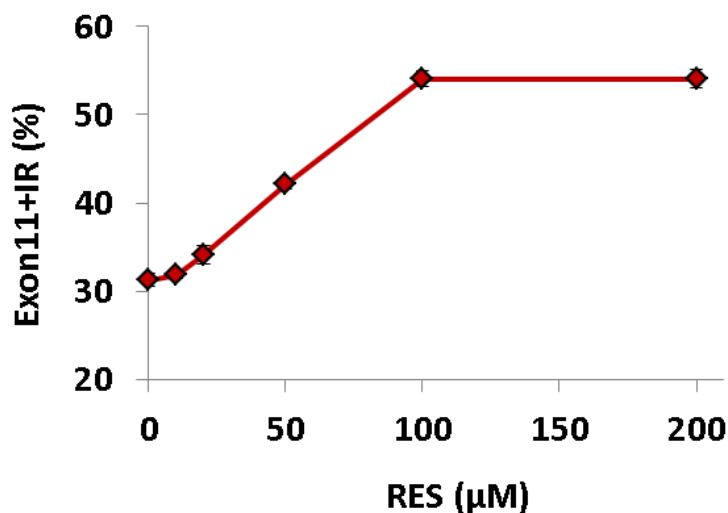


図 1-9 RES の濃度依存的スプライシング調節作用

第 3 節 細胞種による RES のスプライシング調節作用

選択的スプライシングによって生じる IR の 2 つのアイソフォーム IR-A と IR-B は 36 塩基からなるエクソン 11 の有無により、12 アミノ酸の違いを有する。これは構造やその機能に違いをもたらすことが知られている。IR-A は IR-B と比較し、インスリンとの結合と解離が素早く起きることやチロシンキナーゼ活性が低いために細胞内へのシグナル伝達効率が悪いと考えられている²⁸⁻³⁰⁾。また、IR のプロモーター領域には多くの転写部位とそれを制御するためのシス配列が存在する^{31, 32)}。これにより発達段階や組織特異的なアイソフォームの発現が可能となる。インスリン感受性の高い組織である肝臓や脂肪細胞、腎臓、骨格筋ではエクソン 11 を有する IR-B が主な産生物となる。一方、脳や小腸、癌組織においてはエクソン 11 を欠失した IR-A が主な産生物となる。

そこで本節では数種の組織細胞における IR のスプライシング様式を確認し、RES の効果が細胞種に関わらず、得られるかどうかを確認した。

第 1 項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

第 1 節と同様の試薬を使用した。

(2) 使用した細胞

SH-SY5Y 細胞 (ATCC)

HEK293 細胞 (ATCC)

HepG2 細胞 (ATCC)

Skeletal muscle cells (SkMC) (Lonza)

Fibroblasts (Coriell institute for medical research)

HeLa 細胞の培養には 5% FBS 含有 D-MEM を使用した。

その他の細胞には 10% FBS 含有 D-MEM を使用した。

(3) 細胞の播種、RT-PCR およびスプライシング産物の解析

第 1 節と同様の試薬を用いた。

2. 実験方法

2-1 RES の添加

一晩培養した細胞の培地交換を行い、RES を最終濃度が 100 μ M となるように培養液中に添加した。細胞により、最適な反応時間が異なる可能性を考慮し、

第 1 章

添加から 24 時間後のスプライシング産物の解析を行うことにした。細胞を回収後、全 RNA 抽出と RT-PCR によりスプライシング解析を行った。

2-2 細胞の播種、RT-PCR およびスプライシング産物の解析

第 1 節と同様の方法で細胞の播種、RT-PCR を行った。スプライシング産物の解析は第 2 節と同様の方法で行った。

第 2 項 実験結果

1. ヒト由来細胞株と IR エクソン 11 の選択的スプライシング

これまでに見出した RES の IR エクソン 11 におけるスプライシング調節作用が HeLa 細胞以外のヒト由来細胞株でも得られるかどうかを検証した。計 5 種の様々な組織由来の細胞株 (SH-SY5Y 細胞、HEK293 細胞、HepG2 細胞、Skeletal muscle cells (SkMC)、Fibroblast) を用いて RES のスプライシング調節作用を検討した。表 1-2 に使用した細胞とその由来を記載した。

表 1-2 使用した細胞とその由来組織

Cell line	Tissue
SH-SY5Y	human neuroblastoma
HEK293	human embryonic kidney
HepG2	human hepatocellular carcinoma
Skeletal muscle cells (SkMC)	human skeletal muscle
Fibroblast	human skin fibroblast

図 1-10 は各細胞種における Exon11+IR と Exon11-IR の割合を半定量解析した結果を示している。神経芽腫 SH-SY5Y 細胞ではエクソン 11 を欠失した Exon11-IR が主に産生されていた (98.5%)。HEK293 細胞と HepG2 細胞はインスリン感受性組織である肝臓と腎臓に由来するため、Exon11+IR の割合が高くなることが予想された。しかしながら、両細胞は Exon11+IR の割合が約 35%であり、予想とは異なる結果が得られた。一方、正常細胞である SkMC および Fibroblast では予想された通り、Exon11+IR の割合は高値 (73.4%および 62.4%) を示した。検討した 5 種の細胞は、それぞれが独自のスプライシング様式を示していた。

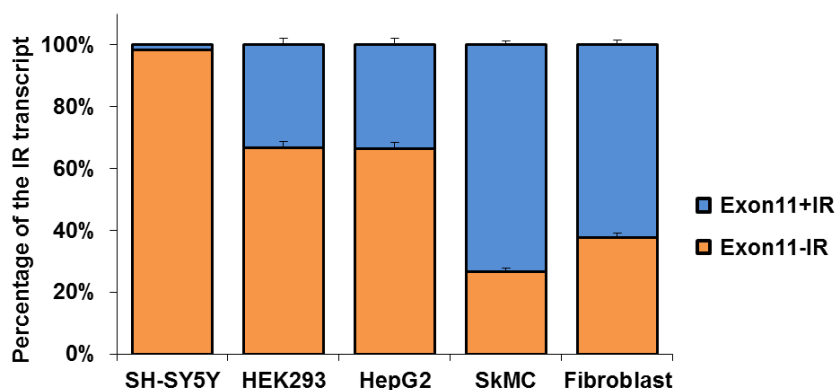


図 1-10 細胞種による IR エクソン 11 のスプライシング様式

2. RES のスプライシング調節作用と細胞種

上述の 5 種の細胞への RES のスプライシング調節作用を検討した。各々の細胞培養液中に RES 100 μ M を添加し、IR のスプライシング解析を行った結果を図 1-11 に示す。Exon11-IR の割合が 98.5% と極めて高い値を示した SH-SY5Y 細胞では RES の添加による有意なエクソン 11 の取り込み促進作用は認められなかった。また Exon11+IR の割合が同程度であった HEK293 細胞および HepG2 細胞においては、HepG2 細胞のみで RES はエクソン 11 の取り込みを強く促進した (Exon11+IR: 33.6% \rightarrow 41.6%)。HEK293 細胞では有意な変化は認められなかった。また DM1 患者における耐糖能異常の原因は主に骨格筋での IR のスプライシング異常であることが知られている¹³⁾。骨格筋由来の細胞である SkMC においても RES はエクソン 11 の取り込みを促進した (Exon11+IR: 73.4% \rightarrow 82.7%)。検討した 5 種のヒト由来細胞株の中で、最も大きな RES によるスプライシング調節作用が得られた細胞は Fibroblast であり、RES 添加は Exon11+IR の割合を 62.5% から 78.5% まで増大させた。

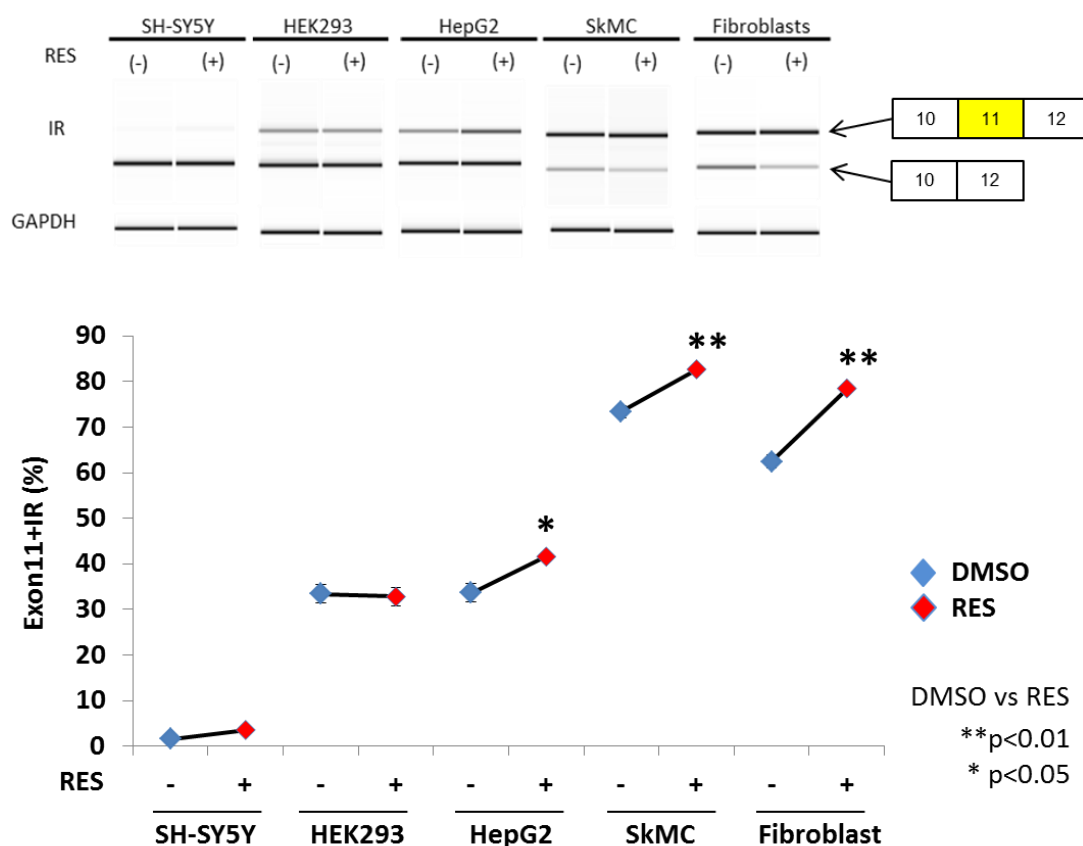


図 1-11 各細胞種における RES のエクソン 11 認識促進作用

第 4 節 DM1 患者由来細胞のスプライシング異常修正

DM1 患者の病態原因となる CTG 反復配列の異常延長は減数分裂の際に生じることが知られている。健常者では 5 から 37 リピートであるのに対し、DM1 患者では 51 から数千にまで延長が増大する。リピート数が 38 から 50 の場合は pre-mutation に分類され、51 から 100 の場合は proto-mutation と呼ばれる。これらは共に DNA 複製機構が不安定となるため、リピート数が増大する可能性をもつ^{33, 34)}。しかしながら、pre-mutation および proto-mutation をもつ患者は無症候もしくは白内障といった軽症のみを患う。この CTG 反復配列の異常延長は減数分裂の際に生じると考えられており、両親よりも子供では異常延長が増大し、数千リピートの CTG 配列が生じる。そして子供では臨床症状が重症化し、筋緊張や耐糖能異常だけでなく、呼吸器障害や知的障害をもつことになる。この世代ごとの反復回数が増大は「表現促進現象」と呼ばれており³³⁾、DM1 に罹患したほぼ全ての家系においてこの現象は生じる。この表現促進現象は配偶子形成の際に生じ、その遺伝子異常はほとんどが母系伝達によって、子供へと受け継がれる。母親の多くは無症候もしくは症状が軽いために罹患に気付かないことも多い。

本節では一般的な DM1 罹患家系患者由来の細胞を使用し、RES が IR のスプライシング異常を修正できるかどうかを検討した。

第 1 項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

第 1 節と同様の試薬を使用した

(2) 使用した細胞

Coriell cell repositories から以下の DM1 患者由来繊維芽細胞を購入し、RES によるスプライシング異常の回復が可能かどうかを検討した。

健常者 (Normal) ; GM17052 細胞 (Normal fibroblast)

患者 I-1; GM06076 細胞 (DM1 patient fibroblast)

患者 II-1; GM04608 細胞 (DM1 patient fibroblast)

患者 III-1; GM04601 細胞 (DM1 patient fibroblast)

患者 III-2; GM04602 細胞 (DM1 patient fibroblast)

細胞の培養には 10% FBS 含有 D-MEM を使用した。

(3) 細胞からの全 RNA 抽出

第 1 節と同様の試薬を用いて全 RNA を抽出した。

(4) 逆転写反応による cDNA の獲得と PCR 増幅

第 1 節と同様の試薬を用いて cDNA の合成と PCR を行った。

(5) スプライシング産物の解析

第 1 節と同様の試薬を用いて解析した。

2. 実験方法

2-1 RES の調製と細胞への添加

第 1 節と同様の方法で RES を DM1 患者由来細胞に添加した。

2-2 細胞の播種、RT-PCR およびスプライシング産物の解析

第 1 節と同様の方法で行った。全 RNA の抽出は RES の添加から 8 時間後に行った。

第 2 項 実験結果

1. DM1 患者由来細胞の IR エクソン 11 スプライシング異常

DM1 は世代を経るごとに CUG 反復配列の異常延長が増加する表現促進現象を示す³³⁾。患者はこの異常延長のリピート数と関連した臨床症状を呈する。図 1-12 は本節で使用するために購入した DM1 患者由来繊維芽細胞に関する家系図である。

第 1 世代の I-1 (64 歳) は 66 リピートをもつ proto-mutation に分類され、眼瞼下垂などの軽度の臨床症状をもつ軽症患者である。第 2 世代の II-1 (29 歳) は発端者であり、眼瞼下垂や手の筋強直、四肢遠位筋の萎縮や過眠症を呈する中程度の臨床症状をもつ患者である。第 3 世代にあたる 2 名の患者の III-1 と III-2 (4 歳と 2 歳) は CUG 反復回数が約 1600 であり、生まれつき筋強直や呼吸器障害、脊柱側弯などの重度の臨床症状を呈した。本家系においても DM1 で代表的な表現促進現象が認められている。そこで、これらの細胞における IR のスプライシング異常を調べた。

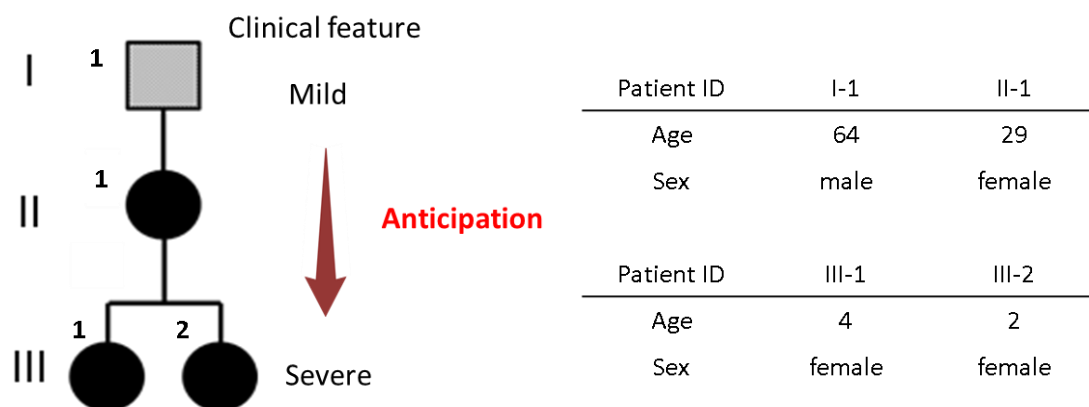


図 1-12 筋緊張性ジストロフィー (DM1) 患者家系図

図 1-13 はこれらの細胞内在性 IR の Exon11+IR (図 1-13a) および Exon11-IR (図 1-13b) の割合について半定量解析を行った結果である。縦軸には Exon11+IR および Exon11-IR の割合、横軸は世代順とし、CTG 反復配列が増大するように示した。66 リピートをもつ軽症患者 I-1 における Exon11+IR の割合は 63.6% であり、健常者由来細胞と比較し、大きな差は認められなかった。第 2 世代の患者 II-1 では Exon11+IR の割合が 59.3% と健常者に比べ、有意に低下していた。そして最も CTG リピート数が多い重症型患者 III-1、III-2 では Exon11+IR の割合が 52.1 と 52.4% と 3 世代の中で最も低い値を示した。

図 1-13 に示した Exon11-IR の半定量解析結果からも世代を経るごとにエクソン 11 を欠失したアイソフォームが増大していくことがわかる。これらの結果より、IR エクソン 11 の選択的スプライシング異常についても表現促進現象が認められ、第 1 世代から第 3 世代へと世代を経るごとに Exon11+IR の割合の低下 (Exon11-IR の増大) が認められた (図 1-13)。

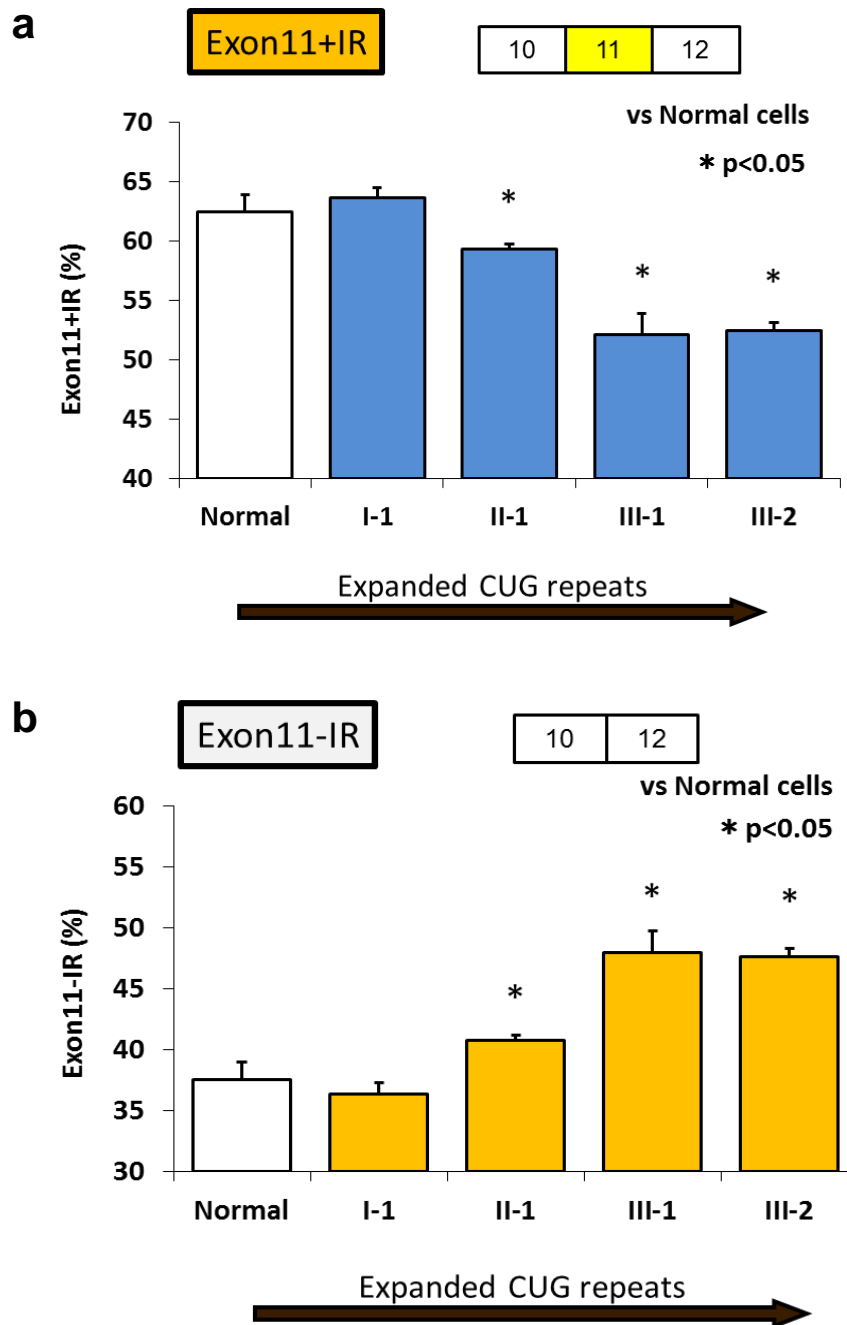


図 1-13 表現促進現象と IR スプライシング異常

2. RES による患者由来細胞のスプライシング異常修正

4 種の DM1 患者由来細胞の IR におけるスプライシング異常を RES が修正するかどうかを検証した (図 1-14)。RES を添加した患者細胞から抽出した RNA を RT-PCR し、スプライシング解析を行った。これまでと同様に半定量解析を行った結果を示す。

Proto-mutation をもつ軽症患者 I-1 由来細胞および発端者である患者 II-1 由来細胞への RES の添加は Exon11+IR の割合をそれぞれ 78.8%と 76.0%まで有意に上昇させた ($p<0.001$)。そして重症型患者である III-1 と III-2 由来細胞においても RES は各細胞で強いエクソン 11 の取り込み促進作用を示した (III-1 ; 52.1%→73.3% III-2; 52.4%→73.7% $p<0.001$)。RES 添加前の健常者の Exon11+IR の割合は 62.5%であったことから、RES は異常延長した CTG 反復配列をもつ DM1 患者におけるエクソン 11 の取り込みを健常者以上にまで増大することが明らかとなった。

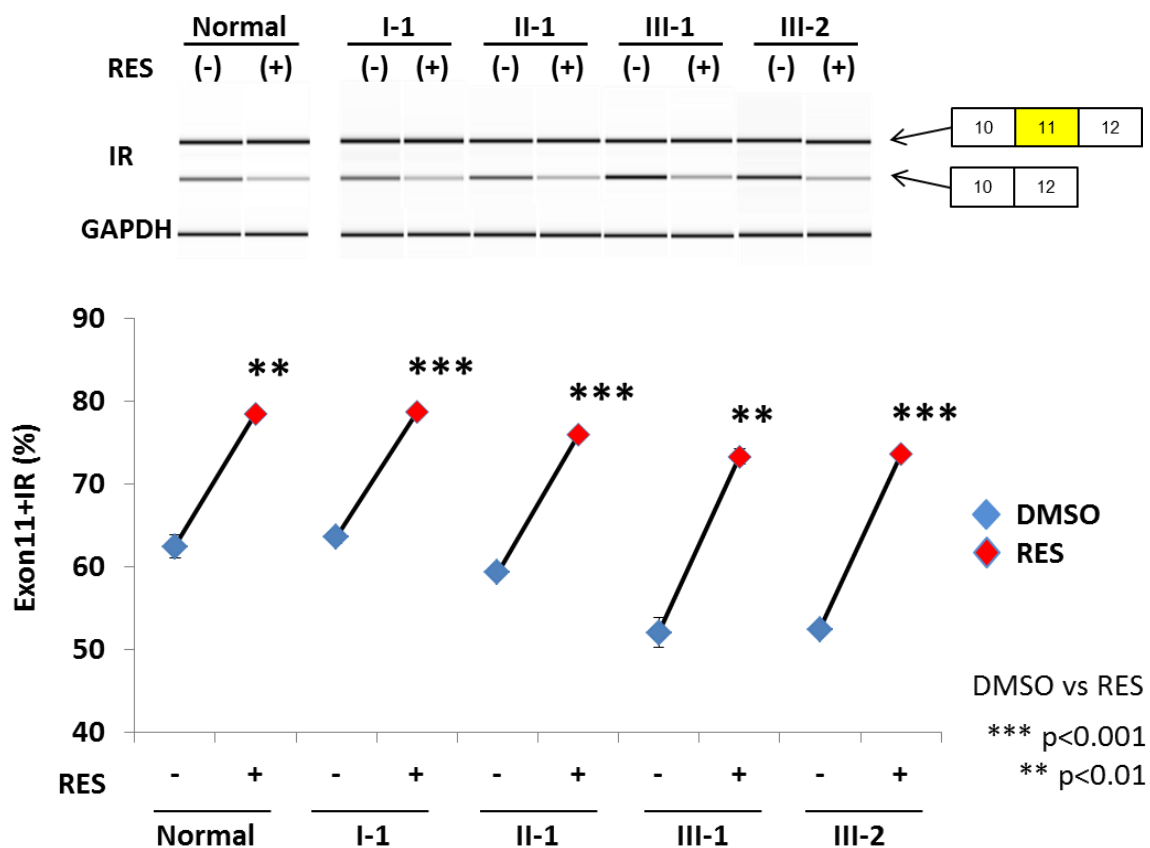


図 1-14 DM1 患者由来細胞への RES 添加によるエクソン 11 認識の促進

第5節 考 察

DM1 患者は多くの遺伝子で選択的スプライシング異常が生じるために多彩な臨床症状を呈する^{13, 35-37)}。IR エクソン 11 の選択的スプライシングは DM1 患者で併発する耐糖能異常の治療標的として注目されてきた。世界標準となりつつある核酸医薬品を用いたスプライシング異常の修正法は、高い特異性をもつ反面、高分子であるために薬物輸送の問題などが指摘されている（図 1-15）²¹⁾。

著者は低分子化合物を用いた IR のスプライシング異常修正を試みた。低分子化合物の課題として、特異性の低さがあげられる。安全で目的とする作用のみを示す化合物の開発は容易ではない。また新規化合物を臨床応用へと移行させるためには安全性や毒性、有効性評価など種々の課題を乗り越えなければならない。

