

拡張型心筋症の病態形成に関わる新規選択的スプライシング制御因子の同定と機能解析

村田知弥^{1,2)}, 水野聖哉^{1,2)}

- 1) 筑波大学 医学医療系 実験動物学研究室
- 2) 筑波大学 トランスボーダー医学研究センター 生命科学動物資源センター

【研究の背景】

心臓において mRNA 選択的スプライシングの異常が拡張型心筋症の原因となることが判明しつつある¹⁾。選択的スプライシングは主に RNA 結合タンパク質 (RBP) によって制御され、いくつかの RBP 欠損マウスが拡張型心筋症を呈することが報告されている²⁾。しかし生体内には多様な RBP が存在しており、互いに協調しあって選択的スプライシングを制御していると考えられ、RBP のネットワークと、その機能制御機構の解明が課題となっている。我々はこれまでに、タンパク質アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の生体内機能について研究を進めており、心筋特異的 PRMT1 欠損 (cKO) マウスを作製したところ、cKO マウスは性成熟前の幼若期に拡張型心筋症様の病態を呈し、心不全により死亡することが判明した³⁾。さらに RNA-seq 解析を行ったところ、cKO マウス心臓では選択的スプライシングに異常があることを見出した。この結果は PRMT1 が RBP のメチル化を介して、心臓の選択的スプライシングを制御することを示唆しているが、心臓における PRMT1 の基質 RBP は不明である。

【目 的】

そこで本研究では、PRMT1 の基質 RBP を直接 *in vivo* 心臓より同定し、拡張型心筋症の病態進展に関わる RBP の機能解析を行うことを目的とした。

【方 法】

① PRMT1 の *in vivo* BioID 解析 *in vivo* BioID により、心臓において PRMT1 と相互作用する RBP を同定する。BioID (近位依存性ビオチンラベリング) は、ビオチンリガーゼ融合タンパク質を発現させ、相互作用タンパク質を不可逆的にビオチン標識する手法である⁴⁾。ビオチン化タンパクを精製し、質量分析により相互作用因子を網羅的に同定できる。本手法は、酵素-基質間の一過性相互作用も捕捉可能である。本研究では、ゲノム編集により PRMT1 遺伝子の終止コドン直前に、ビオチンリガーゼ (miniTurbo) をノックインした PRMT1-miniTurbo KI マウスを作製した。

② PRMT1 の基質 RBP の解析 我々の先行研究において、培養細胞を用いた PRMT1 の BioID assay の結果、PRMT1 の新規基質 RBP (BCLAF1, ANGEL2, THRAP3) を同定した。これら 3 種の RBP の心臓における発現解析、KO マウスの解析、または培養細胞を用いて選択的スプライシングへの寄与について検証を行った。

【結 果】

① PRMT1-miniTurbo KI マウスを作製するため、Cas9/ガイド RNA 発現ベクターとドナーベクターを構築し、マウス受精卵へのマイクロインジェクションを行ったが、2 回の試行において、産仔数が著しく少なく、KI マウスは得られなかった。これは PRMT1 遺伝子欠損による胎生致死が原因と考えられた。しかし偶然にもガイド RNA のターゲット配列内に変異を有する Indel マウスを 1 匹得られた。この変異アリルは Cas9 による切断を受けないため、ヘテロ Indel マウス由来精子と野生型マウス

卵を体外受精し、その受精卵(野生型またはヘテロ Indel)に対し、再度マイクロインジェクションを行ったところ、PRMT1-miniTurbo KI マウスを 1 匹得ることができた。

② 先行研究にて同定した PRMT1 の基質 RBP は 3 種ともマウス心臓で発現していた。*Angel2*-KO マウスを作製したところ、心臓に表現型は認められなかった。*Thrap3*-KO マウスは現在作製中である。BCLAF1 は、pre-mRNA の 3' splice site に結合する U2AF65 と相互作用することが知られている⁵⁾。そこで PRMT1-KO 細胞を作製し、BCLAF1-U2AF65 の結合を検証したところ、PRMT1 欠損により BCLAF1-U2AF65 の結合が低下することが判明した。

【考 察】

Indel マウスを使用することで PRMT1-miniTurbo KI マウスの作製に成功した。現在この系統を繁殖中であり、個体を得られ次第 *in vivo* BioID を実施する。また、PRMT1 は BCLAF1 と U2AF65 の結合を促進すると考えられ、PRMT1-BCLAF1-U2AF65 経路が心臓の選択的スプライシングを制御する可能性が示唆された。今後 BCLAF1-KO マウス、メチル化を受けない BCLAF1 変異体マウスを作製し、心機能や選択的スプライシングに対する影響を検証する予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

近年、心臓における選択的スプライシングを制御する RBP や、*Titin* 遺伝子をはじめとする RBP の重要なターゲット遺伝子が同定されつつある一方で、多様な RBP の協調による心臓選択的スプライシングの制御機構については未解明であり、臨床応用には結びついていない状況である。本研究の成果は心臓の選択的スプライシングを制御する上流シグナルの同定、さらには多様な RBP ネットワークの解明につながると考えられ、臨床への応用に向けた重要な知見を見出すことができると考えている。

【参考・引用文献】

- (1) van den Hoogenhof MM, *et al. Circ. Res.* (2016) PMID: 26846640
- (2) Ladd AN. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* (2016) PMID: 27017008
- (3) Murata K, *et al. iScience.* (2018) PMID: 30321814
- (4) Branon TC, *et al. Nat. Biotechnol.* (2018) PMID: 30125270
- (5) Savage KI, *et al. Mol. Cell.* (2014) PMID: 24746700