そこで、著者は安全性の観点から食品に含まれる成分に着目し、これらを用いてスプライシングを操作することができれば、臨床応用へ移行しやすいリード化合物の発見につながると考えた。薬物スクリーニングを行う候補として天然物を中心とした低分子化合物を選択した（表 1-1）。その結果、ポリフェノールの 1 つである RES が HeLa 細胞の IR エクソン 11 の認識を促進することを見

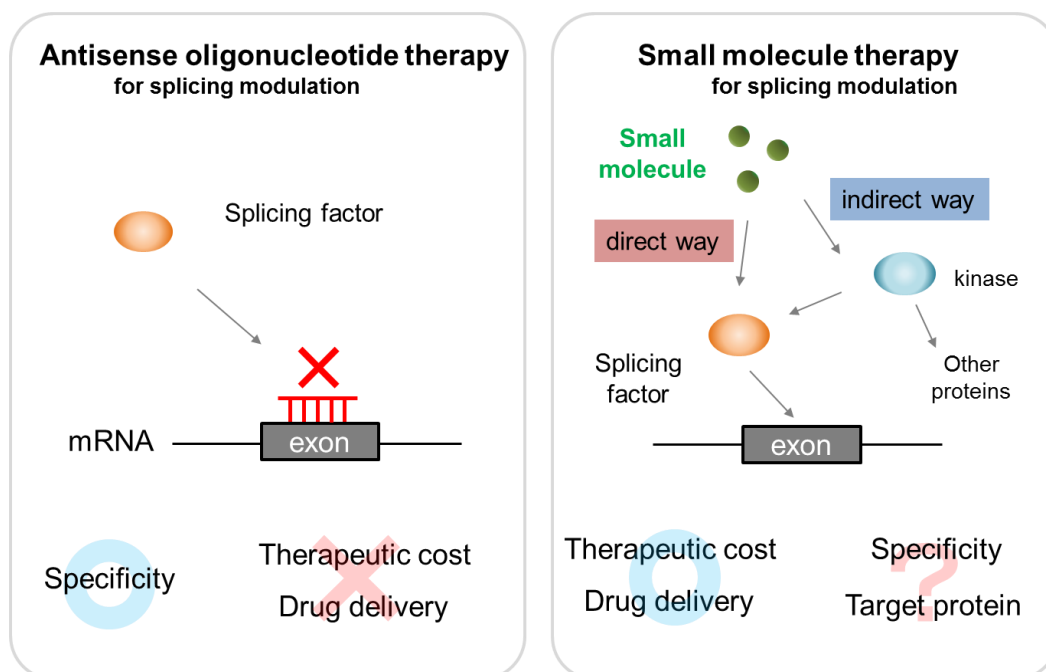


図 1-15 スプライシング異常修正アプローチ

出した (図 1-8) ⁶⁾。RES はブドウの皮、ピーナッツ、ブルーベリーなどに含まれるポリフェノールの一つである ³⁸⁾。ブドウとその被膜から作られる赤ワインには RES が多く含まれており、食品分野においても盛んに研究が行われている。既に市場に流通し、幅広い研究が進む RES は DM1 患者で併発する耐糖能異常治療薬として有望であると考えた。

RES のスプライシング調節作用の経時的変化を確認した結果、添加から 2 時間後にはエクソン 11 の取り込み作用が開始されていることがわかった (図 1-8)。さらにこの促進作用は 8 時間後まで直線的に増加し、それ以降はプラトー域付近にまで到達した。これらの結果は RES のスプライシング調節作用が細胞内に取り込まれた比較的早い段階から開始されていることを示唆している。

これまでに RES はいくつかのシグナル経路の活性化作用をもつことが報告されている ³⁹⁻⁴¹⁾。これらの反応は早いもので 1 時間以内に細胞内の機能に影響を与える ⁴²⁾。さらに、RES の濃度も作用発現の重要なファクターであり、低濃度でのみ作用を示す場合が報告されている ⁴³⁾。そこで RES のスプライシング調節作用の濃度依存性を検討した。その結果、2 μM の低濃度から 100 μM の高濃度まで直線的にエクソン 11 の取り込みを促進し、その後、プラトー域に到達することがわかった。この結果から RES は低濃度から高濃度まで濃度依存的なスプライシング調節作用を示すことが明らかとなった ⁶⁾。

IR は発達段階や組織によって特異的なアイソフォームを発現する (図 1-16)。胎児ではエクソン 11 を欠失した胎児型アイソフォーム (IR-A) が主な産生物で

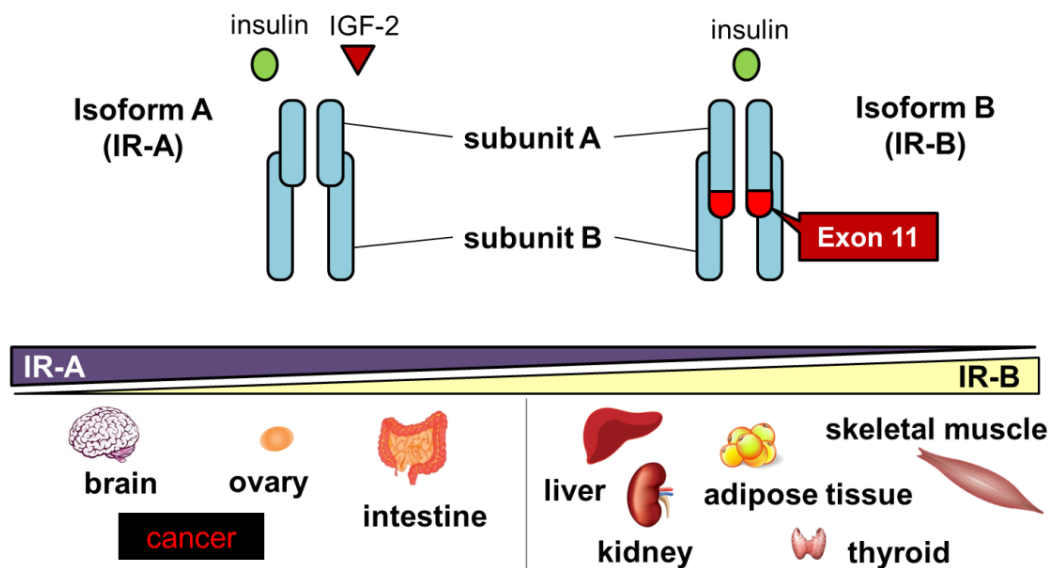


図 1-16 組織による IR の選択的スプライシング様式

あるのに対し、成人ではエクソン 11 を含む成人型アイソフォーム (IR-B) の発現割合が増大する。また、インスリン感受性組織である肝臓や腎臓、骨格筋のような組織では IR-B の割合が多くなっているのに対し、インスリンが細胞増殖の因子として働く癌組織では IR-A の割合が高くなっている。

そこで RES のスプライシング調節作用が HeLa 細胞に特異的なものではないことを確認するため、数種のヒト由来細胞株を用いて同様の実験を行った。スプライシング解析の結果から、SkMC や SH-SY5Y 細胞では予想された通り、由来組織と同様のスプライシングパターンを示した (図 1-10)。しかしながら、HEK293 細胞と HepG2 細胞は高いインスリン感受性をもつ肝臓と腎臓由来であるにも関わらず、Exon11-IR が主な産生物となっていた (図 1-10)。Chettouch ら⁴⁴⁾は、正常肝細胞では Exon11+IR の発現割合が高いが、原発性肝細胞癌などの癌化した細胞ではその割合が低下し、Exon11-IR の割合が増加することを報告している。さらに彼ら⁴⁴⁾は肝細胞癌ではスプライシング制御因子の発現量が異常化することを発見した。また Webster ら^{45, 46)}は HEK293 細胞では CUGBP1 (CUG binding protein 1) や hnRNPA1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1) などのエクソン認識を抑制するスプライシング制御因子が他細胞と比較し、高レベルで発現しており、これが Exon11+IR の割合低下を引き起こすと報告している。これらの結果より、RES は細胞種により、作用の強さは異なるものの、多くの細胞で内在性 IR エクソン 11 のスプライシングを促進することが明らかとなった⁶⁾。

次に異常延長した CUG 反復配列をもつ DM1 患者由来細胞でも RES は効果を示すかどうか検討した。DM1 の病態原因である CUG 反復配列の異常延長は、世代を経るごとに増加する表現促進現象を示す³³⁾。三世代からなる DM1 患者由来細胞 (4 種) を用いて検証を行った結果、RES の添加は全ての患者由来細胞の IR エクソン 11 の取り込みを促進した (図 1-14)。第三世代の患者 III-1 および III-2 は先天的な重症型患者であり、IR エクソン 11 のスプライシング異常は第 1 世代の I-1、第 2 世代の II-1 と比較し、重度であることが確認された (図 1-14)。RES はこのような重症例にも有効であり、エクソン 11 の取り込みを正常のベースライン以上にまで強く促進した (図 1-14)⁶⁾。

以上のことから、RES は IR エクソン 11 における選択的スプライシング異常を修正し、DM1 患者で併発する耐糖能異常に対する治療薬候補となる可能性がある。

第 6 節 小 括

インスリンレセプター (IR) の選択的スプライシングの解析と低分子化合物を用いたスプライシング異常修正を試みた結果、以下の知見を得た。

1. ポリフェノールの一つである RES が HeLa 細胞内在性 IR の選択的スプライシング時にエクソン 11 の取り込みを促進した
2. RES のスプライシング調節作用は細胞培養液に添加 1 時間後には有意にエクソン 11 の取り込みを促進した
3. RES のスプライシング調節作用は濃度依存性があり、最もエクソン 11 の取り込みを促進し、細胞自身への影響が少なかった添加量は 100 μ M であった
4. RES は骨格筋細胞 skeletal muscle cells、肝癌由来細胞 HepG2、繊維芽細胞 fibroblast の内在性 IR エクソン 11 の認識を促進した
5. RES は神経芽腫 SH-SY5Y および HEK293 ではスプライシング調節作用を示さなかった
6. 一つの家系の DM1 患者由来細胞 4 種では表現促進現象が見られ、世代を経るごとに IR エクソン 11 のスプライシング異常が増大していた
7. RES は重症度に関わらず DM1 患者由来細胞における IR エクソン 11 の取り込みを正常以上にまで増大させた

第2章 RES のスプライシング調節作用の検討

RES は赤ワインなどの植物を由来とした食品に含まれるポリフェノールの一つである³⁸⁾。健康への有益な作用が数多く報告されており³⁸⁾、サプリメントとしても市場に流通している。RES の薬理作用はミトコンドリアの機能改善作用やグルコースホメオスタシスの改善、抗炎症作用など広範囲におよぶ^{43,47,48)} (図2-1)。多くの薬理作用の中で、最も関心が寄せられている効果が寿命延長効果である。この効果の発現に関わる重要なシグナルとして長寿遺伝子である SIRT1 (Sirtuin 1) の活性化作用や cAMP ホスホジエステラーゼ阻害作用による AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性化作用が報告されている^{39,40)}。両者の経路はインスリン抵抗性の改善にも関与することが報告されており、II 型糖尿病患者に対する治療標的として大手製薬企業にも注目されている。

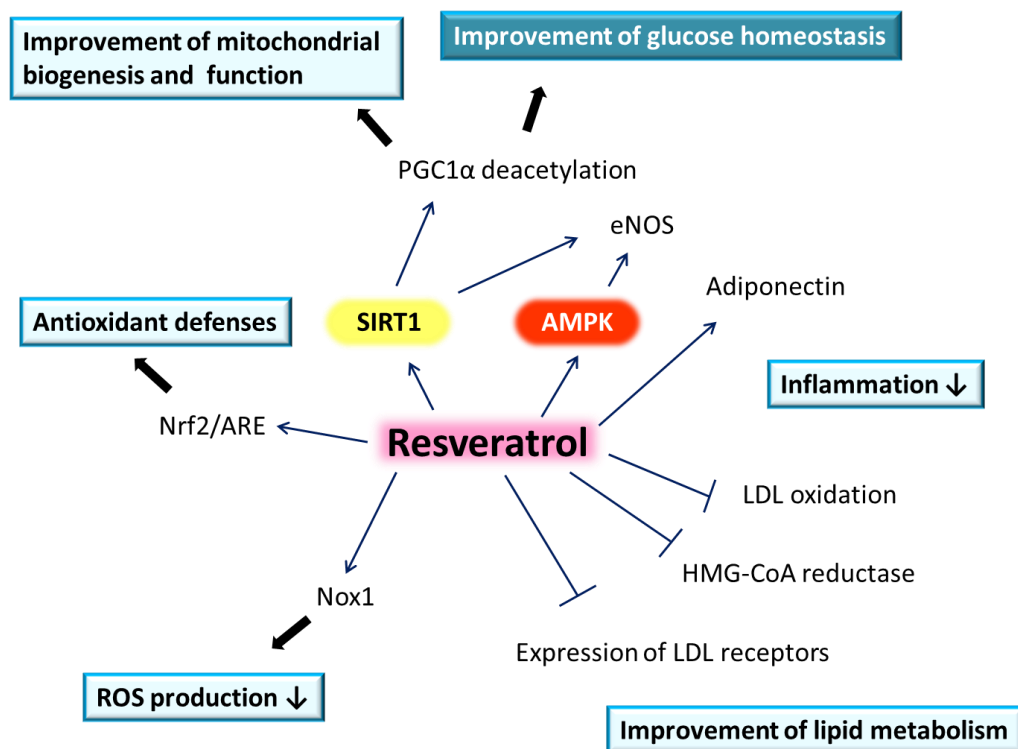


図 2-1 RES の主な薬理作用

ここまでに RES の細胞への添加が IR エクソン 11 における選択的スプライシングを変更し、インスリン感受性の高いアイソフォームの産生を促すことを示した（第1章）。そこで、このスプライシング調節作用を RES の代表的なシグナル経路を活性化させることで再現できるかどうかを検証した（第1節）。

また DM1 のスプライシング異常を引き起こす原因として MBNL1 (muscleblind-like 1) と CUGBP1 (CUG binding protein 1) の関与が知られている。これらはスプライシング制御因子であり、MBNL1 はエクソン 11 の認識を促進し、CUGBP1 はエクソン認識を抑制する、相反した役割を担う。また RES は特定のスプライシング制御因子の発現量に影響を与えることが報告されている²²⁾。第2節と第3節ではスプライシング制御因子と RES のスプライシング調節作用との関連を確かめる実験を行った。

第1節 RES の代表的シグナル経路と IR スプライシング

RES は多くの生体分子を標的とする。cyclooxygenase の阻害作用が発見された後⁴⁹⁾、SIRT1 の活性化作用³⁹⁾、cAMP ホスホジエステラーゼ阻害作用⁴⁰⁾など、多様な薬理作用が報告されてきた。本節では RES の代表的作用である SIRT1 と AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性化のシグナル経路に焦点をあて、IR エクソン 11 認識機構とこれらの経路の関わりについて検討した。

ヒトにおいて、Sirtuin 蛋白質は SIRT1 から SIRT7 までの7種が報告されている⁵⁰⁾。SIRT1 は最も研究が進み、カロリー制限や寿命延長効果との関わりが知られている^{51, 52)}。Howitz らはハイスループットスクリーニングにより RES が SIRT1 の活性化剤となることを見出した。SIRT1 は NAD⁺依存性脱アセチル化酵素の一つであり、広範な組織での代謝ホメオスタシスに関わる。これまでに Sirtuin activating compounds (STACs) として、いくつかの有望な化合物が発見されている。SRT1720 は STACs として見出された合成化合物であり、グルコースホメオスタシスの改善やインスリン感受性の増大、ミトコンドリア機能の回復作用をもつことが報告されている^{53, 54)}。

RES のもう一つの代表的な作用として AMPK 活性化経路がある。AMPK は細胞内の AMP/ATP ratio が増大した（細胞内エネルギーの低下）際に活性化され、グルコースの取り込みや脂肪酸の β 酸化を促進する⁵⁵⁾。そのため、II 型糖尿病を含む代謝異常の治療分野で注目されている⁵⁶⁾。Park ら⁴⁰⁾は RES がホスホジエステラーゼ (PDE) による cAMP の分解を抑制することで AMP/ATP ratio を増大

することを見出しており、本経路を間接的に活性化すると考えられている。アデノシンアナログである AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) は、AMP/ATP ratio を直接増大させることで AMPK を活性化する。そこで AICAR を用いて AMPK 経路と IR エクソン 11 の選択的スプライシング機構の関わりを評価した。

第1項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

第1章の第1節と同様の試薬を使用した。

(2) 使用した細胞

GM17052 細胞 (Normal fibroblast) (Coriell cell repository)

GM04602 細胞 (DM1 patient fibroblast) (Coriell cell repository)

(3) シグナル活性化剤

SRT1720 (Calbiochem)

AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) (和光純薬)

2. 実験方法

2-1 シグナル経路活性化剤の添加

シグナル経路活性化によるスプライシング調節作用を確認するため、SRT1720 は DMSO、AICAR は MQ を用いて、1 μ L 添加時に最終濃度 0.1 μ M、1 mM となるように調製した。

2-2 細胞培養液中への化合物の添加

各々の濃度で調製したシグナル活性化剤を培地に添加した。24 時間培養した後、細胞を回収し、全 RNA 抽出と RT-PCR によりスプライシング解析を行った。

2-3 RT-PCR 反応とスプライシング産物の解析

第1章の第1節と同様の方法で行った

第 2 項 実験結果

1. SIRT1 活性化経路と IR エクソン 11 スプライシング

RES の 1000 倍程度強い SIRT1 活性化作用をもつことが報告されている合成化合物 SRT1720⁵⁷⁾を用いて、IR のエクソン 11 における選択的スプライシング機構と SIRT1 活性化経路との関連性を調べた。検討には RES で効果が得られた健常者由来線維芽細胞および DM1 患者由来線維芽細胞 (GM04602 ; CTG リピート数 1600) を使用した。

図 2-2 に Exon11+IR の割合を半定量解析した結果を示す。第 1 章の第 4 節で示したように DM1 患者由来細胞では健常者由来細胞と比較し、エクソン 11 取り込みの低下が確認された。これらの細胞に対して SIRT1 活性化剤の SRT1720 を添加した結果、健常者および DM1 患者由来細胞の IR スプライシング様式に有意な変化は観察されなかった。これらのことから、RES は SIRT1 非依存的に IR エクソン 11 の認識を促進していることが明らかとなった。

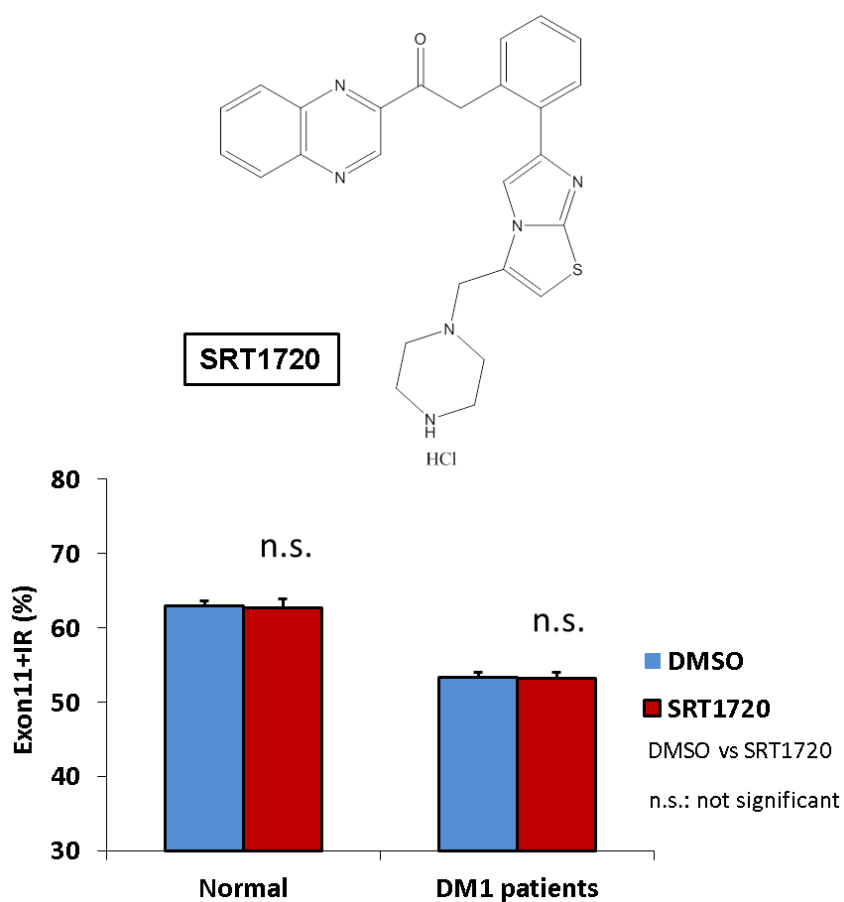


図 2-2 Sirtuin1 活性化と IR エクソン 11 のスプライシング

2. AMPK 活性化経路と IR エクソン 11 スプライシング

次に RES のエクソン 11 の認識促進作用が AMPK 活性化経路に依存するかどうかを検討した。AMPK 経路の活性化にはアデノシンアナログである AICAR を用いた。効果の検討には SRT1720 と同様の方法で行い、健常者由来線維芽細胞および DM1 患者由来線維芽細胞 (GM04602 ; CTG リピート数 1600) を使用した。

図 2-3 にこれまでと同様に Exon11+IR の割合を半定量解析した結果を示している。AICAR の添加は RES で効果が確認されている健常者由来細胞および DM1 患者由来細胞の IR エクソン 11 における選択的スプライシングに有意な変化を与えなかった。これらのことから、RES は AMPK 活性化経路非依存的に IR エクソン 11 の認識を促進していることが明らかとなった。

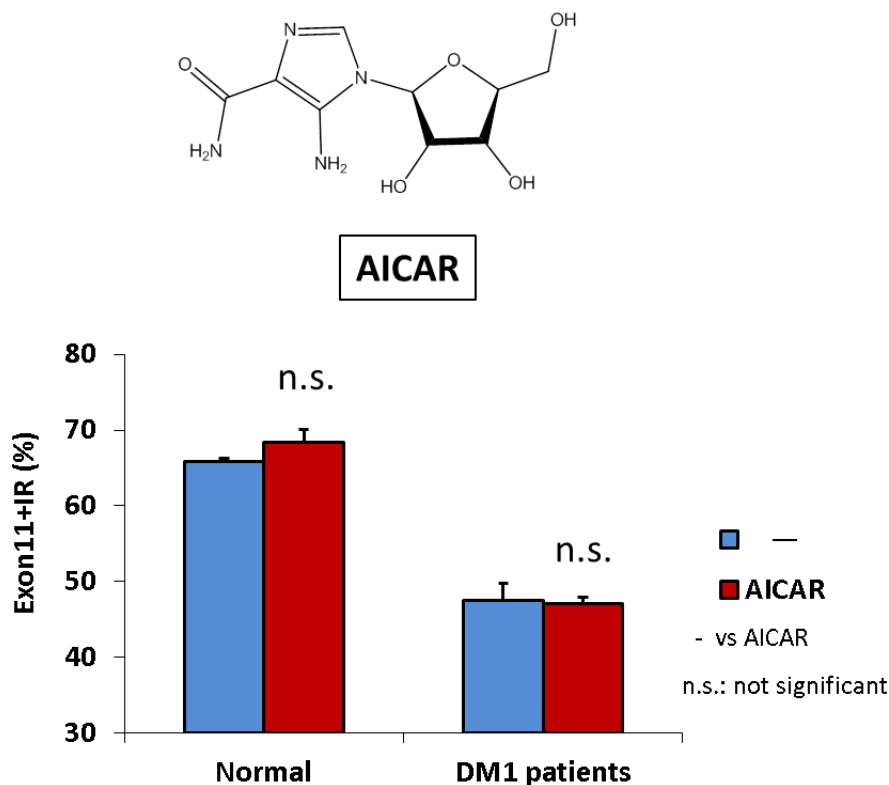


図 2-3 AMPK 活性化と IR エクソン 11 のスプライシング

第2節 MBNL1 のノックダウンと IR スプライシング

DM1 発症原因となる異常延長した CTG 反復配列から転写された mRNA は CUG からなるヘアピン様の二次構造体を形成する。これは核から細胞質への移行を阻害し、核内フォーカスとして核に局在する。MBNL1 (muscleblind-like 1) は CUG 配列と親和性が高いスプライシング制御因子であり、異常転写産物に結合することで機能不全になる (図 2-4)。これは、多くの遺伝子におけるスプライシング異常を引き起こす。IR エクソン 11 は MBNL1 によってエクソン認識が促進されるため、この機能不全はエクソン 11 の認識低下を招く。そこで本節では、siRNA を用いて MBNL1 遺伝子の発現を抑制し、エクソン 11 のスキッピングを誘導させた。そこに RES を添加することでスプライシング調節作用と MBNL1 との関わりについて検討した。

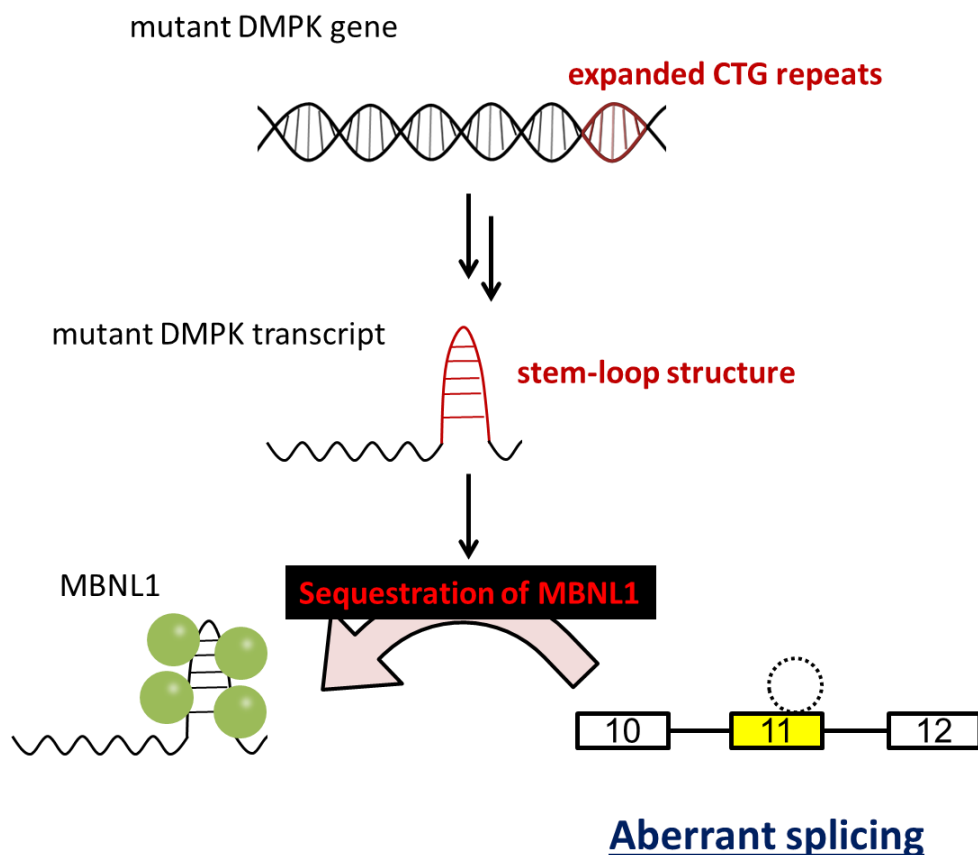


図 2-4 DM1 患者における MBNL1 機能不全の概略

細胞内におけるスプライシング制御因子の発現量は選択的スプライシング様式と密接に関わる。第1章の第1節で示したように組織部位でのスプライシング制御因子の発現量の違いはIRエクソン11のスプライシング様式に大きく影響する。これまでにRESは特定のスプライシング制御因子の発現量を変化させることが報告されている²²⁾。シクロヘキシミド (CHX) は蛋白質合成の転移過程に干渉することで新規蛋白質の翻訳を阻害する⁵⁸⁾。そこでRES添加前にCHXを添加することで、新規蛋白質の合成を停止させた後、RESによるスプライシング調節を行った。これにより、RESのスプライシング調節作用が新規蛋白質の合成に依存するかどうかを確認した。

第1項 実験試薬と実験方法

1. 実験試薬

(1) siRNA を用いた MBNL1 のノックダウン

Stealth™ RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen)

MBNL1 siRNA

5'-AACACGGAAUGUAAAUUUGCAtt-3'

3'-ttUUGUGCCCUUACAUUUAAACGU-5'

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

(2) 細胞培養試薬

細胞培養に関する試薬は第1章と同様の方法で行った。

(3) 使用した細胞

HeLa 細胞 (ATCC)

(4) 低分子化合物

RES (和光純薬)

Cycloheximide (CHX) (SIGMA-ALDRICH)

2. 実験方法

2-1 siRNA を用いた MBNL1 のノックダウン

i) HeLa 細胞の培養

12 well プレートを用いて、第1章の第1節と同様の方法で培養した。

ii) siRNA の transfection

各 well の HeLa 細胞に対して最終濃度 50 nM となるように control siRNA および MBNL1 siRNA を Lipofectamine2000 により導入した。MBNL1 siRNA は細胞へ

の添加により、ノックダウンすることが確認されている配列で構成されるものを使用した。100 μ L の Opti-MEM と siRNA の混合液、100 μ L Opti-MEM と 3 μ L の Lipofetamine2000 の混合液を混ぜ合わせ、室温で 20 分間静置した。その間に細胞の培地を除去し、PBS で 2 回洗浄後、各 well に Opti-MEM を 800 μ L 加えた。そこへ siRNA と Lipofectamine2000 の混合液を 200 μ L 添加し、5 時間培養した。

2-2 薬物の添加

トランスフェクション後、培地を除去し、5% FBS 含有 DMEM 1 mL を加え、RES 100 μ M を加えて 24 時間培養した。

2-3 新規蛋白質合成阻害実験

蛋白質合成阻害剤には Cycloheximide (CHX) を使用した。DMSO に溶解させ、最終濃度 5 μ M となるように HeLa 細胞に添加した。この時、DMSO の最終濃度は 0.1% となるようにした。24 時間培養後、RES を添加し、8 時間後に RNA を回収した。

2-4 RT-PCR 反応とスプライシング産物の解析

第 1 章と同様の試薬及び方法を用いて実験を行った。

第2項 実験結果

1. MBNL1 ノックダウン時の RES のスプライシング調節作用

siRNA を利用した MBNL1 のノックダウン時の HeLa 細胞における IR エクソン 11 の選択的スプライシングの変化を確認した。図 2-5 に示すように siRNA を用いて MBNL1 のノックダウンさせた場合、Exon11+IR の割合は 53.4% から 31.2% まで強く低下することが確認された（水色→水色斜線）。DM1 患者では MBNL1 の核内における局在異常が起こり、本来のスプライシング調節機能が行えずに機能不全となる。これにより、DM1 患者の IR はエクソン 11 を欠失した mRNA が主な産生物となる⁴⁶⁾。

そこで RES が MBNL1 を標的分子としてスプライシング調節作用を示しているかどうかを検討するため、上記の MBNL1 をノックダウンさせた細胞培養液中に RES を添加した。その結果、MBNL1 のノックダウンにより低下していた Exon11+IR の割合は 60.5% まで、回復された ($p < 0.05$)（図 2-5）。しかしながら、MBNL1 をノックダウンしていない細胞へ RES を添加した際は Exon11+IR の割合を 54.1% から 71.4% まで増大させたのに対し、MBNL1 ノックダウン時では 35.3% から 57.2% までしかエクソン 11 の取り込みを増大させることは出来なかった。

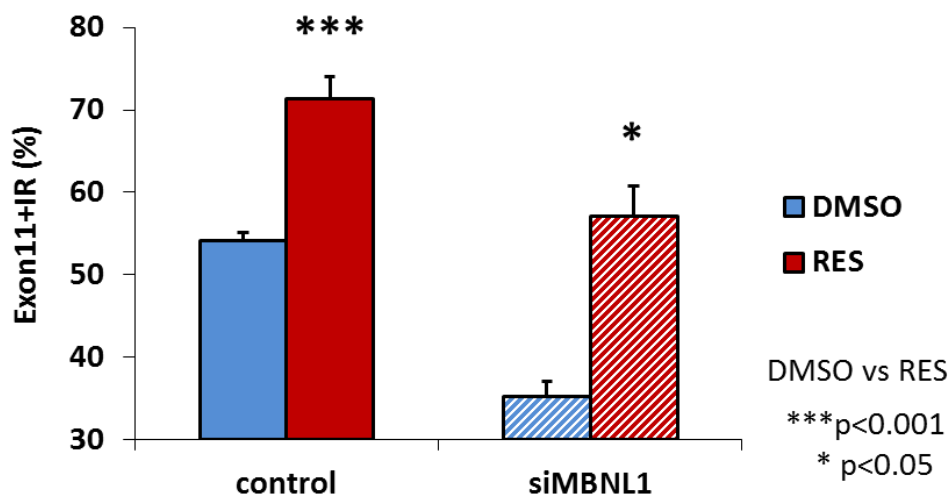


図 2-5 MBNL1 ノックダウン時の RES のスプライシング調節作用

2. RES のスプライシング調節作用への新規蛋白質合成の関与

RES がスプライシング制御因子の発現量等の新規蛋白質合成に影響を与えることで IR のスプライシング様式を調節しているかどうかを確かめるため、CHX を用いた蛋白質合成阻害実験を行った。これまでに RES はスプライシング制御因子である ASF/SF2 や hnRNPA1 の発現量を増大することが報告されている²²⁾。

図 2-6 に Exon11+IR の半定量解析結果を示す。CHX の細胞培養液中への添加により、新規蛋白質合成を停止させた結果、Exon 11+IR の割合は 52.5% から 16.5% まで強いエクソン認識低下が引き起こされた ($p < 0.001$)。

次に CHX による新規蛋白質合成阻害環境下に RES を添加した場合の IR エクソン 11 のスプライシングを観察した。その結果、RES は蛋白質合成に関わらず、Exon11+IR の割合を 16.5% から 61.9 % に有意に増大させた ($p < 0.001$) (図 2-6)。

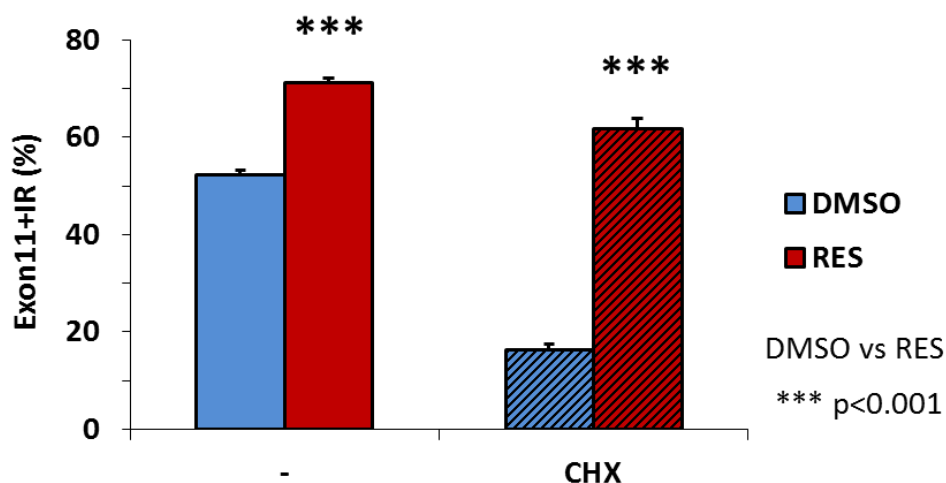


図 2-6 CHX 添加時の RES のスプライシング調節作用

第3節 インترون 10 配列への CUGBP1 の結合と RES の阻害作用

DM1 患者における IR エクソン 11 のスプライシング異常の原因は MBNL1 の機能不全だけでなく CUGBP1 の関与が報告されている。CUGBP1 はスプライシング制御因子の一つであり、一本鎖 CUG 配列への高い結合性をもつ。しかし、CUG 配列の二本鎖からなるステムループ構造への結合性は低く、MBNL1 のような DM1 患者における細胞内局在異常は生じない^{59, 60)}。CUGBP1 は protein kinase C (PKC) による過剰リン酸化や安定性の増大を受けるため、定常量が増大することで DM1 患者におけるスプライシング異常を引き起こす⁶¹⁾(図 2-7)。

CUGBP1 は U と G が多く存在する UG-rich motif への結合性が高いことが知られている。そこで IR エクソン 11 近傍の CUGBP1 が結合する可能性が高い配列領域を探した(第1項)。そして *in vitro* binding 反応を行い、western blot 法により、CUGBP1 の結合を確認した(第2項)。最後に RES が CUGBP1 の RNA への結合性に影響を与えるかどうかを検討した(第3項)。

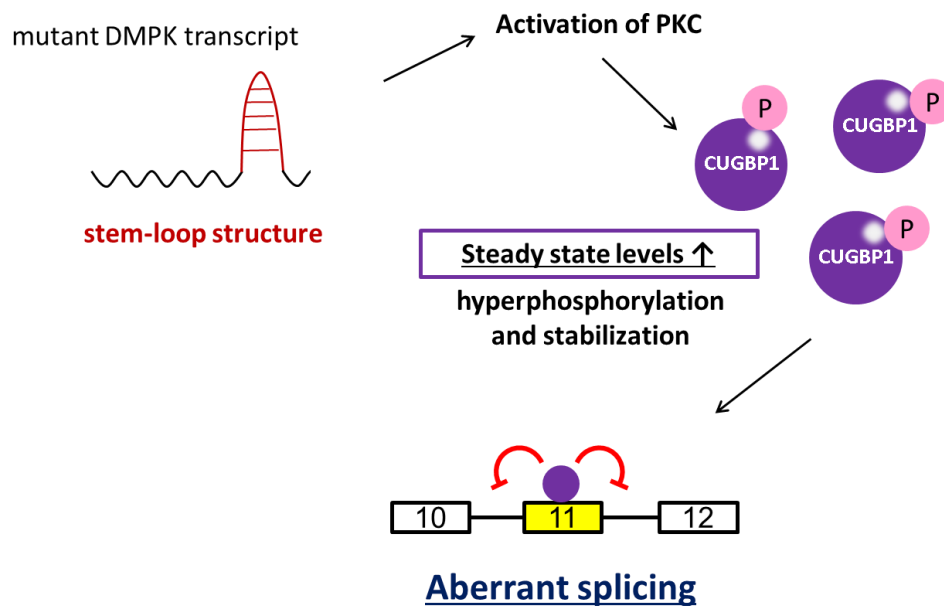


図 2-7 CUGBP1 の定常レベル増大が引き起こすスプライシング異常

第1項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) *In vitro* binding 反応

IR i10-e11 probe (50 pmol/μL)

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
(SIGMA-ALDRICH)

塩化カリウム (和光純薬)

塩化マグネシウム (和光純薬)

Dithiothreitol (和光純薬)

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (同仁化学研究所)

HNE (HeLa nuclear extract) (CILBIOTECH)

Glycerol (和光純薬)

IGEPAL CA630 (SIGMA-ALDRICH)

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

1× SDS running buffer

アクリルアミド (和光純薬)

ビスアクリルアミド (和光純薬)

過硫酸アンモニウム (ammonium persulfate; APS) (和光純薬)

ドデシル硫酸ナトリウム (和光純薬)

TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) (和光純薬)

ブチルアルコール (和光純薬)

(3) Western blot 法

メタノール (和光純薬)

Amersham Hybond 0.2 μm PVDF (GE healthcare)

スキムミルク (和光純薬)

CUGBP1 antibody (3B1) (Santa Cruz)

Mouse IgG HRP conjugated (R&D systems)

Pierce Western blotting substrate plus (Thermo Scientific)

2. 使用機器

電気泳動槽 AE-6500 (ATTO)

ブロッキング装置 422 electro-eluter (Bio-Rad)

3. 使用したソフトウェアとデータベース

i) ソフトウェア

「Human Splicing Finder 3.0」

<http://www.umd.be/HSF3/>

ii) データベース

「Ensembl genome browser」

<http://asia.ensembl.org/index.html>

4. 実験方法

4-1 IR の塩基配列とブランチ部位の予測

IR の塩基配列は Ensembl genome browser よりヒト由来インスリンレセプター insulin receptor (INSR: ENSG00000171105、NM_000208) の遺伝子配列を取得した。またイントロン 10 のブランチ部位予測には、オープンソースの Human Splicing Finder 3.0 を利用した。

4-2 *In vitro* binding 反応

RNA プローブの設計

IR i10-e11 RNA ; 5'- GUC CUC AAA GGC GUU GGU UUU GUU UCC ACA
GAA AAA CC-3'

i) *In vitro* binding 反応

合成 IR i10-e11RNA を binding buffer (Tris-HCl pH 8.0 40 mM, KCl 30 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, IGEPAL CA630 0.01% (w/v)) 中で HeLa 細胞核抽出液と 30℃ で 20 分間反応させた。得られた反応液を UV 照射した後、2×サンプル緩衝液を加えて混和し、95℃で 5 分間加熱後、氷冷して電気泳動用サンプルとした。

4-3 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

4×分離用ゲル緩衝液 1.75 mL、30% アクリルアミド溶液 3.0 mL、超純水 2.0 mL、10% APS 100 µL、TEMED 7 µL を混和し、ゲル作製のガラス板に流し込んだ。空気とゲル表面の接触を断つため、ブチルアルコールを重ねた。ゲルが完全に重合したことを確認した後、ブチルアルコールの除去と超純水でゲル表面を洗浄した。次に 4×濃縮用ゲル緩衝液 0.75 mL、30% アクリルアミド溶液 0.4 mL、超純水 1.8 mL、10% APS 45 µL、TEMED 3 µL を混和した溶液を分離用ゲルの上に重ねた。ウェル作製コームを差し、ゲルを完全に重合させた。ゲルは 1× SDS ポリアクリルアミド泳動緩衝液を満たして電気泳動槽 (ATTO) に固定し、調製した各電気泳動用サンプルをアプライして 20 mA の定電流で 75 分間電気泳動

した。各蛋白質の分子量を確認するため、同時に蛋白質分子量マーカーを泳動した。

4-4 Western blot 法

メタノールにつけて親水化処理をした polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Hybond-P) を 1×Transfer 緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% メタノール) に約 5 分間浸し、平衡化させた。電気泳動後のゲルとメンブランを重ねてトランスファーカセットおよびトランスファー装置 (Bio-Rad) にセットし、1×transfer 緩衝液中で 300 mA の定電流で 70 分間トランスファーを行った。トランスファー終了後、転写後のメンブランを 5% スキムミルク含有の 1×TBS-T (ブロッキング溶液) 10 mL に浸し、室温で 1 時間ブロッキング反応を行った。ブロッキング溶液を除いた後、1 次抗体 (anti-CUGBP1) をブロッキング溶液で 500 倍希釈した 1 次抗体反応液に PVDF 膜を浸して 1 時間室温で振盪した。1 次抗体反応終了後、PVDF 膜を TBS-T で 10 分 3 回振盪させて洗浄した。2 次抗体 (HRP conjugated anti-mouse IgG) をブロッキング溶液で 1000 倍希釈した 2 次抗体反応液に PVDF 膜を浸し、60 分間室温で振盪した。2 次抗体反応終了後、PVDF 膜を TBS-T で 10 分 3 回振盪させて洗浄した。TBS-T を除去した後、化学蛍光検出キット (Western blotting substrate plus) の A 液 1.2 mL と B 液 30 μ L の混合液をメンブレンに 5 分間反応させ、HRP による化学発光反応を行った。化学発光は ImageQuant LAS4000 を使用し検出した。

第2項 実験結果

1. IR エクソン 11 領域と CUGBP1

IR のエクソン 11 内には CUGBP1 が結合するシス配列が存在することが報告されている⁴⁶⁾。MBNL1 の結合配列は選択的スプライシングを受けるエクソン内に多く存在するのに対し、CUGBP1 の結合配列は選択的スプライシングを受けるエクソン近傍のイントロン領域に多いことが知られている⁶²⁾。そこで IR エクソン 11 近傍配列から CUGBP1 が結合しやすいシス配列の有無を確認した。図 2-8 に IR エクソン 11 近傍の上流の塩基配列を示した。

配列の確認を行った結果、エクソン 11 の上流配列に CUGBP1 の結合性が高いと報告されている U と G が連続する領域 (GUU GGU UUU GUU U) の存在が確認された⁶³⁾。これはイントロン 10 のスプライシング反応の進行に関わる polypyrimidine tract (PTT) に位置する⁴⁶⁾。これまでに CUGBP1 が PTT に結合することで PTB (polypyrimidine tract binding protein) の結合を競合的に阻害し、エクソン認識に影響を与えることが報告されている⁶⁴⁾。そこで次項ではエクソン 11 上流領域への CUGBP1 の結合を確認した。

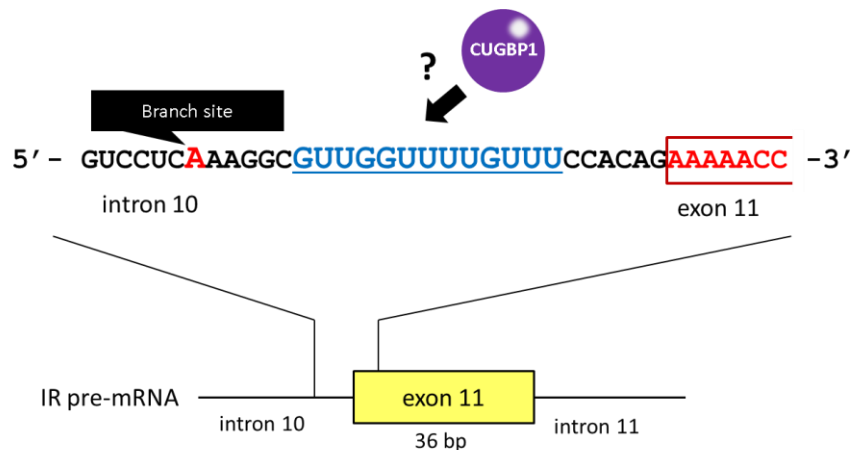


図 2-8 イントロン 10 内の CUGBP1 類似コンセンサス配列

2. CUGBP1 と IR エクソン 11 上流配列との相互作用

CUGBP1 と IR エクソン 11 上流領域との相互作用を確認するため、*in vitro* binding 反応と western blot 法を利用した実験を行った。まず UG-rich 配列と考えられる領域を含むイントロン 10 とエクソン 11 の一部配列からなる 38 mer の RNA プロブ (IR i10-e11 RNA) を設計した。これと CUGBP1 を含む細胞核抽出液を *in vitro* で反応させ、RNA-蛋白質複合体の形成を行った後、紫外線照射により複合体内に共有結合を形成させた。

CUGBP1 抗体を用いた western blot 法の検出結果を図 2-9 に示した。CUGBP1 (約 54kDa) の band は蛋白質のみのレーンと IR i10-e11 RNA と核抽出液を反応させたサンプルの両レーンで観察された。しかしながら、複合体形成を行ったサンプルのレーンでは約 70kDa 付近にもう一つの band が観察された。*In vitro* binding 反応に利用した RNA プロブは約 12 kDa であることから、架橋形成された CUGBP1-RNA 複合体の分子量は約 66 kDa (54 + 12 kDa) であることが予想される。また、エクソン 11 下流配列を用いた結合反応実験を行い、CUGBP1 は下流配列には結合しないことを確認した。これらの結果より、図 2-10 に見られた band は CUGBP1 が特異的にエクソン 11 の上流配列に結合することを示唆している。

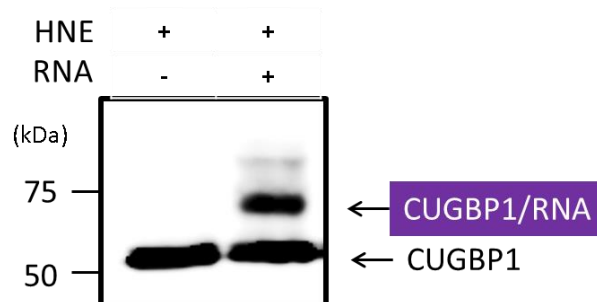


図 2-9 CUGBP1 と IR エクソン 11 近傍配列との複合体形成

3. RES の CUGBP1 結合阻害作用の検証

CUGBP1 はエクソン認識を抑制するスプライシング制御因子であることから、この CUGBP1-RNA 複合体の形成が阻害された場合、エクソン認識は促進されることになる。そこで RES が CUGBP1 のエクソン 11 上流領域への結合を阻害するかどうかを検討した。RES を *in vitro* binding 反応液中に加え、複合体形成反応を行った後、western blot 法で CUGBP1 の RNA に対する結合性の影響を検討した。

既を示したように、CUGBP1 は IR i10-e11 RNA に結合していた (図 2-10) 。この反応液に対して RES を 20 nmol、50 nmol、100 nmol 加え、濃度依存性を検討した。その結果、図 2-10 に示すように RES の添加は CUGBP1 の結合を濃度依存的に阻害することが確認された。

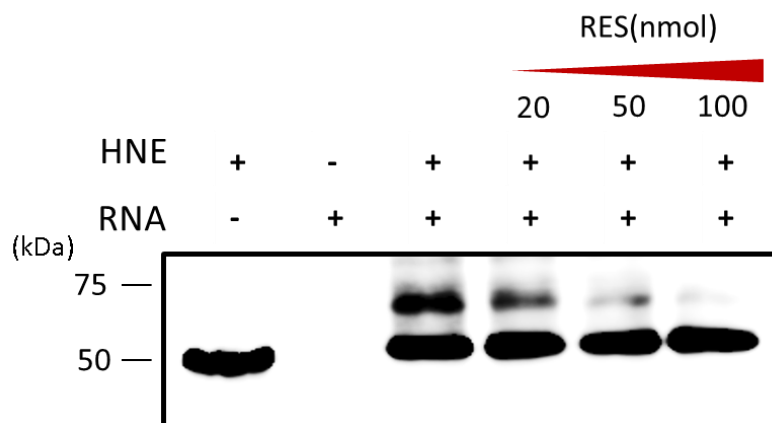


図 2-10 RES の CUGBP1 結合阻害

第4節 考 察

これまでに RES は脊髄性筋萎縮症の治療標的である SMN2 (Survival motor neuron 2) やスプライシング制御因子である SRp20、protein kinase C delta の選択的スプライシングや TNF- α pre-mRNA の恒常的スプライシングに影響を与えることが報告されている^{22, 65, 66)}。さらに最近ではポンペ病 (糖原病 II 型) の α 1,4 グリコシダーゼ (GAA) 遺伝子変異による異常スプライシングを修正することが報告されている⁶⁷⁾。RES が示す多くの薬理作用には SIRT1 の活性化が関与している。SIRT1 活性化は細胞内における数種のシグナル経路の活性化を引き起こす⁵³⁾。

そこで SIRT1 の強力な活性化剤である「SRT1720」を用いて、Sirtuin 経路の IR スプライシングへの関与を確かめた。しかしながら、SRT1720 による SIRT1 の活性化は IR のスプライシングに有意な変化を与えなかった (図 2-2)。このことから RES のスプライシング調節作用は SIRT1 活性化およびその下流の経路とは関与しないことが明らかとなった⁶⁾。

RES が標的とするもう一つのシグナル経路として AMPK (AMP キナーゼ) 活性化経路がある。AMPK は細胞のエネルギー恒常性の最上位因子として重要な役割を担う。細胞への ATP 供給が低下するような細胞内ストレスに応答し、活性化することが知られている⁵⁵⁾。最近では SIRT1 との互いの機能制御が報告されており^{68, 69)}、RES の多様な薬理作用に大きく関わると考えられている。そこで、アデノシン一リン酸 (AMP) のアナログである「AICAR」を用いて、AMPK を活性化による IR エクソン 11 における選択的スプライシングへの影響を検討した。しかしながら、Sirutin 経路と同様にスプライシングは AMPK 経路の活性化による有意なスプライシング変化は認められなかった (図 2-3)。2016 年に Baghdoyan ら⁷⁰⁾は糖尿病治療薬である Metformin が IR エクソン 11 の取り込みを促進させることを報告した。Metformin は RES と同様に AMPK の強い活性化剤として知られている⁷¹⁾。Banghdoyan ら⁷⁰⁾は DM1 患者由来の中間中胚葉細胞を用いて AICAR 添加による IR エクソン 11 のスプライシングへの影響を検討しているが、著者らと同様に有意な差は認められなかった。著者と Banghdoyan らは異なる細胞で検討していることから、この結果は細胞種によるものではないことを示唆する。これらの結果から、RES のスプライシング調節作用は AMPK 活性化経路と関わらず、他の経路を介して作用発現していると考えられる⁶⁾。

スプライシング反応は正負の総和とバランスにより最終的なスプライシング様式が決定する。スプライシング制御因子のみに注目した場合、エクソン認識

を促進するためには二つの作用が考えられる。一つ目がエクソン認識を促進するスプライシング制御因子の機能が高まることでエクソンの認識が強まる場合である。そして、もう一方がエクソン認識を抑制する蛋白質の機能を抑えることでエクソン認識が強まる場合である。DM1の発症に関わるスプライシング制御因子にMBNL1とCUGBP1がある。MBNL1はIRのエクソン11下流領域のイントロン内に結合し、エクソン認識を促進することが知られている⁴⁶⁾。そこでsiRNAを用いたRNAiによりMBNL1のノックダウンとそれによるIRエクソン11のスプライシング変化を確認した。siRNAによるMBNL1のノックダウンではExon11+IRの割合を53.4%から31.2%にまで低下させた(図2-5)。そして、MBNL1をノックダウンした細胞にRESを添加した場合、Exon11+IRの割合は35.3%から57.2%にまで増大した。この結果はRESがMBNL1の関与しない経路でIRエクソン11の選択的スプライシングを調節している可能性を示唆した。

これまでにRESは幾つかのスプライシング制御因子の発現を上昇させることが報告されている²²⁾。そこでRES添加により、細胞内の新規蛋白質合成が促進もしくは抑制されることでスプライシング制御因子の発現量が変化し、スプライシング様式が変化しているのかどうかを検証するため、シクロヘキシミド(CHX)を用いた簡易的な新規蛋白質合成阻害実験を行った。CHXの添加は蛋白質合成の転移過程に干渉することで新規蛋白質の翻訳を阻害する。CHXにより、新規蛋白質の合成を阻害した結果、Exon 11+IRの割合は52.5%から16.5%までの強い低下が見られた(図2-6)。しかしながら、RESを添加すると、これまでと同様のエクソン11の取り込み促進作用が認められた。これらの結果から、RESのスプライシング調節作用は新規蛋白質合成に依存せず、蛋白質の機能に影響を与えることで作用を発現していることが推察される。さらに、これまでのRESの効果を確認した全ての細胞における結果と比較し、Exon11+IRの増大が最も強く観察された(16.5→61.9%)。

次にRESのスプライシング調節作用とCUGBP1の関与について実験を行った。OhnoらはHITS-CLIP法により、CUGBP1は選択的スプライシングを受けるエクソンの配列内よりも、その近傍のイントロン配列に結合することが多いと報告している⁶²⁾。さらにエクソンの上流に結合する場合と下流に結合する場合でCUGBP1のスプライシング反応における機能が変化することが知られている。上流に結合する場合はエクソンの認識を抑制し、下流に結合する場合はエクソン認識を促進する⁶²⁾。そこでIRエクソン11近傍のCUGBP1が結合する配列を予測し、エクソン11の上流配列にCUGBP1が結合する領域として報告があるUG-rich領域を発見した(図2-8)。In vitro binding反応とウェスタンブロッティ

ングにより、この領域を含む RNA プローブには CUGBP1 が結合することを見出した (図 2-9)。この領域は *in silico* で予測されるブランチ部位と近接しており、CUGBP1 の結合はスプライシング反応の進行に影響を与える可能性がある。

そこで RES が CUGBP1 の RNA への結合性に影響を与えるかを検証し、CUGBP1 の結合を濃度依存的に阻害することを見出した (図 2-10)。これらの結果から、RES はエクソン認識を抑制する CUGBP1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害することで作用を示している可能性が考えられる (図 2-11)。

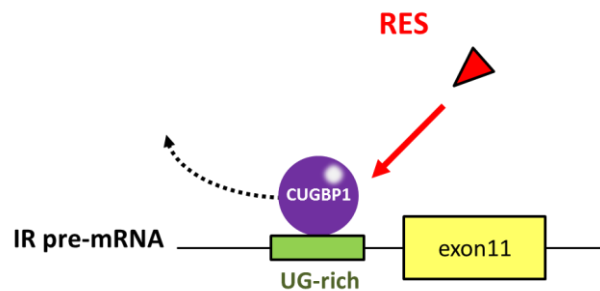


図 2-11 RES の CUGBP1 結合阻害

しかしながら、RES で効果が得られていない HEK293 においても CUGBP1 が高発現しており、これがエクソン 11 の取り込み割合の低下を引き起こしていると考えられている⁴⁶⁾。そのため、RES のスプライシング調節作用が CUGBP1 の結合阻害のみで現れているのであれば、HEK293 においても効果が得られても良い。前述のとおり、RES は多様なシグナル経路に関わる。DM1 患者では CUGBP1 は Protein kinase C (PKC) α/β II によって過剰リン酸化されることにより、安定化している⁶¹⁾。RES は PKC 阻害剤としても報告があるため^{41, 72)}、CUGBP1 のリン酸化を防ぎ、安定化を阻害している可能性も考えられる。そのため、RES の効果は CUGBP1 の結合阻害と同時に他の経路を介した作用も関与していると考ええる。

本章では RES のスプライシング調節作用は代表的なシグナル経路に依存せず、発現していることが明らかとなった。さらに病態原因の一つである CUGBP1 の RNA への結合を阻害することで、スプライシング調節作用を示す可能性を見出した。

第5節 小 括

RES のスプライシング調節作用を検討した結果、以下の知見を得た。

1. RES の代表的な活性化経路の SIRT1 経路の活性化は IR エクソン 11 の選択的スプライシングに影響を与えなかった
2. RES が活性化することが知られている AMPK の活性化は IR エクソン 11 の選択的スプライシングに影響を与えなかった
3. エクソン認識を促進する制御因子の MBNL1 ノックダウン環境でも RES はエクソン 11 の取り込みを促進したことから、MBNL1 に依存しない反応であることがわかった
4. CHX の添加による新規蛋白質合成阻害環境でも RES はエクソン 11 の取り込みを促進したことから、RES の効果は制御因子の発現量増大などの新規蛋白質合成とは関与しないことがわかった
5. *In vitro* binding 反応の結果から、IR エクソン 11 の上流（イントロン配列内）に CUGBP1 が結合することを明らかにした
6. RES は CUGBP1 の RNA への結合を濃度依存的に阻害していたことから、この結合阻害作用が IR エクソン 11 の選択的スプライシングと関わっている可能性がある

第3章 スプライシング制御因子同定法の構築とその応用

pre-mRNA 上にはスプライシングを制御するためのシス配列が存在する。スプライシング制御因子がエクソン認識を促進する配列 (exonic splicing enhancer; ESE、intronic splicing enhancer; ISE) や抑制する配列 (exonic splicing silencer; ESS、intronic splicing silencer: ISS) に結合し、スプライシング反応は調節される。エクソン認識を促進する因子として SR (serine/arginine-rich) 蛋白質が知られており、RNA 認識モチーフ (RNA recognition motif; RRM) と Arg/Ser に富む RS ドメインを有する。RRM を介して pre-mRNA に結合し、RS ドメインが U1 snRNP の U1-70K や U2AF35 と複合体を形成することでエクソン認識を高めると考えられている⁷³⁻⁷⁶。一方、エクソン認識を抑制する蛋白質として hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) が知られている^{77,78}。hnRNPs は少なくとも 20 種存在することが知られており、その多くは SR 蛋白質やスプライシング基本因子と拮抗することでエクソン認識を抑制する (図 3-1)。

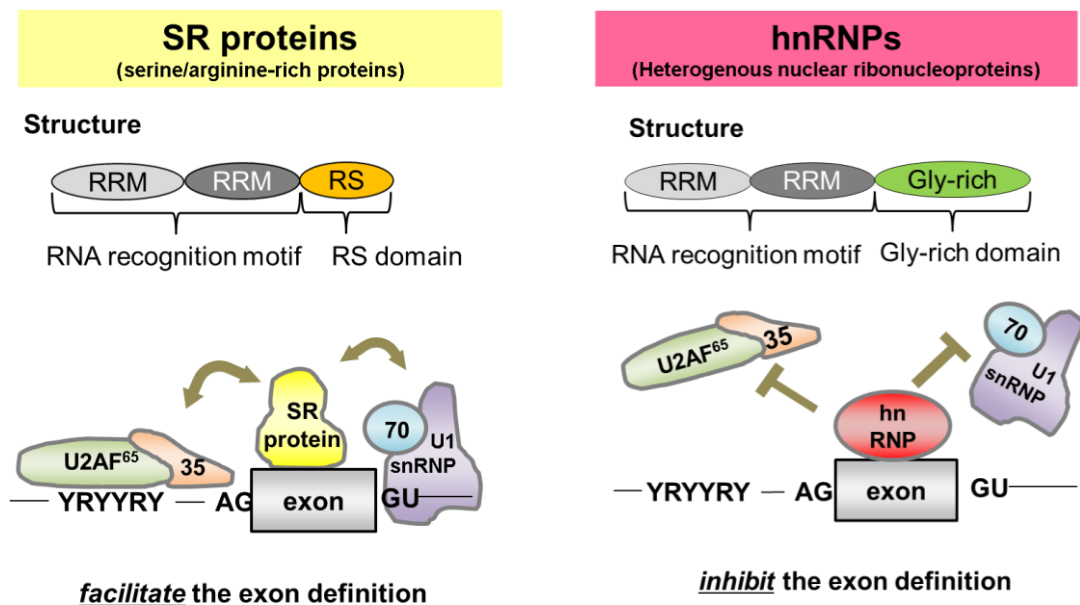


図 3-1 スプライシング制御因子の構造と機能

スプライシング制御因子の同定は複雑なスプライシング機構の理解だけでなく、標的分子の発見や治療薬開発へとつながる。これを実現するためには、エクソン認識に関わる未知蛋白質を網羅的に解析する手法が必要となる。質量分析法は未知分子の同定および網羅的解析が可能であるため、本章の目的を遂行する上で有用な手法と考えた。

イオン化法および質量分析装置の選択

質量分析法は広範な生体分子を分析することが可能であり、分子そのものから構造情報を得ることができるため、未知分子の同定に利用できる。現在では、多成分を一斉に測定することができる点から、生体分子群の網羅的解析法として（プロテオミクスやメタボロミクス）活躍している^{79, 80)}。

質量分析を行うためには、測定サンプルがイオン化される必要があり、その手法として様々な方法が開発されている。電子イオン化 (electron ionization; EI) 法、化学イオン化 (chemical ionization; CI) 法、高速原子衝撃 (fast atom bombardment; FAB) 法、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) 法、大気圧化学イオン化法 (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) および本稿で用いたエレクトロスプレーイオン化

(electrospray ionization; ESI) 法などがある⁸¹⁾。これらのイオン化法の中から測定試料の性質や目的に応じて最適な方法を選ぶ必要がある。測定質量範囲は EI 法や CI 法では 1000 Da 程度以下、FAB 法は 5000 Da 程度以下であり、主に低分子量の試料測定に利用される。MALDI 法や ESI 法は核酸や蛋白質などの高分子量の生体試料の測定が可能であり、生化学や分子生物学分野の大きな発展に寄与してきた。

本章の目的はエクソン認識に関わるスプライシング制御因子を同定することであり、高分子量の蛋白質を測定できる MALDI 法や ESI 法が必要となる。MALDI 法は分子量が 100 万程度までの蛋白質を酵素消化することなく、測定することが可能であり、最も高質量領域まで測定することができる。しかしながら、試料と固体マトリックスを混合してイオン化を行うため、試料中に含まれる夾雑ピーク全てが同時に検出されてしまう。一方、ESI 法は液体クロマトグラフィー (Liquid chromatography; LC) と接続することによって、カラムを用いた試料の分離が可能になる (LC-MS 法)。試料を含む液体を細管に通して高電圧を印加し、帯電した微細な液体として噴霧させた後、溶媒を蒸発させることで試料分子の多価イオンが生成する⁸²⁻⁸⁴⁾。マススペクトルは縦軸にイオン強度を示し、横軸は m/z を示す。すなわち、測定質量範囲を超える蛋白質やペプチドな

どの高分子量試料も多価イオンとなることで m/z が小さくなるため、測定することが可能である。前述の通り、スプライシング反応には多くの蛋白質が単独もしくは複合体を形成して関与する（図 3-1）。そのため、本研究では LC との接続が容易な ESI 法を採用することにした。さらにエレクトロスプレーを小型化したマイクロスプレーチップを使用し、より小さな液滴の生成と少ない流量による高感度化を図った（図 3-2）。

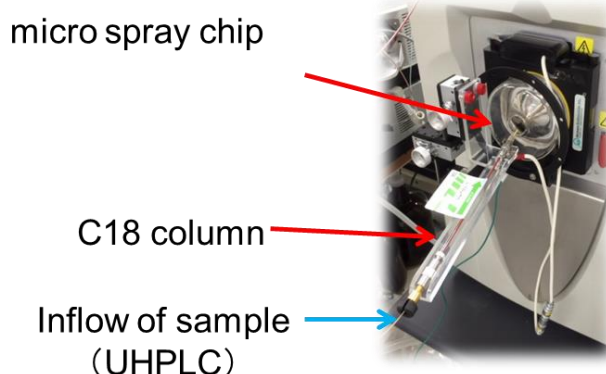


図 3-2 ペプチドイオンの分析に使用したイオンソース

質量分析法とデータベースを利用する蛋白質の同定手法は MS/MS 解析を利用する場合と利用しない場合で大きく二つに分けられる。MS/MS 解析を利用しない手法は「Peptide mass fingerprinting (PMF) 法」と呼ばれ、蛋白質を特異的な酵素で断片化し、生成される断片ペプチドの質量リストをデータベース検索に利用する⁸⁵⁾。一方、MS/MS 解析を利用する手法は「Product ion mass fingerprinting (PIMF) 法」と呼ばれ、本研究で利用した方法である。PMF 法は多数の蛋白質が混在する試料の測定には不向きであるが、PIMF 法は問題なく利用することができる。原理は本節で後述する。

質量分析部には本学がもつリニアイオントラップ (LTQ) とオービトラップ（電場型フーリエ変換質量分析装置）のハイブリッド質量分析システムを採用した。質量分析部となるオービトラップは非常に高い質量分解能（30000）と分析精度をもつ。これとリニアイオントラップのハイブリッドシステムは両方の分析部を並行して動作させることができるため、一回の分析で試料の精密質量測定と MS/MS データの両方を取得することができる利点をもつ。

MS/MS 法を利用したアミノ酸配列の決定 (PIMF 法の利用)

蛋白質の同定は大きく分けて 2 つの操作により行う。まず、測定する蛋白質を特定のアミノ酸で切断することが可能な消化酵素を用いてペプチド断片とし、精製することで測定サンプルとする。本研究では最も一般的に使用されるトリプシンを用いてペプチド結合の加水分解を行った。トリプシンはリジン (Lysine: Lys: K) およびアルギニン (Arginine: Arg: R) の C 末端側を特異的に切断することができる消化酵素である⁸⁶⁾。

トリプシンを用いてペプチド断片化した測定サンプルを逆相高速液体クロマトグラフィー (Reversed-phase liquid chromatography; RPLC) により疎水性に基づき分離した後、質量分析装置のイオン源に導入した。

生じたペプチドイオン (プリカーサーイオン) はリニアイオントラップの質量分析部に送られ、イオン解離法の 1 つである衝突誘起解離 (collision induced dissociation; CID) によってさらに開裂する。ペプチドは図 3-3 に示すような 3 種類、計 6 種類のイオンを生成する開裂様式が知られているが、本研究で使用した CID では N 末端側の b イオンと C 末端側の y イオンを生じる開裂反応が優先的に起きる⁸⁷⁾。これにより個々のアミノ酸残基の化学構造は保持された小さなペプチド断片が生じることになる (プロダクトイオン) (図 3-4a)。

図 3-4b は MS/MS 解析で得られるマスペクトルの例を示している。図 3-4a,b

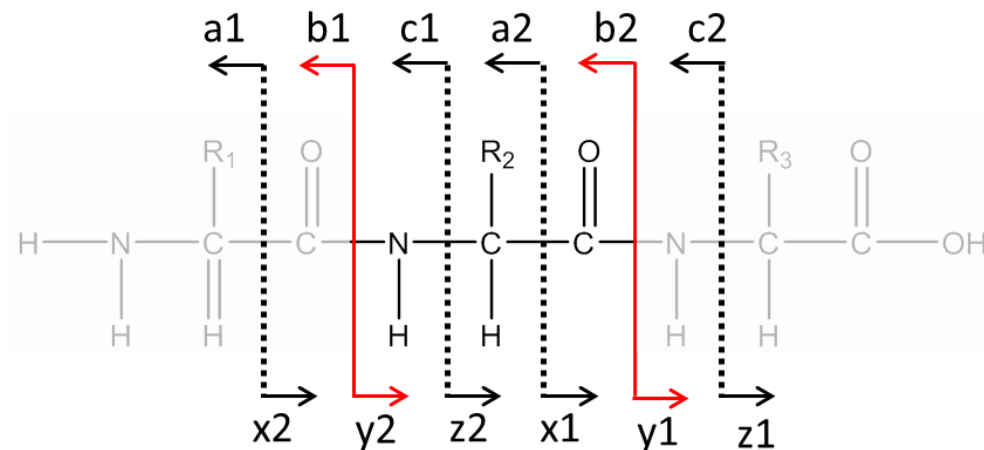


図 3-3 CID によるペプチド断片の開裂様式

で示した **R1** から **R5** はアミノ酸残基を示している。例として **R3** のアミノ酸を決定する場合、**R3** と **R4** の間で開裂して生じた **b** イオン (**b3**) と **R2** と **R3** の間で開裂して生じた **y** イオン (**y2**) の m/z の差を算出することで **R3** のアミノ酸残基を決定することができる。この原理に基づき、異なるペプチド断片からも同様にアミノ酸情報を取得することができる。このことから図 3-3 に示すような 3 種の開裂から生じる **a,b,c,x,y,z** の計 6 種類のプロダクトイオンは「シーケンスイオン」とも呼ばれている。

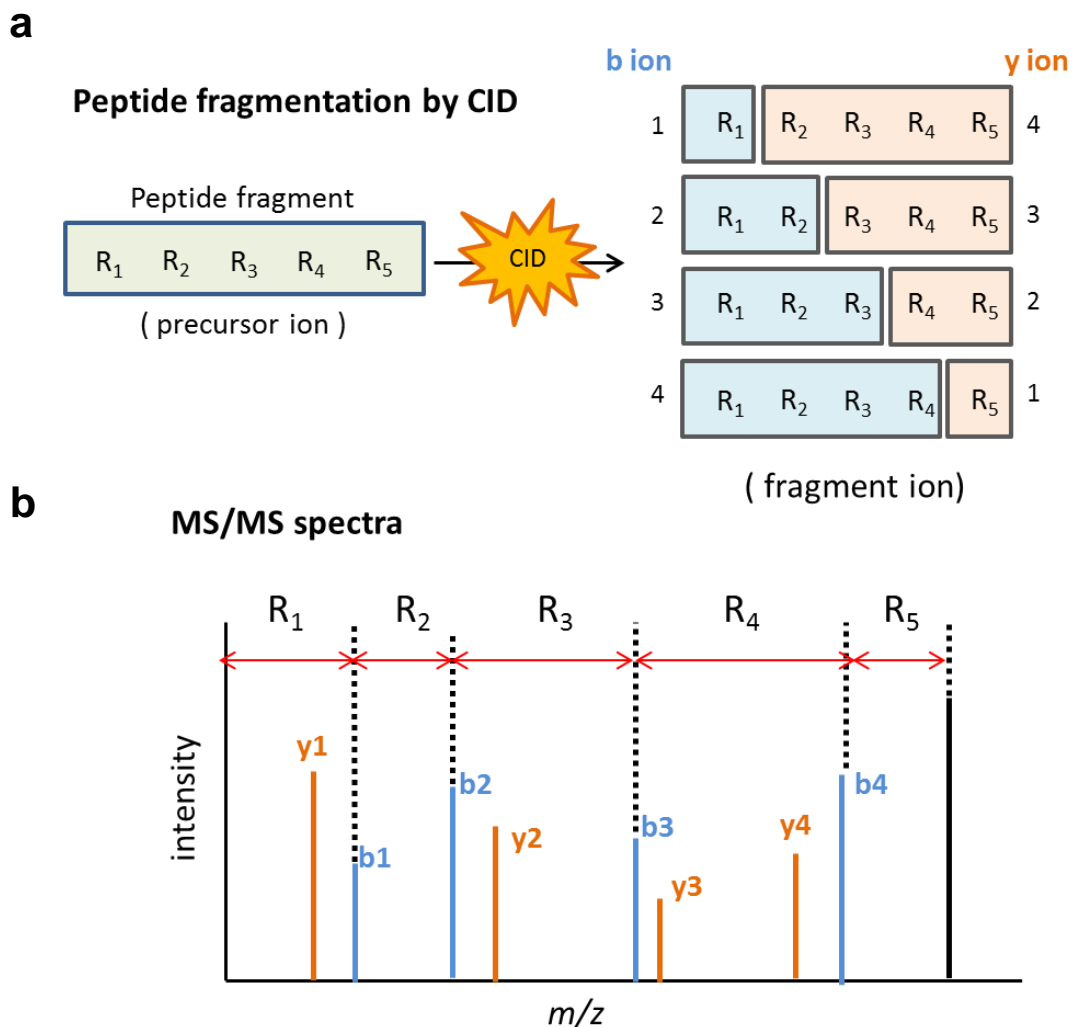


図 3-4 MS/MS 解析によるアミノ酸配列を決定するための原理

MS/MS 解析を用いた蛋白質の同定

MS/MS 解析を利用した蛋白質同定には、測定によって得られるペプチド断片のプリカーサーイオンおよび CID で生じるプロダクトイオンの質量データ（プロダクトイオンマスリスト）を数値データとして直接データベース検索に用いる方法が一般的に行われる。前述のように CID によるペプチド断片の開裂は b イオンと y イオンを生じる開裂が優先する。そのため、データベースに含まれる既知蛋白質であればそのアミノ酸配列から酵素消化した際の断片ペプチドの理論質量、さらにはそこから得られるプロダクトイオンの理論質量を算出することができる。このようにして得られた理論プロダクトイオンマスリストの中で、実測されたプロダクトイオンマスリストに最も適合したものを検索し、蛋白質の同定が行われる。

この方法はアルゴリズムとして構築されており、著者はこの原理から構築された検索エンジン SEQUEST を使用した⁸⁸⁾。

本章の第1節では、ウシ血清アルブミン（BSA）を用いて蛋白質同定法の最適化を試みた。そして、IR エクソン 11 領域に結合するスプライシング制御因子を同定するため、*in vitro* binding 反応により、RNA と蛋白質の複合体形成を行った（第2節）。第3節および第4節では複合体の構成蛋白質を最適化したシステムを利用し、結合蛋白質の同定を行った。第5節、第6節では複合体形成を阻害する低分子化合物を探索し、細胞内在性の IR エクソン 11 におけるスプライシング調節作用を検討した。

第1節 質量分析装置を用いた蛋白質同定法の条件検討

ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて質量分析法による蛋白質同定の最適化を試みた。イオン化法および質量分析部にはエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization ; ESI) およびリニアイオントラップ (LTQ) とオービトラップ (電場型フーリエ変換質量分析装置) のハイブリッド質量分析システムを採用した。ESIはイオンを溶液から気相へ移すソフトなイオン化法であり、比較的大きな分子量をもち、不揮発性で電荷を帯びる分子の分析には極めて有用である。

第1項 実験材料および実験方法

1. 実験材料

(1) 測定試料

Bovine Serum Albumins (SIGMA-ALDRICH)

(2) 溶液内酵素消化に用いた試薬

重炭酸アンモニウム (和光純薬)

ジチオスレイトール (DTT) (和光純薬)

ヨードアセトアミド (IAA) (和光純薬)

TrypsinGold (promega)

ギ酸 (和光純薬)

トリフルオロ酢酸 (TFA) (和光純薬)

その他の試薬は和光純薬の特級品を使用した。

(3) 解析に利用した機器類

高速液体クロマトグラフィー

装置 : UltiMate3000 (Dionex)

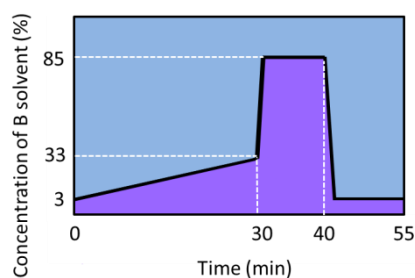
カラム : L-column Micro C-18 (0.1×150 mm) (CERI)

移動相: 1; 98% H₂O, 2% MeCN, 0.1% FA

2; 90% MeCN, 10% H₂O, 0.1% FA

流速 : 0.5 μL/min

溶媒条件 (グラジエント)



高分解能質量分析装置

装置：LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Scientific)

イオンソース：Dream spray (AMR)

スプレーチップ：Fortis Tip (AMR)

イオン化法：Electrospray ionization (ESI) 法

測定モード：Positive Ion Mode

スキャンレンジ： m/z 300-2000

蛋白質解析

蛋白質同定ソフト：Proteome Discoverer (Thermo Scientific)

蛋白質データベース：Swiss-Prot

消化酵素：Trypsin

Miss cleavage：2

修飾部位：Carbamidomethyl (C)

Oxidation (M)

Dimethylation (R)

Phosphorylation (S)

2. 実験方法

2-1 溶液内酵素消化

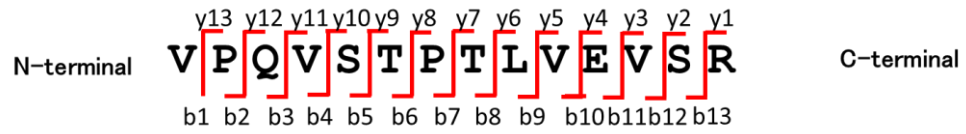
0.5 mL チューブに BSA 10 μ g を 50 mM 重炭酸アンモニウム (pH8.0) 25.5 μ L に溶解した後、500 mM の DTT 溶液を 1.5 μ L 加えた。これを 50°C で 1 時間インキュベートさせ、還元反応を行った。その後、500 mM のヨードアセトアミド溶液を 3 μ L 加え、室温遮光で 45 分静置した。トリプシン溶液 (100 ng/ μ L) を蛋白質量に対して 1/50 重量 (1 μ L) となるように加えた。37°C で一晩インキュベートし、酵素消化を行った。

第2項 実験結果

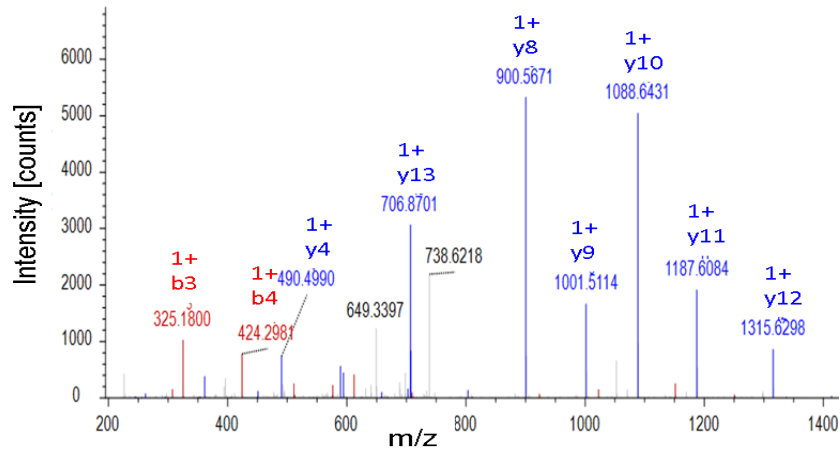
1. BSA を利用した蛋白質同定法の条件検討

蛋白質同定法を確立するため、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) を用いて条件検討を行った。BSA 10 μg を溶液内でトリプシン消化し、得られたペプチド断片を逆相液体クロマトグラフィーで分離後、LTQ-Orbitrap Discovery で測定した。図 3-5 に BSA を酵素消化して得られた 14 アミノ酸からなるペプチド断片 (VPQVSTPTLVEVSR aa.438-451) の解析例を示す。図 3-5a はペプチド断片の CID によって生成される b イオンと y イオンへの開裂様式を示している。理論的には計 26 種のシーケンスイオンが生じる。図 3-5b はこのペプチド断片を MS/MS 解析して得られた実測のプロダクトイオンスペクトルである。縦軸はイオン強度を示し、横軸は m/z を示す。ここでは赤色のピークが b イオン、青色のピークを y イオンとしている。アミノ酸配列の決定例の一つを示す。得られたプロダクトイオンスペクトル中の m/z 424.3 (b4) と m/z 325.2 (b3) の質量差分は 99.1 であることから N 末端から 4 番目のアミノ酸はバリン (Valine: 99.1) であることがわかる。これらの原理を用いて得られる情報を統合することでペプチド断片のアミノ酸配列が決定される。図 3-5c はこのペプチドの全理論スペクトルを示しており、赤字と青字で書かれた m/z は実際に測定された b イオンおよび y イオンを表している。これらの一致度は確からしさの指標となり、一致度が高いほど高い同定スコアを得ることができる。このように MS/MS 解析ではプリカーサーイオンとプロダクトイオンの情報を組み合わせてアミノ酸配列情報を得るため、少ない蛋白質の消化断片からでも高い信頼性で蛋白質を同定することが可能である。図 3-6 には BSA の同定結果と同定領域を示した。BSA のペプチド断片を解析した結果、同定ペプチド数は 426、同定された領域 (カバー率) は 79.74%、同定スコアが 1357.03 と良好な結果が得られた。

a



b



c

#1	b ion			y ion		#2
	b(1+)	b(2+)	Seq.	y(1+)	y(2+)	
1	100.07570	50.54149	V			14
2	197.12847	99.06787	P	1412.77443	706.89085	13
3	325.18705	163.09716	Q	1315.72166	658.36447	12
4	424.25547	212.63137	V	1187.66308	594.33518	11
5	511.28750	256.14739	S	1088.59466	544.80097	10
6	612.33518	306.67123	T	1001.56263	501.28495	9
7	709.38795	355.19761	P	900.51495	450.76111	8
8	810.43563	405.72145	T	803.46218	402.23473	7
9	923.51970	462.26349	L	702.41450	351.71089	6
10	1022.58812	511.79770	V	589.33043	295.16885	5
11	1151.63072	576.31900	E	490.26201	245.63464	4
12	1250.69914	625.85321	V	361.21941	181.11334	3
13	1337.73117	669.36922	S	262.15099	131.57913	2
14			R	175.11896	88.06312	1

図 3-5 BSA 由来のあるペプチド (VPQVSTPTLVEVSR) の MS/MS データ

Identification results

▼ Cleavage sites by trypsin

Protein name	Peptides	Coverage(%)	Score
Bovine serum albumin	426	79.74	1357.03

Amino acid sequence coverage of BSA

1	M	K	W	T	F	I	S	L	L	F	S	S	A	S	R	G	V	E	R	R	D	T	H	K	S	E	I	A	H	R	F	K	D	L	G	E	E	H	F	K	G	L	V	L	I	A	F	S	Q	Y	L	Q	C	P	F					
61	D	E	H	V	K	L	V	N	E	L	T	E	F	A	K	T	C	V	A	D	E	S	H	A	G	C	E	K	S	L	H	T	L	F	G	D	E	L	C	K	V	A	S	I	R	E	T	Y	G	D	M	A	D	C	C	E	K	Q	E	P
121	E	R	N	E	C	F	L	S	H	K	D	D	S	P	I	L	P	K	L	K	P	D	P	N	T	L	C	D	E	F	K	A	D	E	K	K	F	W	G	K	Y	L	Y	E	I	A	R	R	H	P	Y	F	Y	A	P	E	L	L	Y	
181	A	N	K	Y	N	G	V	F	Q	E	C	C	Q	A	E	D	K	G	A	C	L	L	P	K	I	E	T	M	R	E	K	V	L	A	S	S	A	R	Q	R	L	R	C	A	S	I	Q	K	F	G	E	R	A	L	K	A	W	S	V	A
241	R	L	S	Q	K	F	P	K	A	E	F	V	E	V	T	K	L	V	T	D	L	T	R	V	H	K	E	C	H	G	D	L	L	E	C	A	D	D	R	A	D	L	A	K	Y	I	C	D	N	Q	T	I	S	S	K	L	K	E		
301	C	C	D	K	P	L	L	E	K	S	H	C	I	A	E	V	E	K	D	A	I	P	E	N	L	P	L	T	A	D	E	A	E	D	K	D	V	C	K	N	Y	Q	E	A	K	D	A	F	L	G	S	F	L	Y	E	S	R	R		
361	H	P	E	Y	A	V	S	V	L	L	R	L	A	K	E	Y	E	A	T	L	E	E	C	C	A	K	D	D	P	H	A	C	Y	S	T	V	E	D	K	L	K	H	L	V	D	E	P	Q	N	L	I	K	Q	N	C	D	Q	F	E	K
421	L	G	E	Y	G	F	Q	N	A	L	I	V	R	Y	T	R	K	V	P	Q	V	S	T	P	L	V	E	V	S	R	S	L	G	K	V	G	T	R	C	T	K	P	E	S	E	R	M	P	C	T	E	D	Y	L	S	L	I	L		
481	N	R	L	C	V	L	H	E	K	T	P	V	S	E	K	V	T	K	C	C	T	E	S	L	V	N	R	R	P	C	F	S	A	L	T	P	D	E	T	Y	V	P	K	A	F	D	E	K	L	F	T	F	H	A	D	I	C	T	L	P
541	D	T	E	K	Q	I	R	K	Q	T	A	L	V	E	L	L	K	H	K	P	K	A	T	E	E	Q	L	K	T	V	M	E	N	F	A	F	V	D	K	C	C	A	A	D	D	K	E	A	C	F	A	V	E	G	P	K	L	V		
601	S	T	Q	T	A	L	A																																																					

図 3-6 BSA の同定結果

第 2 節 *In vitro* binding 反応と RNA-Electrophoretic mobility shift assay

スプライシング調節作用が報告されている低分子化合物の多くは効果が確認されているにも関わらず、その標的分子は不明であることが多い。

核酸と蛋白質の相互作用解析法の一つに Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) がある⁸⁹⁾。この解析法は汎用性が高く、複雑な手順を必要としないため、様々な蛋白質の機能解析に利用されている。そこで、この手法と質量分析法を組み合わせたエクソン認識に関わるスプライシング制御因子同定法の構築を目指した。

第 1 項 実験試薬と実験方法

1. 実験試薬

(1) *In vitro* binding 反応

IR e11 RNA (50 pmol/μL)

5'- CCA CAG AAA AAC CUC UUC AGG CAC UGG UGC CGA GGA CCC
UAG GUA UGA -3'

5'末端に 6-Carboxy Fluorescein amidite (6-FAM) 標識

In vitro binding buffer および HNE は第 2 章の第 6 項と同様の試薬を用いた。

(2) Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)

Glycerol (和光純薬)

Trizma base (SIGMA-ALDRICH)

Glycine (SIGMA-ALDRICH)

Tris/Glycine buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine)

0.375 M Tris-HCl (pH8.8)

Blue juice Type3 marker (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 1 mM EDTA, 30% Glycerol)

2. 実験方法

2-1 *In vitro* binding 反応

合成した IR e11 RNA を *in vitro* binding 緩衝液中で HeLa 細胞核抽出液と 30℃ で 20 分間反応させ、複合体の形成を行った。反応終了後、氷上に静置し、最終

濃度が4%となるように50% glycerolを加えて比重をつけたサンプルを電気泳動した。

2-2 Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE)

0.375M Tris-HCl (pH8.8) 8.2 mL、30%アクリルアミド溶液 1.7 mL、10% APS 100 μ L、TEMED 10 μ Lを混和し、ゲル作製用のガラス板に流し込んだ。

ウェル作製コームを差し、ゲルを完全に重合させた。1 \times Tris/Glycine bufferを満たした電気泳動槽 (ATTO) にゲルを固定し、調製した各電気泳動用サンプルをアプライして100Vの定電圧で60分間電気泳動した。

2-3 蛍光検出

電気泳動後、泳動槽からゲル板を取り出し、蛍光標識したRNAプローブの検出を行った。6-FAMの励起波長は492 nm、蛍光波長は510 nmである。ImageQuant LAS4000を使用し、lightはBlue light (460 nm EPI)、FilterはY515フィルターを使用した。

第2項 実験結果

1. RNA プローブの設計

IR エクソン 11 領域に結合するスプライシング制御因子を同定するため、RNA-EMSA を行った。EMSA は蛋白質と核酸が相互作用し、複合体を形成することで、電気泳動時に核酸の移動度が低下する現象を利用した解析法である。

36 塩基から構成される IR エクソン 11 全領域と前後イントロンの一部断片を含む 48 塩基からなる RNA プローブを設計した。図 3-7 に、設計した RNA プローブの塩基配列を示す。従来の EMSA 法では RNA プローブの標識にラジオアイソトープ (RI) ラベルである ^{32}P を使用し、オートラジオグラフィーで検出する。しかしながら、RI は半減期が短いことや取扱いに注意を払う必要がある。そこで本実験では扱いやすい非 RI ラベル化法の一つである蛍光標識 (6-fluorescein amidate; 6-FAM) を採用した⁹⁰⁾。5'末端側に標識を施し、その蛍光を検出することで RNA プローブの動態を追跡することができる。RNA プローブの合成は受託会社に依頼し、以降の実験に使用した。本実験で行う RNA プローブ名は “IR e11 RNA” とした。

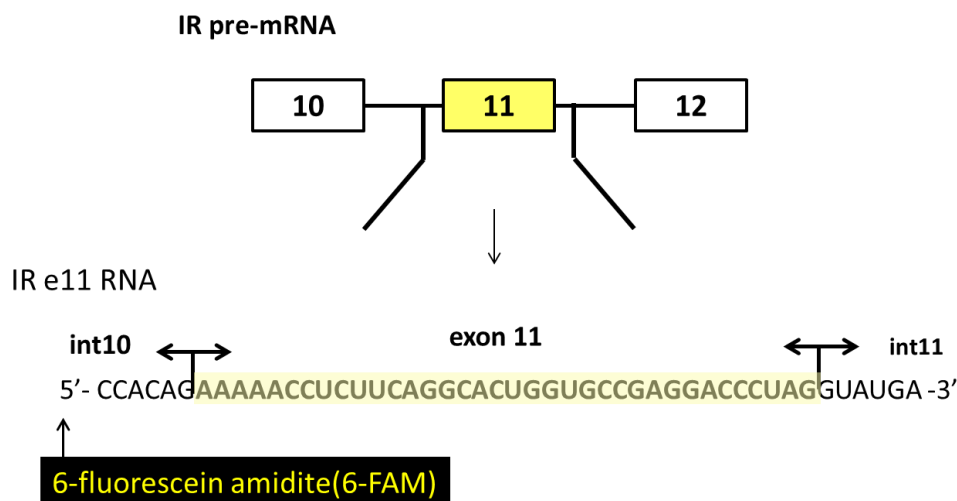


図 3-7 RNA-EMSA に使用する RNA プローブ 「IRe11 RNA」 の設計

2. *In vitro* binding 反応と複合体の分離

In vitro スプライシングの実験で一般的に使用されている HNE を蛋白質源として、IR e11 RNA と蛋白質の複合体形成を行った。

図 3-8a は予想される蛍光検出結果の模式図であり、図 3-8b は実際に行った RNA-EMSA の実験結果である。Lane 1 は HNE のみ、Lane 2 には IR e11 RNA のみをアプライし、コントロールとして使用した。Lane 3 は IR e11 RNA と HNE を *in vitro* で反応させて複合体形成を行った反応溶液をアプライした。その結果、予想された通り、Lane 1 では IR e11 RNA 由来の蛍光バンドは観察されず、Lane 2 では IR e11 RNA 由来の一本の蛍光バンドが観察された。一方、IR e11 RNA と HNE を反応させたサンプルをアプライした Lane 3 には4つの移動度が低下した蛍光バンドが観察された。この結果より、IR e11 RNA と蛋白質が4つの複合体を形成していると考えられた。この複合体を a, b, c, d とし、前節で条件検討を行った蛋白質同定法を用いて、複合体の構成蛋白質を同定した。

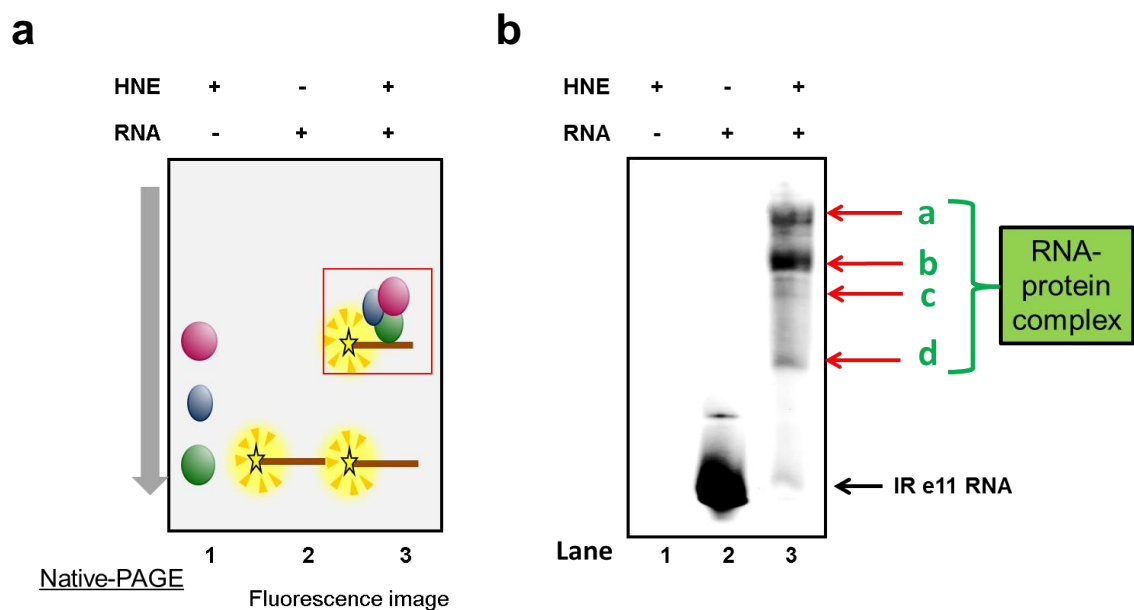


図 3-8 HNE と IR e11 RNA との複合体形成

第3節 質量分析法を利用したスプライシング制御因子の同定

本節では第1節で最適化した蛋白質同定法を利用し、IR エクソン 11 領域と相互作用するスプライシング制御因子の同定を試みた。前節では *in vitro* binding 反応と RNA-EMSA 法により、4 つの複合体由来の蛍光バンドが観察された。そこでこれらの蛍光バンドをゲルから切り出し、ゲル内消化によってペプチド断片を取得後、LC-MS/MS 解析と蛋白質同定ソフトを用いて複合体の構成蛋白質を同定した。同定された蛋白質をさらに機能によって分類化し、RNA に結合するスプライシング制御因子を探索した。

第1項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) ゲル内トリプシン消化

第1節と同じ試薬を使用した。

(2) 使用機器と測定条件

第1節と同様の機器と測定条件を利用した。

(3) 同定蛋白質の機能解析

ソフトウェア

Gene ontology consortium (<http://www.geneontology.org/>)

2. 実験方法

2-1 還元アルキル化とゲル内トリプシン消化

RNA-蛋白質複合体の形成が考えられる蛍光バンドをナイフで切りだし、超純水 1 mL で 2 回洗浄した。ゲルに含まれる塩や界面活性剤を除去するため、新たに超純水を 1 mL 加え、4°C で一晩洗浄を行った。超純水除去後、アセトニトリル 200 μ L 加えて 10 分間室温で静置し、ゲルの脱水を行った。アセトニトリル除去後、還元用溶液 200 μ L を加えてゲルを膨潤後、50°C で 1 時間反応させた。室温に戻し、溶液を除去した後、アルキル化溶液 200 μ L を加え、遮光状態で 45 分間室温に静置した。溶液を除去し、超純水 1 mL で 2 回洗浄後、アセトニトリル 200 μ L を加え、10 分間室温で脱水した。アセトニトリル除去後、25 mM 重炭酸アンモニウムと TrypsinGold (20 ng/ μ L) を 10 μ L ずつ加え、37°C で一晩反応させた。

2-2 ゲルからのペプチド断片抽出

トリプシン消化液に 5% ギ酸溶液を 25 μ L 加え、10 分間超音波処理を行った。低吸着用の TPX チップを用いて反応溶液を回収した。さらにゲルが入ったチューブに 50% アセトニトリル 5% ギ酸溶液を 25 μ L 加えて、10 分間超音波処理をした。溶液を回収後、アセトニトリルを加え、ペプチド断片を回収した。これを Speed Vac を用いて濃縮乾固した。0.1% TFA 35 μ L に再溶解し、質量分析の測定サンプルとした。

2-3 質量分析法を用いた蛋白質の同定

蛋白質の同定は第 1 節と同様の方法で測定および解析を行った。

第2項 実験結果

1. RNA-蛋白質複合体の解析

第1節で確立した蛋白質同定法を利用し、IR エクソン 11 領域に結合する蛋白質同定を試みた。第2節で示した図 3-8 の4つの複合体のバンドをゲルから切り出した。ジチオスレイトール (DTT) を用いてあらかじめ蛋白質を還元し、その後、SH 基同士分子内、分子間でのジスルフィド結合再形成をふせぐため、ヨードアセトアミドを用いて、切断箇所のカルバミドメチル化を行った。これら4つのバンドを質量分析法で解析した結果、多くの蛋白質が候補として同定されてきた (計 228 種)。しかしながら、これらの同定蛋白質には複合体と同じ移動度を持つために同定されている偽陽性蛋白質が含まれる。そこでこれらの成分を除くために HNE のみを泳動したレーンから同じ移動度のバンドを解析し、コントロールとして利用した。

図 3-9 はコントロールと複合体由来のバンドで同定された蛋白質を比較したベン図である。灰色はコントロールのバンドから同定された蛋白質数、赤色は複合体由来のバンドから同定された蛋白質数を表している。すなわち赤色部分

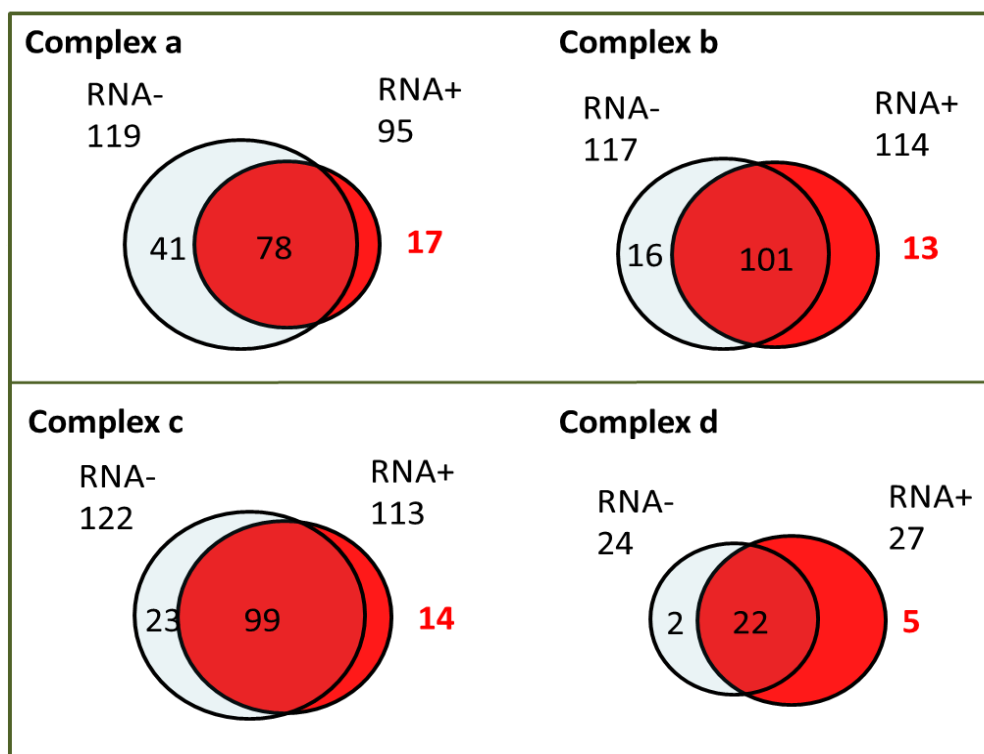


図 3-9 コントロールと複合体から同定された蛋白質数の比較

のみで同定された蛋白質は IR エクソン 11 領域と結合し、移動度が低下したために同定された可能性が高い。このような蛋白質は複合体 a からは 17 種類、複合体 b からは 13 種類、複合体 c からは 14 種類、複合体 d からは 5 種類の計 49 種類の蛋白質が IR エクソン 11 領域と相互作用していると考えられた。

2. RNA 結合ドメインを有する蛋白質の抽出

同定された蛋白質を表 3-1 に示す。以下の情報を記載した。

- Accession number: Swiss-prot の Accession number
- #AAs: アミノ酸の数
- MW (Da): 分子量
- Description: 蛋白質名
- Score: 解析による同定スコア
- Coverage (%): 同定領域の割合 (カバー率)
- Peptides: 同定されたペプチド数

同定蛋白質は複合体 a から d の全てで Score 順に表記している。FDR (False discovery rate) が 0.05 以下のスペクトルは同定結果から除外している。

さらに同定された 49 種の候補蛋白質を機能的役割に基づいて分類した。解析にはオープンソースの Gene ontology Consortium を利用した。その結果、計 49 種のうち 35 種が「Nucleic acid binding」に分類され、その中の 30 種が「RNA binding」としての機能をもつことが報告されていた (表 3-1)。表 3-1 の斜体は「Nucleic acid binding」の機能を有する蛋白質であり、黄色のハイライトで示した蛋白質は「RNA binding」の機能を有する蛋白質である。U1-70K (U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa) などのスプライシング基本因子も複合体構成蛋白質として同定されていた (Complex a)。

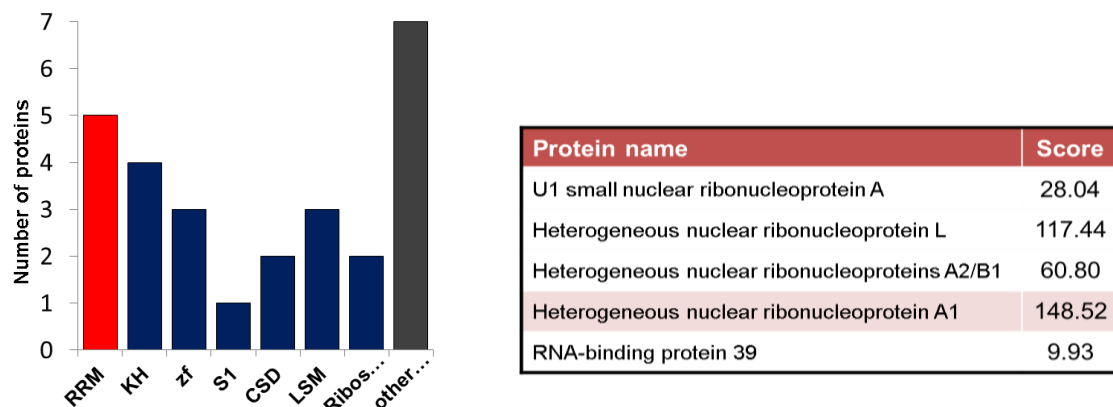
第 3 章

Complex a						
Accession	#AAs	MW [Da]	Description	Score	Coverage(%)	Peptides
Q96AE4	644	67518	<i>Far upstream element-binding protein 1</i>	155.05	44.1	50
Q13263	835	88493	<i>Transcription intermediary factor 1-beta</i>	149.44	27.31	46
P26639	723	83382	<i>Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	119.71	33.75	44
Q92945	711	73070	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>	83.73	22.78	29
P08621	437	51526	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa</i>	65.31	24.26	19
Q9BT78	406	46240	<i>COP9 signalosome complex subunit 4</i>	56.18	28.57	19
Q71U36	451	50104	<i>Tubulin alpha-1A chain</i>	55.40	25.06	20
Q13098	491	55501	<i>COP9 signalosome complex subunit 1</i>	50.67	23.42	18
P62316	118	13518	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2</i>	39.81	41.53	13
Q92905	334	37555	<i>COP9 signalosome complex subunit 5</i>	39.61	28.44	13
P09234	159	17381	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein C</i>	31.13	24.53	8
P09012	282	31259	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein A</i>	28.04	19.5	10
Q9UNS2	423	47842	<i>COP9 signalosome complex subunit 3</i>	27.51	18.44	9
O43776	548	62903	<i>Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	26.12	9.67	9
P63162	240	24598	<i>Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N</i>	20.54	18.33	7
P30046	118	12704	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	14.52	19.49	4
P62314	119	13273	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1</i>	10.80	18.49	4
Complex b						
Accession	#AAs	MW [Da]	Description	Score	Coverage	Peptides
Q00341	1268	141368	<i>Vigilin</i>	282.11	31.31	82
Q96AE4	644	67518	<i>Far upstream element-binding protein 1</i>	26.04	8.7	9
P52747	638	68853	<i>Zinc finger protein 143</i>	16.49	7.99	6
O43148	476	54809	<i>mRNA cap guanine-N7 methyltransferase</i>	14.66	10.5	5
P53004	296	33407	<i>Biliverdin reductase A</i>	14.37	10.14	4
Q14103	355	38410	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>	13.81	4.79	4
P52739	623	71377	<i>Zinc finger protein 131</i>	13.00	6.1	4
P62258	255	29155	<i>I4-3-3 protein epsilon</i>	11.55	11.37	5
P31948	543	62599	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	9.75	3.5	2
Q13952	458	50271	<i>Nuclear transcription factor Y subunit gamma</i>	9.25	2.62	3
P51570	392	42246	<i>Galactokinase</i>	7.81	4.59	3
Q8NDH3	523	55825	<i>Probable aminopeptidase</i>	6.98	5.74	2
P32456	591	67166	<i>Guanylate-binding protein 2</i>	4.91	3.05	2
Complex c						
Accession	#AAs	MW [Da]	Description	Score	Coverage	Peptides
Q9Y2L1	958	108934	<i>Exosome complex exonuclease RRP44</i>	204.37	31	65
P14866	589	64092	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i>	117.44	34.63	35
P22626	353	37407	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	45.14	30.59	20
P26599	531	57186	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>	31.91	13.75	8
P61978	463	50944	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>	30.65	17.28	9
Q92688	251	28770	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B</i>	19.71	14.34	7
Q8IYB7	885	99216	<i>DIS3-like exonuclease 2</i>	14.60	6.78	6
P62081	194	22113	<i>40S ribosomal protein S7</i>	10.24	6.19	3
Q14498	530	59343	<i>RNA-binding protein 39</i>	8.75	2.08	3
Q13765	215	23370	<i>Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha</i>	8.55	6.51	2
Q8WYA6	563	65132	<i>Beta-catenin-like protein 1</i>	8.46	3.55	3
P45974	858	95725	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5</i>	6.20	1.4	3
Q9BZZ5	524	58968	<i>Apoptosis inhibitor 5</i>	5.80	4.58	2
Q8NC51	408	44938	<i>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein</i>	4.83	3.19	2
Complex d						
Accession	#AAs	MW [Da]	Description	Score	Coverage	Peptides
P09651	372	38723	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	148.52	30.91	33
Q99729	332	36202	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</i>	33.42	15.36	9
P53999	127	14386	<i>Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15</i>	22.62	17.32	6
POC0S5	128	13545	<i>Histone H2A.Z</i>	11.83	14.84	3
P62913	178	20240	<i>60S ribosomal protein L11</i>	7.64	12.92	3
Molecular function						
Nucleic acid binding		<i>Italic</i>				
RNA binding						

表 3-1 複合体 a から d の同定蛋白質

スプライシング制御因子の多くは RNA と相互作用するための RNA 結合ドメイン (RBD) を有する⁹¹⁾。RBD としては数種類のドメインが報告されており、RNA recognition motif (RRM)、K homology domain (KH)、Zf domain、S1 domain、Cold shock domain (CSD)、LSm domain、Ribosomal protein S1-like などが知られている⁹²⁾。RRM はヒトで最も多く存在するドメインの一つであり、スプライシング制御因子である SR 蛋白質や hnRNPs が有している³⁾。そこで「RNA binding」として同定された 30 種の蛋白質の中で RRM を有する蛋白質を抽出した。その結果、5 つの蛋白質が RRM を有していることがわかった (図 3-10)。

その中で最も高い同定スコアが得られた蛋白質は hnRNPA1 (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) であった (図 3-10)。hnRNPA1 はエクソン認識を抑制する制御因子であり、その過剰発現は IR エクソン 11 のスキッピングが促進されることが知られている⁴⁵⁾。このことから、hnRNPA1 は IR エクソン 11 のスプライシング異常を修正するための治療標的になると考えた。



Protein name	Peptides	Coverage (%)	Score
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1)	36	28.23	146.1

図 3-10 RNA 認識モチーフ (RRM) を有した同定蛋白質と hnRNPA1

第4節 hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合様式の確認

スプライシング異常の修正は主にスプライシング制御因子の RNA への結合を阻害することで、エクソン認識機構に影響を与え、スプライシング様式を変更する⁹³⁻⁹⁶⁾。本節では紫外線による光架橋形成反応を用いて⁹⁷⁻⁹⁹⁾、RNA と蛋白質の相互作用部位に共有結合を形成させた。この結合は変性条件下においても RNA-蛋白質複合体の維持が可能である。これを SDS-PAGE により分離することで、間接的に結合する蛋白質を解離させ、直接結合した蛋白質のみを解析することができる (図 3-11)。さらにバンドの分子量と RNA プローブの分子量を考慮することで、結合した蛋白質の分子量を推測することが可能である。

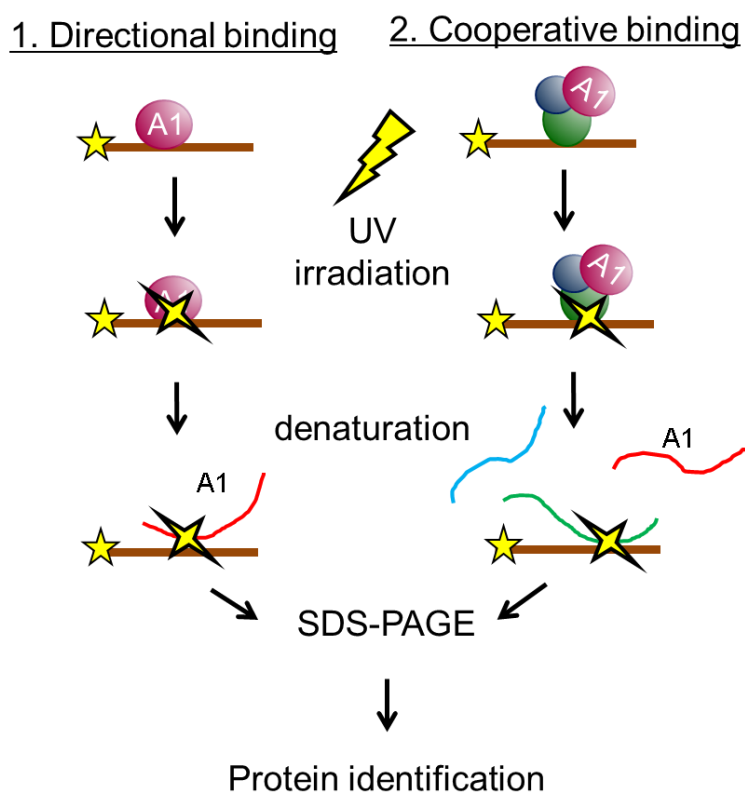


図 3-11 光架橋形成を利用した RNA-蛋白質複合体の解析

第1項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) *In vitro* binding 反応と光架橋形成反応

第3章の第1節と同様の試薬を用いて実験を行った。

(2) Western blot 法

hnRNPA1 antibody (4B10) (SantaCruz)

anti-Mouse IgG HRP conjugated (R&D systems)

(3) 使用機器

CL-1000 Ultraviolet crosslinker (UVP)

2. 実験方法

2-1 *In vitro* binding 反応

第2節と同様の方法で行った。

2-2 紫外線照射を用いた光架橋形成反応

In vitro binding 反応液をパラフィルムに乗せ、氷上 (4℃) のアルミブロックに静置した。紫外線照射 (10 回) を行い、RNA と直接結合するアミノ酸部位を架橋形成させた。

2-3 SDS-PAGE による複合体分離

架橋形成した *in vitro* binding 反応液を 12.5% ポリアクリルアミドゲルの変性条件下で電気泳動を行った。20 mA の定電流で 75 分間、RNA-蛋白質複合体を分離した。

2-4 蛍光検出

第3章の第1節と同様の方法で行った。

2-5 Western blot 法

第2章の第6節と同様の方法で行った。1次抗体は hnRNPA1 antibody 4B10 (SantaCruz) を 10000 倍希釈で使用した。2次抗体には HRP conjugated anti-mouse IgG を 1000 倍希釈で使用した。

第2項 実験結果

1. 光架橋形成反応を行った複合体の分離と質量分析法による蛋白質同定

hnRNPA1 と IR e11 RNA との結合モデルを確認するため、前節と同様に RNA-蛋白質の複合体形成を行った。この反応液に紫外線を照射し、光架橋形成反応後、SDS-PAGE で分離した。図 3-12 に電気泳動を行い、蛍光検出した結果を示す。IR e11 RNA のみをアプライしたレーン 1 では単独の RNA 由来の蛍光バンドが観察された。一方、IR e11 RNA と HNE を反応させて、光架橋形成を行ったサンプルをアプライしたレーン 2 には単独の RNA 由来の蛍光バンドと幾つかの移動度が低下したバンドが観察された。その中で、約 50kDa 付近のバンドは最も強い蛍光バンドとして観察された。IR e11 RNA の分子量が約 16kDa であることを考慮すると、結合蛋白質は約 34kDa と算出することができる。hnRNPA1 の分子量は約 32kDa であることから、このバンドは hnRNPA1 が直接結合することで移動度が低下していることが考えられた。

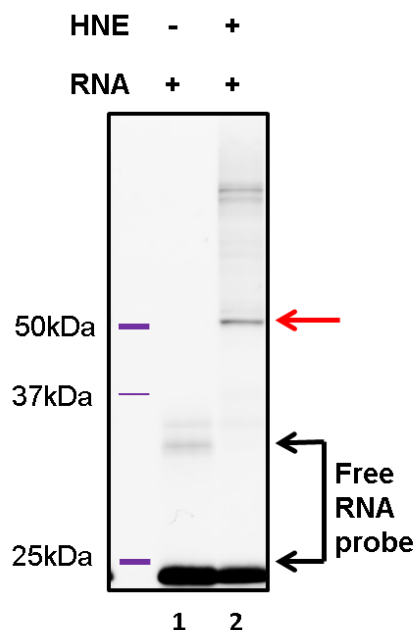


図 3-12 光架橋形成した複合体の SDS-PAGE

2. 質量分析法を用いた hnRNPA1 の同定

In vitro binding 反応と光架橋形成反応により形成された約 50 kDa の複合体構成蛋白質を同定するため、前節と同様にゲルの切り出しとゲル内トリプシン消化および質量分析法を用いた解析した。

第3節と同様に複合体と同じ移動度を持つ偽陽性蛋白質を除くため、HNE のみを電気泳動したレーン内の複合体と同じエリアを切り出して蛋白質を同定した。ここで同定された蛋白質をコントロールとして利用し、複合体にのみ同定された蛋白質に絞り込んだ。同定結果を表 3-2 に示した。同定されたペプチド数が 25、カバー率が 35.22%、同定スコア 92.93 で hnRNPA1 が結合蛋白質として同定された。

表 3-2 質量分析装置を用いた hnRNPA1 の同定結果

Protein name	Peptides	Coverage(%)	Score
hnRNPA1	25	35.22	92.93

hnRNPA1 の標準品（組み換え蛋白質）を同じ解析法で測定し、検出されるペプチドの違いや理論マススペクトルとのシーケンスイオンの一致度を確認した。複合体のバンドから hnRNPA1 のペプチド断片として同定され、最もイオン強度が高く検出されたペプチド、aa.147-161 に位置する「GFAFVTFDHDSVDK」と二番目の aa. 131-140 に位置する「IEVIEMTDR」について検討した。図 3-13-1～4 に解析データを示した。a はそれぞれのスペクトル上で最も強度の高いピークをもとにプロットしたベースピークイオンクロマトグラム（BPI）とペプチド断片の質量数からイオン強度を取り出し、横軸に時間をとって表した抽出イオンクロマトグラム（extracted ion chromatogram; EIC）を示している。b は MS/MS 解析で実測されたプロダクトイオンマススペクトルを示している。c はペプチド断片の全理論スペクトルと実測されたシーケンスイオンの結果を示している。図 3-13-1,3 の「From RNA-protein complex」は複合体形成を示した蛍光バンドから同定された結果であり、図 3-13-2,4 の「From recombinant hnRNPA1」は、組み換え hnRNPA1 を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色により検出したバンドから同定された結果を示している。

「GFAFVTFDHDSVDK」は共に 3 価のイオンとして検出されており、EIC で確認された保持時間（RT）は複合体の解析では 24.73min、組み換え蛋白質で

は 25.61min であった。MS/MS 解析では同程度の b イオンと y イオンが検出されていたが、夾雑物の少ない組み換え蛋白質では m/z が 1000 以上のイオン (b10—b14 や y3—y6) が数多く検出されていた。「IEVIEIMTDR」は共に 2 価のイオンとして検出されており、RT は 25.93min と 26.77min であった。MS/MS スペクトルはサンプル量が異なるため、イオン強度の違いは見られたものの、ほぼ同じシーケンスイオンが検出されていた。図 3-14 に複合体と組換え蛋白質のサンプルで同定されたペプチド領域を示した。多くの共通するペプチド領域が同定されていた。aa.232-277 の領域は両者のサンプルで同定されなかった。この領域は hnRNPA1 が他の蛋白質と相互作用するための RS ドメインに位置し、トリプシン消化部位が存在しないためにペプチド断片が高分子量となり検出できなかったと考えられる。複合体形成を示した蛍光バンドから hnRNPA1 由来として同定されたペプチドの種類は標準品と比べ、少なかった。これは複合体形成に利用した架橋形成効率などの影響によるものと考ええる。しかしながら、各ペプチドは同定基準 (FDR<0.05) を有意に超えた結果が得られており、hnRNPA1 が正しく同定されていることが確認された。

From RNA-protein complex

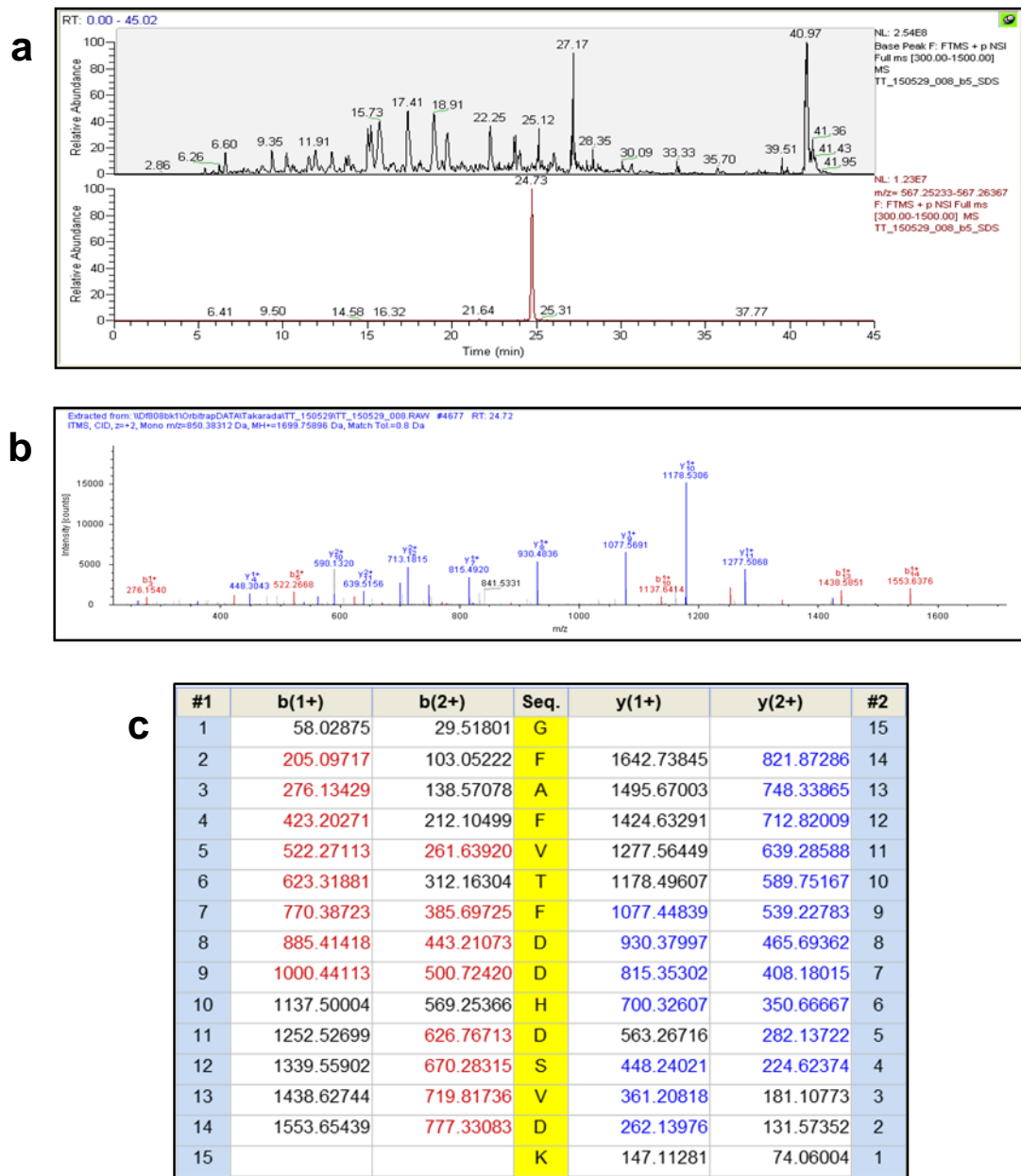
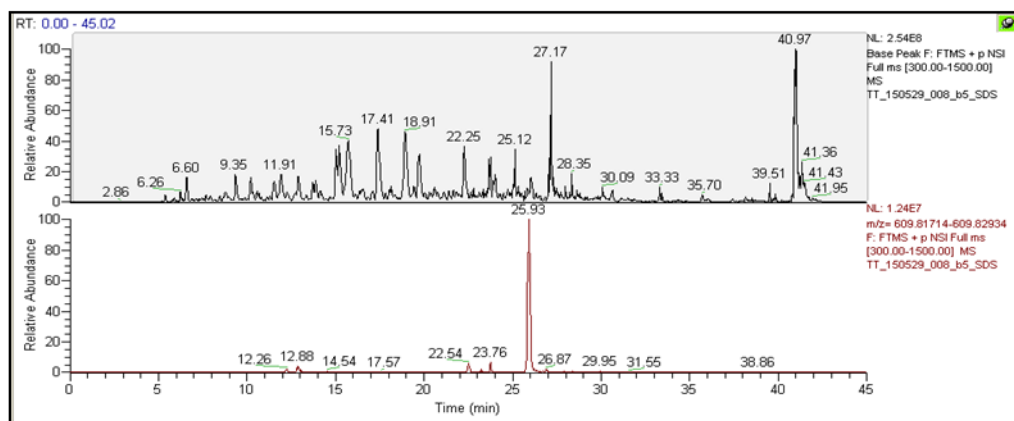
GFAFVTFDDHDSVDK

図 3-13-1 hnRNPA1 由来ペプチドの MS/MS 解析結果

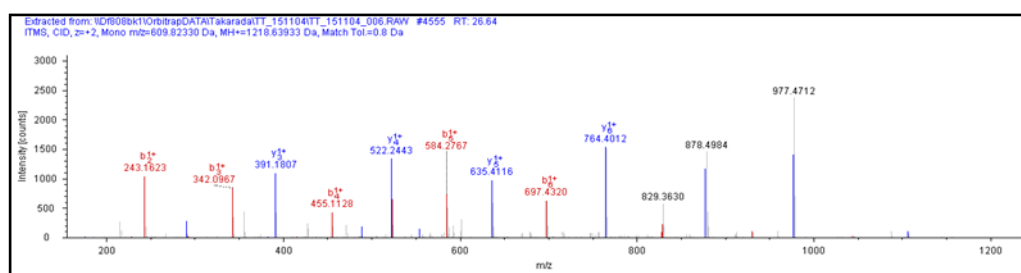
From RNA-protein complex

IEVIEIMTDR

a



b



c

#1	b(1+)	b(2+)	Seq.	y(1+)	y(2+)	#2
1	114.09135	57.54931	I			10
2	243.13395	122.07061	E	1105.55585	553.28156	9
3	342.20237	171.60482	V	976.51325	488.76026	8
4	455.28644	228.14686	I	877.44483	439.22605	7
5	584.32904	292.66816	E	764.36076	382.68402	6
6	697.41311	349.21019	I	635.31816	318.16272	5
7	828.45361	414.73044	M	522.23409	261.62068	4
8	929.50129	465.25428	T	391.19359	196.10043	3
9	1044.52824	522.76776	D	290.14591	145.57659	2
10			R	175.11896	88.06312	1

図 3-13-3 hnRNPA1 由来ペプチドの MS/MS 解析結果

第3章

From recombinant hnRNP A1

IEVIEIMTDR

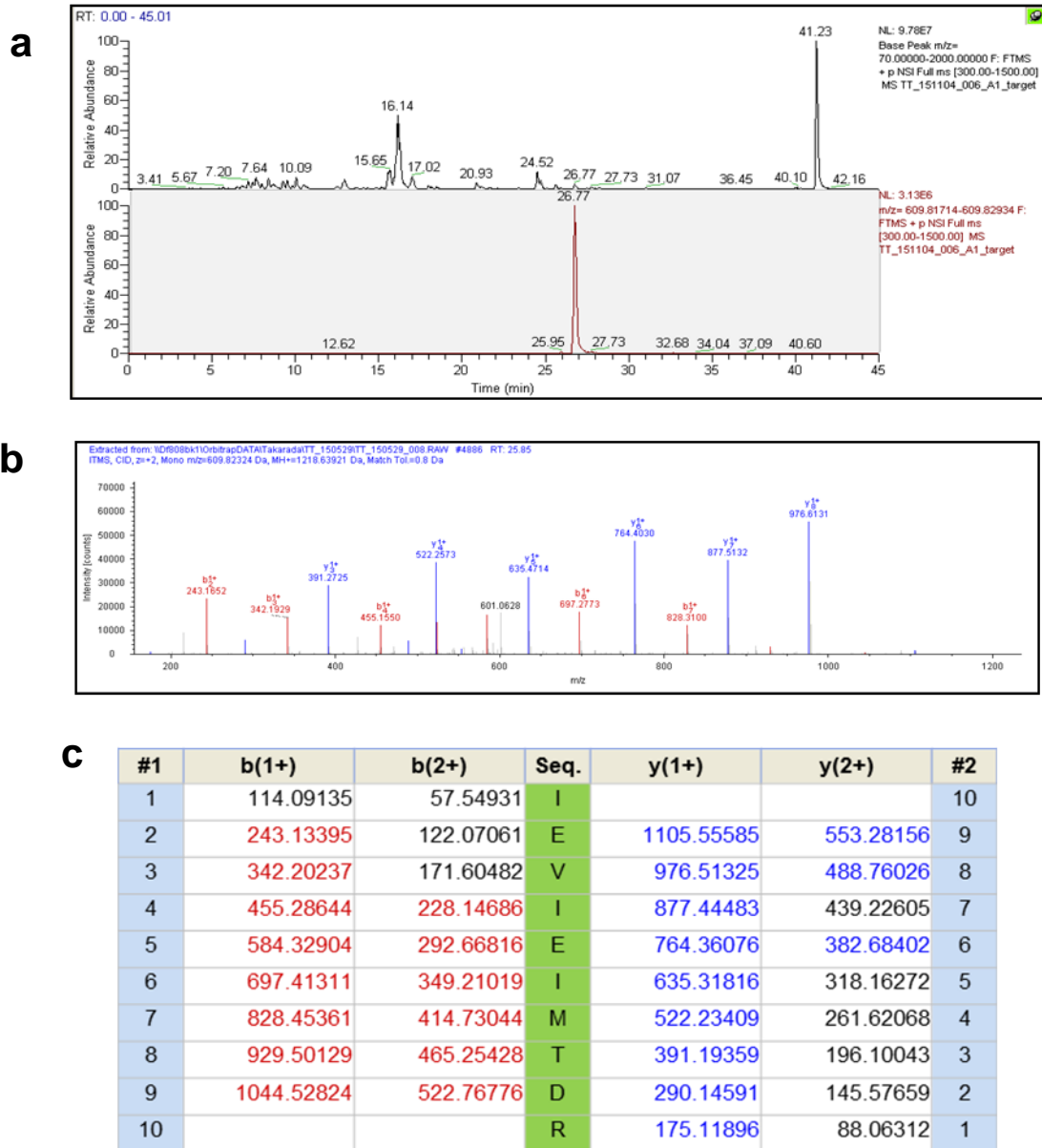


図 3-13-4 hnRNP A1 由来ペプチドの MS/MS 解析結果

Amino acid sequence coverage of hnRNP A1

▼ Cleavage sites by trypsin

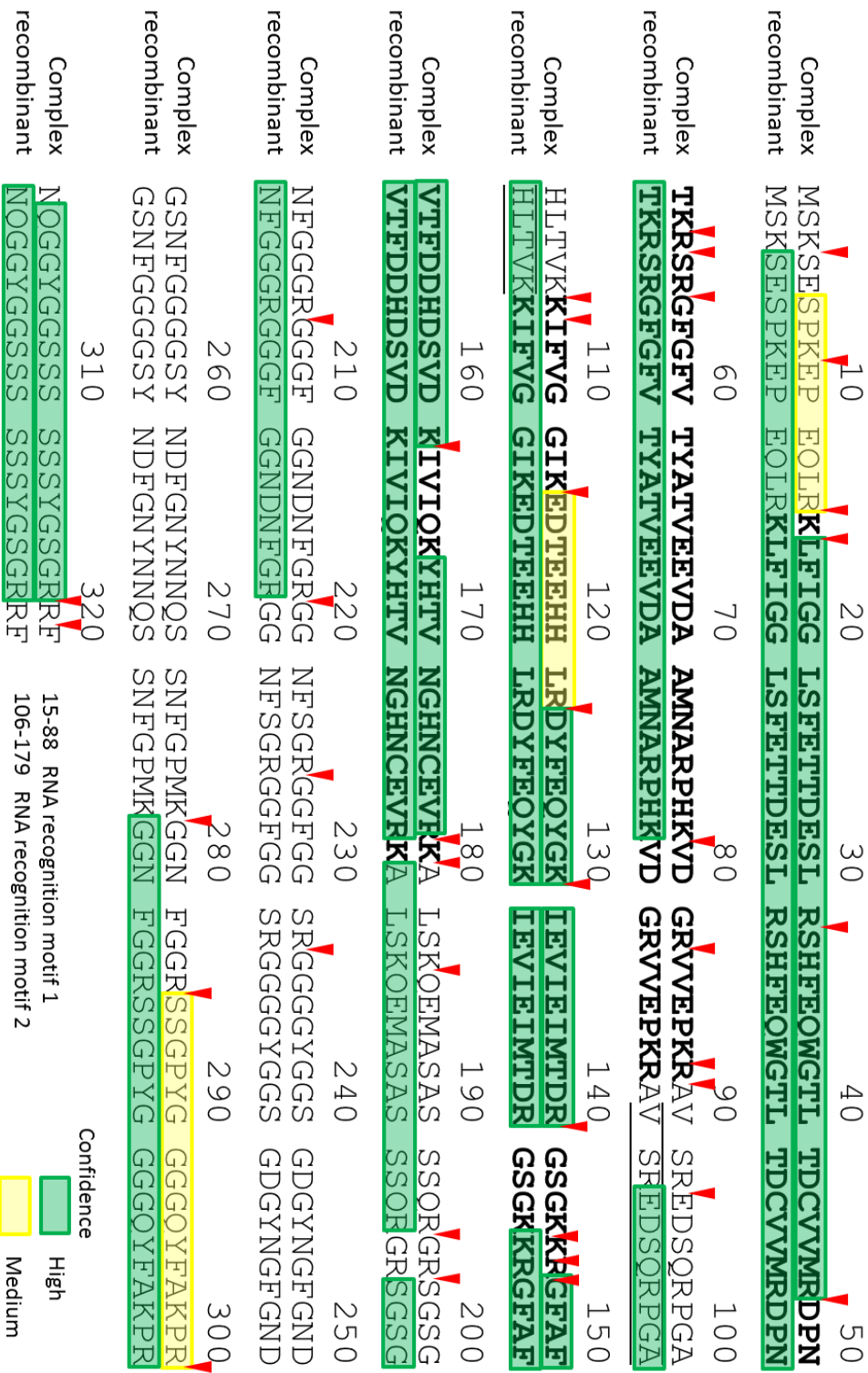


図 3-14 複合体と組換え蛋白質の hnRNP A1 同定領域の比較

3. Western blot 法での hnRNPA1 の結合確認

別のアプローチとして hnRNPA1 抗体を用いた western blot 法により複合体中に hnRNPA1 が含まれるかどうかを検証した。その結果、RNA と結合することで、移動度が低下したバンドが検出された（図 3-15）。これは蛍光検出されたバンドとサイズも一致しており hnRNPA1 は IR エクソン 11 領域に直接結合することが確認できた。

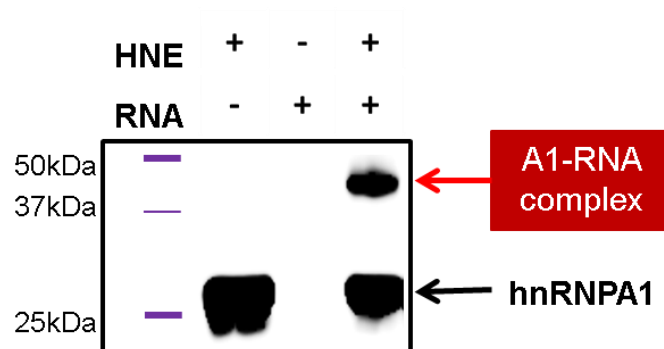


図 3-15 hnRNPA1 抗体を用いた Western blot 法

第5節 低分子化合物を用いた hnRNPA1-RNA 複合体形成阻害

hnRNPA1 は RNA に結合し、エクソン認識を抑制するスプライシング制御因子である。そこで、RES の CUGBP1 に対する作用と同様に、hnRNPA1 の RNA への結合性に影響を与える低分子化合物を発見することができればスプライシング異常の修正が可能になると考えた（図 3-16）。またスプライシングに影響を与える多くの低分子化合物は標的分子が不明であり、様々な因子に影響を与えることが考えられている。標的蛋白質の結合性に影響を与える低分子化合物の発見は特異性の高い化合物の開発につながる。

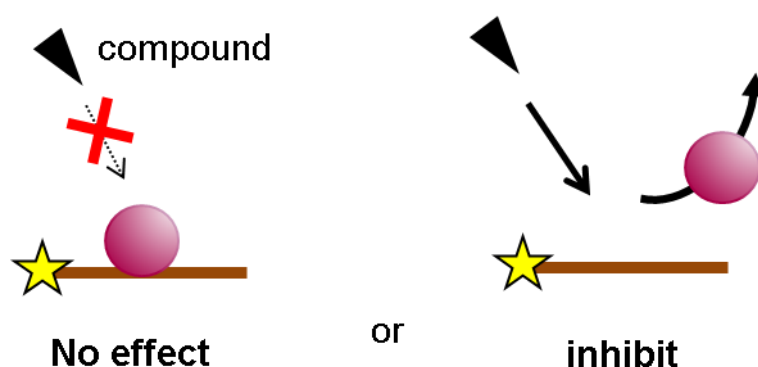


図 3-16 低分子化合物を用いた複合体形成阻害の模式図

第1項 実験試薬と実験方法

1. 実験試薬

(1) *In vitro* binding 反応

第1節と同様の試薬を用いて RNA-蛋白質複合体の形成を行った。

(2) hnRNPA1 の結合を阻害する低分子化合物の候補

RES（和光純薬）

Quercetin（QC）（SIGMA-ALDRICH）

Valproic acid（VPA）（和光純薬）

Hydroxyurea（HU）（SIGMA-ALDRICH）

Indoprofen（IP）（SIGMA-ALDRICH）

2. 実験方法

2-1 候補低分子化合物の調製

hnRNPA1 の IR エクソン 11 配列への結合を阻害する低分子化合物を探索するため、計 5 つの候補化合物を *in vitro* binding 反応液に添加した。*trans*-Resveratrol (RES)、Quercetin (QC)、Valproic acid (VPA)、Hydroxyurea (HU)、Indoprofen (IP) を候補として検討した。これら全ての化合物は DMSO に溶解した。各濃度は RES 1000 μ M、QC 500 μ M、VPA 50 mM、HU 50 mM、IP 100 μ M で検証を行った。これらの最終濃度は全て、細胞への添加時の 10 倍で統一した。

2-2 *In vitro* binding 反応

第 1 節と同様の方法で行った。反応の際に各候補化合物を加えた。

2-3 Native-PAGE による複合体分離

第 1 節と同様の方法で複合体の分離を行った。

2-4 蛍光検出

第 1 節と同様に ImageQuant LAS4000 を用いて、RNA プローブがもつ蛍光の検出を行った。

第2項 実験結果

1. hnRNPA1 の RNA への結合を阻害する低分子化合物の探索

hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害する低分子化合物を探索するため、第2章の第6節と同様に *in vitro* binding 反応を利用した。蛋白質源には hnRNPA1 の組換え蛋白質を用いることで、スクリーニングをシンプルな系とし、低分子化合物の探索をより簡便にできるようにした。hnRNPA1 の結合性への影響評価はこれまでと同様に RNA プロブの蛍光標識を検出することで確認した。

RES、Quercetin (QC)、Valproic acid (VPA)、Hydroxyurea (HU)、Indoprofen (IP) の5つの低分子化合物を用いて結合性への影響を検討した。その結果、ポリフェノールの一つである Quercetin (QC) が hnRNPA1 の IR エクソン 11 配列への結合を強く阻害することを見出した(図3-17)。第2章で CUGBP1 の結合を阻害した RES は hnRNPA1 の結合を阻害しなかった。

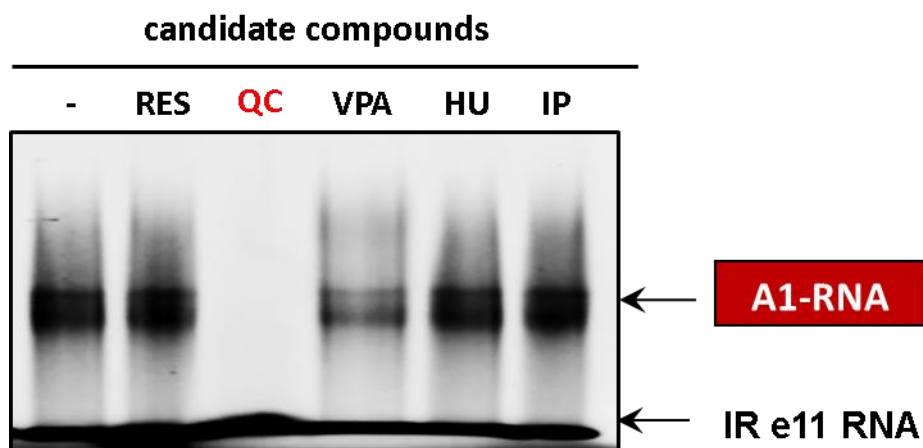


図 3-17 低分子化合物を用いた複合体形成阻害

2. QC の濃度依存的阻害作用

さらに QC は濃度依存的に hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害し、複合体由来の蛍光バンドの減少とフリープローブの増大を引き起こした（図 3-18）。この作用は分子量が近く、類似した薬理作用を多くもつ RES では変化が得られなかった。

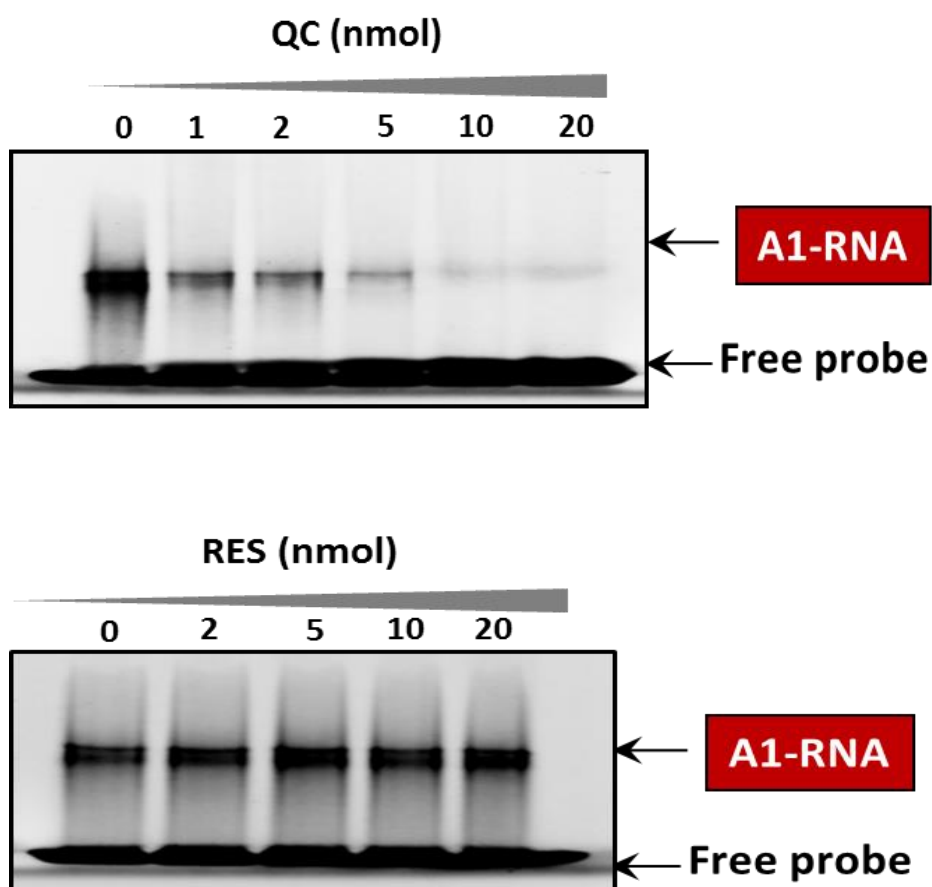


図 3-18 Quercetin (QC) の濃度依存的結合阻害

第6節 QC 添加と細胞内在性 IR スプライシング様式の変化

前節において QC が hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害することを見出した（図 3-18）。そこで第1章で RES を発見した際と同じ実験を行い、QC が細胞内在性 IR の選択的スプライシングに影響を与えるかどうかを検討した。

第1項 実験試薬および実験方法

1. 実験試薬

(1) 細胞培養試薬

第1章の第1節と同様の試薬を用いた。

(2) 使用した細胞

HeLa 細胞（ATCC）

(3) 候補低分子化合物

DMSO（和光純薬）

Quercetin（SIGMA-ALDRICH）

(4) 細胞からの全 RNA 抽出

第1章の第1節と同様の試薬を用いて RNA を抽出した。

(5) 逆転写反応による cDNA の獲得と PCR 増幅

第1章の第1節と同様の試薬を用いて cDNA を合成し、PCR を行った。

(6) スプライシング産物の解析

第1章の第1節と同様の試薬を用いて解析を行った。

2. 実験方法

2-1 QC の細胞への投与

i) QC の濃度調製

QC が IR エクソン 11 の認識を促進し、スプライシング様式を変更するかを検討した。QC は DMSO に溶解し、最終濃度が 50 μ M となるように培地中に添加した。

ii) 候補低分子化合物の投与

12 well プレーートの各 well に 2×10^5 個となるように播種し、一晚培養した HeLa 細胞の培地を除去し、5% FBS 含有 D-MEM 培地を各 well に 1 mL 加え、DMSO が最終濃度 0.1% となるように QC を添加した。8 時間培養後、細胞を回収し、

第3章

第1章の第2節と同様の方法で全RNAの抽出とRT-PCRによりスプライシング解析を行った。

2-2 細胞の播種、RT-PCR およびスプライシング産物の解析

細胞の播種、RT-PCR とスプライシング解析は第1章の第2節と同様の実験方法で行った。

第2項 実験結果

1. QC の IR エクソン 11 認識促進作用の検討

HeLa 細胞培養液中に最終濃度が 50 μ M となるように QC を添加した。スプライシング解析法は第1節の RES と同様の方法を用いて検討を行った。図 3-19 はこれまでと同様に、Exon11+IR の割合を半定量解析した結果を示している。その結果、QC の添加は Exon11+IR の割合を 43.9% から 59.9% に有意に増大させた(図 3-19)。

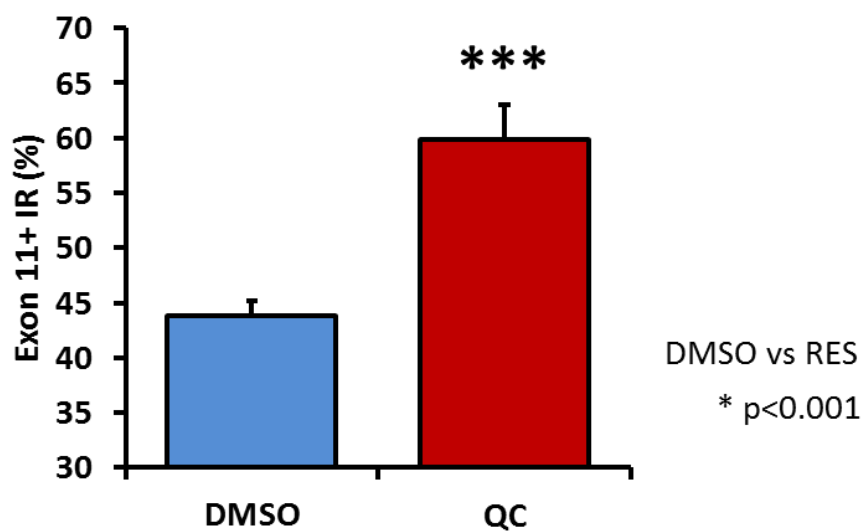


図 3-19 Quercetin (QC) の細胞内在性 IR のスプライシング調節作用

第7節 考 察

核酸医薬品の AO はスプライシング制御因子の RNA への結合を阻害することでスプライシングを操作する⁹³⁻⁹⁶⁾。現在では幾つかの遺伝子疾患の治療法として臨床試験が進んでいる。スプライシング制御因子を同定することは、結合阻害による蛋白質の機能変化や他の遺伝子への影響を知ることができ、より安全な医薬品の開発へとつながる。質量分析法は分子そのものから構造情報を得ることができるため、未知分子の同定が可能である。著者は分子生物学的なアプローチである EMSA 法と網羅的解析が可能な質量分析法を組み合わせた簡便なスプライシング制御因子同定法を構築した。本法を利用し、IR エクソン 11 領域に結合するスプライシング制御因子の同定を行った結果、同定された 228 種の蛋白質の内、49 種が結合蛋白質の候補として考えられた(表 3-1)。さらに、機能による分類から 30 種の蛋白質が RNA に結合し、機能することがわかった(表 3-1)。前述のようにスプライシング制御因子の多くは RNA と結合するための RNA 結合ドメイン (RBD) を有する。その中で最も広範に存在することが確認されている RNA recognition motif (RRM) をもつ蛋白質に絞り、抽出した結果、エクソン認識を抑制する hnRNPA1 が挙げられた(図 3-11)。

hnRNPA1 を原因とするスプライシング異常は多くの遺伝子疾患で報告されている¹⁰⁰⁻¹⁰⁴⁾。最も研究が進む遺伝子が脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy; SMA) の発症に関わる SMN2 遺伝子である。本症の責任遺伝子は SMN1 遺伝子であり、その欠損や遺伝子内変異により、SMN 蛋白質が欠損することで発症する¹⁰⁵⁾。SMN2 遺伝子は選択的スプライシングにより主としてエクソン 7 を欠失した機能不全蛋白質 ($\Delta 7$) を産生する。しかし、SMN2 遺伝子から僅かに産生されるエクソン 7 を含む機能蛋白質 (Full-length) の存在により、SMN1 遺伝子の対立遺伝子双方の変異を有する患者の症状が緩和されることが知られている¹⁰⁶⁾。

著者ら¹⁰⁷⁾は β_2 受容体刺激薬である Salbutamol が protein kinase A (PKA) シグナル経路を活性化し、SMN 蛋白質のユビキチン化を部分的に阻害することで蛋白質の安定化を促すことを報告した。また、SMN 蛋白質は他の蛋白質と複合体を形成することで安定化する¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾。この複合体形成には SMN 蛋白質内に存在する Tudor ドメインと YG ボックスが重要な役割を担う。著者は、これらのドメインが遺伝子変異によって失われている重症患者を経験した。遺伝子変異をもつ SMN 発現プラスミドを構築し、蛋白質の安定性を確認した結果、変異を有

する SMN 蛋白質は不安定化が引き起こされていた。この結果は複合体の形成が蛋白質の安定化に重要であり、疾患発症へと直結することを示唆している。

SMA 治療として、このような機能蛋白質の安定化を目指す方法以外にも、本研究のように選択的スプライシングを操作し、機能蛋白質の産生を促す方法がある。RNA への結合を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド「Nusinersen」は本邦においても 2016 年 12 月に製造承認申請が行われ、日本初のアンチセンス医薬品となる予定である。その治療標的には hnRNPA1 が選択されている。

これらのことを踏まえ、hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害する低分子化合物を発見することができれば、RES とは異なる作用をもつ DM1 患者への治療薬候補になると考えた。hnRNPA1 の結合阻害作用をもとに低分子化合物のスクリーニングを行った。候補には RES と同様に食品成分である Quercetin (QC) と前述の SMN2 遺伝子のスプライシングを修正することが報告されている低分子化合物 3 種 (VPA、HU、IP) で検討を行った。その結果、QC が hnRNPA1 の結合を強く阻害することを見出した。さらにこの作用は RES の添加では効果が得られなかった (図 3-18)。この結果は RES のスプライシング調節作用は hnRNPA1 を介さないことを示すと同時に、CUGBP1 への結合阻害作用は非特異的なものではないことを示唆する。

Quercetin (QC) はリンゴ、タマネギ、茶、ブドウ、ブロッコリー、モロヘイヤなどの食品に含まれるポリフェノールである (図 3-19)。RES と同様に抗酸化作用を含む多様な薬理作用を有しており、健康への有益な効果から健康食品として幅広く市場に流通している。さらに細胞増殖抑制やアポトーシス誘導作用をもつことから前立腺がんを含む抗がん剤として注目されている¹¹¹⁻¹¹³⁾。ヒトでの臨床試験も行われており、あらゆる可能性秘めた成分といえる。QC は hnRNPA1 の C 末端と結合し、transportin-1 (Tnpol) を介した細胞質から核への

Quercetin (QC)

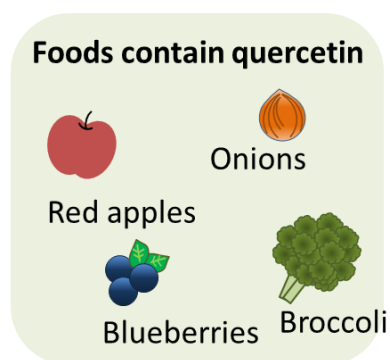
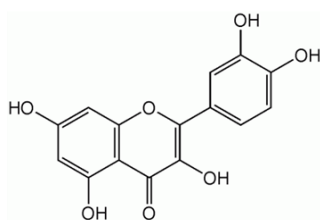


図 3-19 QC の化学構造式と食品

移行を妨げることで抗がん作用を示すことが報告されている¹¹⁴⁾。さらに QC は hnRNP C の脱リン酸化作用も報告されており、スプライシング反応を調節する可能性が示唆されていた¹¹⁵⁾。そこで hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合阻害を示した QC を用いて細胞内在性 IR の選択的スプライシングの操作を試みた。そして、エクソン 11 の認識を促進し、スプライシング修正効果が確認された。

以上の結果から、標的としたエクソンのスプライシングに関わる制御因子の同定法を構築し、hnRNPA1 を見出した。さらにその結合を阻害する薬物スクリーニングから QC を見出した。そして QC が細胞内在性 IR のスプライシングを調節することを確認した (図 3-20)。

スプライシング調節作用をもつ低分子化合物の多くはその作用が確認されているにも関わらず、スプライシングを変更する直接的な作用点は不明なものが多い。

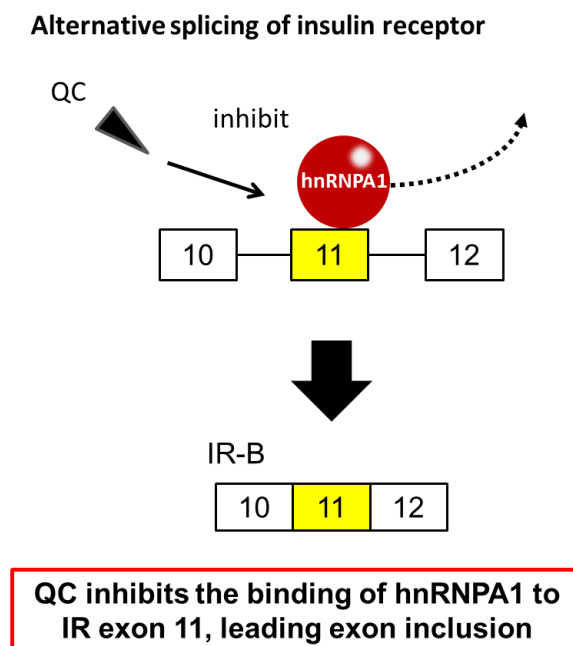


図 3-20 hnRNPA1 の結合を阻害する QC とスプライシング異常の修正

本研究では特定の因子に注目し、その結合を阻害する物質を探索した。見出した QC は RES と同様に様々な生体内作用をもつことが知られているため、スプライシング調節作用の発現には他の経路も同時に関与している可能性が考えられる。しかしながら、阻害作用が見られた低分子化合物をさらに最適化することができれば、より特異的な物質の発見につながると考える。

第8節 小 括

スプライシング制御因子同定法の構築とその応用を試み、以下の知見を得た。

1. IR エクソン 11 全領域からなる RNA プローブと HeLa 細胞核抽出液を反応させ、電気泳動を行った結果、4 つの複合体形成が観察された
2. 質量分析法で複合体構成蛋白質の解析を行い、スプライシング制御因子の多くが有する RNA 認識モチーフ (RRM) によって分類した結果、IR エクソン 11 のスプライシングに関わることが報告されていた hnRNPA1 が同定された
3. 光架橋形成反応を利用することで hnRNPA1 が IR エクソン 11 領域に直接結合していることが確認できた
4. ポリフェノールの一つである QC が hnRNPA1 の IR エクソン 11 領域への結合を阻害した
5. QC は HeLa 細胞内在性 IR の選択的スプライシング時にエクソン 11 の取り込みを促進させた

総 括

本研究では生体内機構の選択的スプライシングに着目し、耐糖能異常の原因となる IR のスプライシング異常を修正する低分子化合物を探索した。さらに、汎用可能なスプライシング制御因子同定法を構築し、それを応用した低分子化合物の探索を試みた。これにより以下の知見を得ることができた。

1. インスリン受容体 (IR) の選択的スプライシングとその異常修正

IR の選択的スプライシングを赤ワイン等に多く含まれる RES が調節することを見出した。この作用は細胞種に依存した反応を示し、耐糖能異常の原因となる DM1 患者由来細胞の異常を重症度に関わらず、正常以上にまで修正することを見出した。

2. RES のスプライシング調節作用の検討

RES の代表的なシグナル経路である SIRT1 および AMPK 活性化経路はスプライシング調節作用に関与しないことを見出した。RES は MBNL1 非依存的に効果を示し、新規蛋白質合成を阻害した環境下でも効果を示した。IR のスプライシング異常の原因の一つである CUGBP1 が IR エクソン 11 上流配列に結合することを見出し、RES がその結合性に影響を与えていることを発見した。

3. スプライシング制御因子同定法の構築と応用

RNA-EMSA 法を利用した分子生物学的なアプローチと網羅的解析が可能な質量分析アプローチを組み合わせた制御因子同定法を構築した。本法により、IR のスプライシングを制御することが知られている hnRNPA1 が RNA に直接結合することを確認した。さらに、結合を阻害する低分子化合物を探索した結果、ポリフェノールである QC の結合阻害作用を発見した。さらに QC は細胞内在性 IR のスプライシングを調節した。本法を利用することで、標的となる制御因子を同定し、標的分子側からの低分子化合物の発見が容易になると考える。

現在のオミックス解析では各階層が独立した研究分野として扱われることが多い。しかしながら、生体内では **RNA** と蛋白質の相互作用等の階層を超えた強い関わりが存在する。これらの階層を繋ぐ研究分野の発展は複雑な生体機能の解明や新規治療薬開発に極めて重要となる。本研究では「分子生物学的な実験手法」と「網羅的解析が可能な質量分析法」を組み合わせ、「未知結合蛋白質同定法」を構築した。これらの特定配列の解析に限定されない手法は **DNA** や **RNA** に結合する様々な蛋白質の解析に応用することが可能である。本研究手法の発展は複雑な生命現象に関する新知見をもたらすだけでなく、新たな治療標的の発見などの疾患治療につながることを期待できる。

謝 辞

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました衛生化学講座 竹内敦子准教授に心より深く感謝の意を表します。

本論文の審査過程において、数々の御助言と御指導を賜りました主査の生命有機化学講座 和田昭盛教授、および副査の臨床薬学講座 江本憲昭教授、衛生化学講座 長谷川潤教授に深く感謝致します。

RNA スプライシングに関する研究を遂行するにあたり、幾多の貴重な御意見と御指導、御鞭撻を賜りました神戸大学名誉教授 神戸学院大学リハビリテーション学部 松尾雅文教授ならびに JCR ファーマ 西田篤史博士に深謝致します。

本研究ならびに学部時の研究に対し、多大な御協力と御助言を賜りました神戸大学大学院医学研究科 疫学分野 西尾久英教授に心より感謝致します。

本研究および大学院生活において、幾多の御助言や御指導を賜りました 岡野登志夫名誉教授、また多大な御協力を賜りました衛生化学講座 中川公恵准教授ならびに津川尚子准教授に深謝致します。

プロテオミクスに関する機器の使用や測定法に対し、御指導ならびに御鞭撻を賜りました神戸大学 バイオシグナル総合研究センター 吉野健一助教に深く感謝致します。

本研究の報告にあたり、海外渡航援助となるトラベルアワードを賜りました日本質量分析学会ならびに和田芳直会長、JMS Award および海外での受賞講演という貴重な機会をいただきました JMS Award chair, Prof. John Langley ならびに IMSC2016 関係諸氏に深謝致します。

本研学生活を通し、幾多の貴重な御意見や御協力を賜りました生命有機化学講座 都出千里講師ならびに終始実験にご協力いただきました中央分析室 高橋和子学士、峯岸真希学士、内池光希学士、尾田綾香学士、竹田有希菜さん、野洲朋花さん、安野理さん、塩見のぞみさん、野村さとよさん、長瀬明子さんをはじめとする中央分析室の諸氏に心より感謝致します。

参考文献

- 1) Cusack BP and Wolfe KH. Changes in alternative splicing of human and mouse genes are accompanied by faster evolution of constitutive exons. *Mol Biol Evol.* **22**, 2198-2208 (2005)
- 2) Zahler AM. Alternative splicing in *C. elegans*. *WormBook*. 1-13 (2005)
- 3) Busch A and Hertel KJ. Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. **3**, 1-12 (2012)
- 4) Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, and Matsuo M. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun.* **2**, 308 (2011)
- 5) Rautiainen S, Manson JE, Lichtenstein AH, and Sesso HD. Dietary supplements and disease prevention - a global overview. *Nat Rev Endocrinol.* **12**, 407-420 (2016)
- 6) Takarada T, Nishida A, Takeuchi A, Lee T, Takeshima Y, and Matsuo M. Resveratrol enhances splicing of insulin receptor exon 11 in myotonic dystrophy type 1 fibroblasts. *Brain Dev.* **37**, 661-668 (2015)
- 7) Zhang PY. Polyphenols in Health and Disease. *Cell Biochem Biophys.* **73**, 649-664 (2015)
- 8) Das J, Ramani R, and Suraju MO. Polyphenol compounds and PKC signaling. *Biochim Biophys Acta.* **1860**, 2107-2121 (2016)
- 9) Lewandowska H, Kalinowska M, Lewandowski W, Stepkowski TM, and Brzoska K. The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *J Nutr Biochem.* **32**, 1-19 (2016)
- 10) Wang GS and Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* **8**, 749-761 (2007)
- 11) Ranum LP and Day JW. Myotonic dystrophy: RNA pathogenesis comes into focus. *Am J Hum Genet.* **74**, 793-804 (2004)
- 12) Cardani R, Mancinelli E, Rotondo G, Sansone V, and Meola G. Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2. *Eur J Histochem.* **50**, 177-182 (2006)
- 13) Savkur RS, Philips AV, and Cooper TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat*

- Genet.* **29**, 40-47 (2001)
- 14) Seino S and Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **159**, 312-316 (1989)
 - 15) Sesti G, Tullio AN, D'Alfonso R, Napolitano ML, Marini MA, Borboni P, Longhi R, Albonici L, Fusco A, Agliano AM, and et al. Tissue-specific expression of two alternatively spliced isoforms of the human insulin receptor protein. *Acta Diabetol.* **31**, 59-65 (1994)
 - 16) Belfiore A and Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. *Endocr Relat Cancer.* **18**, R125-147 (2011)
 - 17) Matsuo M. Duchenne and Becker muscular dystrophy: from gene diagnosis to molecular therapy. *IUBMB Life.* **53**, 147-152 (2002)
 - 18) Aartsma-Rus A and van Ommen GJ. Less is more: therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol.* **8**, 873-875 (2009)
 - 19) Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, and Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet.* **82**, 834-848 (2008)
 - 20) Burghes AH and McGovern VL. Antisense oligonucleotides and spinal muscular atrophy: skipping along. *Genes Dev.* **24**, 1574-1579 (2010)
 - 21) Dias N and Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther.* **1**, 347-355 (2002)
 - 22) Markus MA, Marques FZ, and Morris BJ. Resveratrol, by modulating RNA processing factor levels, can influence the alternative splicing of pre-mRNAs. *PLoS One.* **6**, e28926 (2011)
 - 23) Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, Suzuki M, Yamamoto N, Herzenberg LA, and Hagiwara M. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 11329-11333 (2006)
 - 24) Slaugenhaupt SA, Mull J, Leyne M, Cuajungco MP, Gill SP, Hims MM, Quintero F, Axelrod FB, and Gusella JF. Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum Mol Genet.* **13**, 429-436 (2004)
 - 25) Anderson SL, Qiu J, and Rubin BY. EGCG corrects aberrant splicing of IKAP mRNA in cells from patients with familial dysautonomia. *Biochem Biophys Res Commun.* **310**, 627-633 (2003)
 - 26) Munch C, Zhu BG, Leven A, Stamm S, Einkorn H, Schwalenstocker B, Ludolph AC,

- Riepe MW, and Meyer T. Differential regulation of 5' splice variants of the glutamate transporter EAAT2 in an in vivo model of chemical hypoxia induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurosci Res.* **71**, 819-825 (2003)
- 27) Fubini SL, Todhunter RJ, Burton-Wurster N, Vernier-Singer M, and MacLeod JN. Corticosteroids alter the differentiated phenotype of articular chondrocytes. *J Orthop Res.* **19**, 688-695 (2001)
- 28) Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, and McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* **9**, 2409-2413 (1990)
- 29) Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, and Haring HU. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* **177**, 1013-1018 (1991)
- 30) Kosaki A, Pillay TS, Xu L, and Webster NJ. The B isoform of the insulin receptor signals more efficiently than the A isoform in HepG2 cells. *J Biol Chem.* **270**, 20816-20823 (1995)
- 31) Araki E, Murakami T, Shirotani T, Kanai F, Shinohara Y, Shimada F, Mori M, Shichiri M, and Ebina Y. A cluster of four Sp1 binding sites required for efficient expression of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem.* **266**, 3944-3948 (1991)
- 32) Cameron KE, Resnik J, and Webster NJ. Transcriptional regulation of the human insulin receptor promoter. *J Biol Chem.* **267**, 17375-17383 (1992)
- 33) Udd B and Krahe R. The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *The Lancet Neurology.* **11**, 891-905 (2012)
- 34) Liu G and Leffak M. Instability of (CTG) n^* (CAG) n trinucleotide repeats and DNA synthesis. *Cell Biosci.* **2**, 7 (2012)
- 35) Philips AV, Timchenko LT, and Cooper TA. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science.* **280**, 737-741 (1998)
- 36) Ho TH, Bundman D, Armstrong DL, and Cooper TA. Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* **14**, 1539-1547 (2005)
- 37) Charlet BN, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, and Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell.* **10**, 45-53 (2002)
- 38) Baur JA and Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov.* **5**, 493-506 (2006)

- 39) Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, and Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. **425**, 191-196 (2003)
- 40) Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, and Chung JH. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. **148**, 421-433 (2012)
- 41) Atten MJ, Godoy-Romero E, Attar BM, Milson T, Zopel M, and Holian O. Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. *Invest New Drugs*. **23**, 111-119 (2005)
- 42) Mukherjee S, Dudley JI, and Das DK. Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*. **8**, 478-500 (2010)
- 43) Brasnyo P, Molnar GA, Mohas M, Marko L, Laczy B, Cseh J, Mikolas E, Szijarto IA, Merei A, Halmai R, Meszaros LG, Sumegi B, and Wittmann I. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr*. **106**, 383-389 (2011)
- 44) Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, Wendum D, Claperon A, Chretien Y, Rey C, Scatton O, Soubrane O, Conti F, Praz F, Housset C, Rosmorduc O, and Desbois-Mouthon C. Mitogenic insulin receptor-A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR-mediated dysregulation of RNA splicing factors. *Cancer Res*. **73**, 3974-3986 (2013)
- 45) Talukdar I, Sen S, Urbano R, Thompson J, Yates JR, 3rd, and Webster NJ. hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One*. **6**, e27869 (2011)
- 46) Sen S, Talukdar I, and Webster NJ. SRp20 and CUG-BP1 modulate insulin receptor exon 11 alternative splicing. *Mol Cell Biol*. **29**, 871-880 (2009)
- 47) Beaudoin MS, Perry CG, Arkell AM, Chabowski A, Simpson JA, Wright DC, and Holloway GP. Impairments in mitochondrial palmitoyl-CoA respiratory kinetics that precede development of diabetic cardiomyopathy are prevented by resveratrol in ZDF rats. *J Physiol*. **592**, 2519-2533 (2014)
- 48) Hao E, Lang F, Chen Y, Zhang H, Cong X, Shen X, and Su G. Resveratrol alleviates endotoxin-induced myocardial toxicity via the Nrf2 transcription factor. *PLoS One*. **8**, e69452 (2013)

- 49) Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, and Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. **275**, 218-220 (1997)
- 50) Houtkooper RH, Pirinen E, and Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **13**, 225-238 (2012)
- 51) Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W, and Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*. **6**, 759-767 (2007)
- 52) Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, and Imai S. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab*. **18**, 416-430 (2013)
- 53) Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, and Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab*. **8**, 347-358 (2008)
- 54) Mitchell SJ, Martin-Montalvo A, Mercken EM, Palacios HH, Ward TM, Abulwerdi G, Minor RK, Vlasuk GP, Ellis JL, Sinclair DA, Dawson J, Allison DB, Zhang Y, Becker KG, Bernier M, and de Cabo R. The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell Rep*. **6**, 836-843 (2014)
- 55) Long YC and Zierath JR. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*. **116**, 1776-1783 (2006)
- 56) Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, and Saha AK. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes*. **7**, 241-253 (2014)
- 57) Pacholec M, Bleasdale JE, Chruncyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, and Ahn K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem*. **285**, 8340-8351 (2010)
- 58) Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, and Liu JO. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol*. **6**, 209-217 (2010)
- 59) Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, and Thornton CA. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet*. **13**,

- 3079-3088 (2004)
- 60) Mankodi A, Lin X, Blaxall BC, Swanson MS, and Thornton CA. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ Res.* **97**, 1152-1155 (2005)
 - 61) Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, and Cooper TA. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell.* **28**, 68-78 (2007)
 - 62) Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, and Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep.* **2**, 209 (2012)
 - 63) Takahashi N, Sasagawa N, Suzuki K, and Ishiura S. The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**, 518-523 (2000)
 - 64) Suzuki H, Jin Y, Otani H, Yasuda K, and Inoue K. Regulation of alternative splicing of alpha-actinin transcript by Bruno-like proteins. *Genes Cells.* **7**, 133-141 (2002)
 - 65) Patel R, Apostolatos A, Carter G, Ajmo J, Gali M, Cooper DR, You M, Bisht KS, and Patel NA. Protein kinase C delta (PKCdelta) splice variants modulate apoptosis pathway in 3T3L1 cells during adipogenesis: identification of PKCdeltaII inhibitor. *J Biol Chem.* **288**, 26834-26846 (2013)
 - 66) Leiro JM, Varela M, Piazzon MC, Arranz JA, Noya M, and Lamas J. The anti-inflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing. *Mol Immunol.* **47**, 1114-1120 (2010)
 - 67) Dardis A, Zanin I, Zampieri S, Stuani C, Pianta A, Romanello M, Baralle FE, Bembi B, and Buratti E. Functional characterization of the common c.-32-13T>G mutation of GAA gene: identification of potential therapeutic agents. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1291-1302 (2014)
 - 68) Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, and Chung JH. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes.* **59**, 554-563 (2010)
 - 69) Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakis C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, and Auwerx J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* **11**, 213-219 (2010)
 - 70) Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, Boland A, Battail C, Artiguenave F, Deleuze JF, Benit P, Rustin P, Franc S, Charpentier G, Furling D,

- Bassez G, Nissan X, Martinat C, Peschanski M, and Baghdoyan S. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol Ther Nucleic Acids*. **4**, e262 (2015)
- 71) Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, and Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. **108**, 1167-1174 (2001)
- 72) Slater SJ, Seiz JL, Cook AC, Stagliano BA, and Buzas CJ. Inhibition of protein kinase C by resveratrol. *Biochim Biophys Acta*. **1637**, 59-69 (2003)
- 73) Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Luhrmann R, Garcia-Blanco MA, and Manley JL. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*. **368**, 119-124 (1994)
- 74) Misteli T, Caceres JF, and Spector DL. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*. **387**, 523-527 (1997)
- 75) Zhou Z and Fu XD. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*. **122**, 191-207 (2013)
- 76) Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Munoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Caceres JF, Coso OA, and Srebrow A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol*. **12**, 1037-1044 (2005)
- 77) Okunola HL and Krainer AR. Cooperative-binding and splicing-repressive properties of hnRNP A1. *Mol Cell Biol*. **29**, 5620-5631 (2009)
- 78) Jean-Philippe J, Paz S, and Caputi M. hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci*. **14**, 18999-19024 (2013)
- 79) Aebersold R and Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. **422**, 198-207 (2003)
- 80) Dettmer K, Aronov PA, and Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. **26**, 51-78 (2007)
- 81) Gross JH, *Mass spectrometry : a textbook* 2004, Berlin ; New York: Springer. xviii, 518 p.
- 82) Smith RD, Loo JA, Edmonds CG, Barinaga CJ, and Udseth HR. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal Chem*. **62**, 882-899 (1990)
- 83) Krusemark CJ, Frey BL, Belshaw PJ, and Smith LM. Modifying the charge state distribution of proteins in electrospray ionization mass spectrometry by chemical

- derivatization. *J Am Soc Mass Spectrom.* **20**, 1617-1625 (2009)
- 84) Banerjee S and Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem.* **2012**, 282574 (2012)
- 85) Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, and Jungblut PR. Peptide mass fingerprinting. *Methods.* **35**, 237-247 (2005)
- 86) Huynh ML, Russell P, and Walsh B. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. *Methods Mol Biol.* **519**, 507-513 (2009)
- 87) Johnson RS, Martin SA, Biemann K, Stults JT, and Watson JT. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem.* **59**, 2621-2625 (1987)
- 88) Eng JK, McCormack AL, and Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom.* **5**, 976-989 (1994)
- 89) Rio DC. Electrophoretic mobility shift assays for RNA-protein complexes. *Cold Spring Harb Protoc.* **2014**, 435-440 (2014)
- 90) Wang K, Gao Y, Peng X, Yang G, Gao F, Li S, and Zhu Y. Using FAM labeled DNA oligos to do RNA electrophoretic mobility shift assay. *Mol Biol Rep.* **37**, 2871-2875 (2010)
- 91) Afroz T, Cienikova Z, Clery A, and Allain FH. One, Two, Three, Four! How Multiple RRM's Read the Genome Sequence. *Methods Enzymol.* **558**, 235-278 (2015)
- 92) Lunde BM, Moore C, and Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 479-490 (2007)
- 93) Aartsma-Rus A. Overview on DMD exon skipping. *Methods Mol Biol.* **867**, 97-116 (2012)
- 94) Matsuo M. Duchenne/Becker muscular dystrophy: from molecular diagnosis to gene therapy. *Brain Dev.* **18**, 167-172 (1996)
- 95) van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooij AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhardt PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, and van Ommen GJ. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* **357**, 2677-2686 (2007)
- 96) Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhardt PF, Heuvelmans N, Holling T, Janson AA, Platenburg GJ, Sipkens JA, Sitsen JM, Aartsma-Rus A, van

- Ommen GJ, Buyse G, Darin N, Verschuuren JJ, Campion GV, de Kimpe SJ, and van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* **364**, 1513-1522 (2011)
- 97) Greenberg JR. Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res.* **6**, 715-732 (1979)
- 98) Hartley R, Le Meuth-Metzinger V, and Osborne HB. Screening for sequence-specific RNA-BPs by comprehensive UV crosslinking. *BMC Mol Biol.* **3**, 8 (2002)
- 99) Huppertz I, Attig J, D'Ambrogio A, Easton LE, Sibley CR, Sugimoto Y, Tajnik M, Konig J, and Ule J. iCLIP: protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods.* **65**, 274-287 (2014)
- 100) Mayeda A and Krainer AR. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell.* **68**, 365-375 (1992)
- 101) Guo R, Li Y, Ning J, Sun D, Lin L, and Liu X. HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of interferon regulatory factor-3 and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One.* **8**, e62729 (2013)
- 102) Oh H, Lee E, Jang HN, Lee J, Moon H, Sheng Z, Jun Y, Loh TJ, Cho S, Zhou J, Green MR, Zheng X, and Shen H. hnRNP A1 contacts exon 5 to promote exon 6 inclusion of apoptotic Fas gene. *Apoptosis.* **18**, 825-835 (2013)
- 103) Del Gatto-Konczak F, Olive M, Gesnel MC, and Breathnach R. hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol Cell Biol.* **19**, 251-260 (1999)
- 104) Kashima T and Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* **34**, 460-463 (2003)
- 105) Kolb SJ and Kissel JT. Spinal muscular atrophy: a timely review. *Arch Neurol.* **68**, 979-984 (2011)
- 106) Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, and Mathew CG. Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet.* **6**, 467-474 (1998)
- 107) Harahap NI, Nurputra DK, Rochmah MA, Shima A, Morisada N, Takarada T, Takeuchi A, Tohyama Y, Yanagisawa S, and Nishio H. Salbutamol inhibits ubiquitin-mediated survival motor neuron protein degradation in spinal muscular atrophy cells. *Biochem Biophys Res.* **4**, 351-356 (2015)
- 108) Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, and Androphy EJ. SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular

- atrophy severity. *Nat Genet.* **19**, 63-66 (1998)
- 109) Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, and Davies KE. Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum Mol Genet.* **6**, 497-500 (1997)
- 110) Burnett BG, Munoz E, Tandon A, Kwon DY, Sumner CJ, and Fischbeck KH. Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol.* **29**, 1107-1115 (2009)
- 111) Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, and Ramos S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J Nutr.* **136**, 2715-2721 (2006)
- 112) Kim MC, Lee HJ, Lim B, Ha KT, Kim SY, So I, and Kim BJ. Quercetin induces apoptosis by inhibiting MAPKs and TRPM7 channels in AGS cells. *Int J Mol Med.* **33**, 1657-1663 (2014)
- 113) Parvaresh A, Razavi R, Rafie N, Ghiasvand R, Pourmasoumi M, and Miraghajani M. Quercetin and ovarian cancer: An evaluation based on a systematic review. *J Res Med Sci.* **21**, 34 (2016)
- 114) Ko CC, Chen YJ, Chen CT, Liu YC, Cheng FC, Hsu KC, and Chow LP. Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells. *J Biol Chem.* **289**, 22078-22089 (2014)
- 115) Mayrand SH, Dwen P, and Pederson T. Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to pre-mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 7764-7768 (1993)