

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成 31 年 4 月 25 日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 生命科学研究所

職 名 准教授

氏 名 増田 誠司

| | | | | |
|---------------------------------|---|------------------|---------|--|
| 助 成 の 種 類 | 平成30年度 ・ 研究活動推進助成 | | | |
| 申請時の科研費 研究 課 題 名 | 活性フラボノイドによるスプライシング阻害の分子基盤解明と口腔ガン予防効果の評価 | | | |
| 上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容 | なし | | | |
| 助成金充当に関 わる共同研究者 | (所属・職名・氏名) なし | | | |
| 発表学会文献等 | (この研究成果を発表した学会・文献等) 第72回日本口腔科学会学術集会、倉田雅志 高島裕之 瀬尾茂人 増田誠司 渋谷恭之 「スプライシング阻害作用を持つ活性フラボノイドの作用機序の解明」 | | | |
| 成 果 の 概 要 | 研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」) | | | |
| 会 計 報 告 | 交付を受けた助成金額 | 1,000,000 円 | | |
| | 使用した助成金額 | 1,000,000 円 | | |
| | 返納すべき助成金額 | 0 円 | | |
| | 助成金の使途内訳 | 費 目 | 金 額 | |
| | | 消耗品費 | 971,629 | |
| | | 委託調査研究費(シーケンス解析) | 28,371 | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| 当財団の助成に つ いて | (今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) | | | |

研究目的

超高齢社会を迎えた現在、日本人の3人に1人は「ガン」によって死亡する。このため食品成分中の抗ガン化合物を見出し、サプリメント等の形で予防に役立てることができれば健康な長寿社会にとって理想的である。近年、抗ガン剤の創薬ターゲットとして mRNA の成熟過程(キャッピング、スプライシング、ポリアデニル化を総称)が注目されている。申請者は大豆イソフラボン画分に mRNA スプライシングを阻害する活性を見出した。次いで特に活性の強い化合物としてアピゲニン、ルテオリン、クリシン(活性フラボノイドと命名)を見出した。本研究は、活性フラボノイドによるスプライシング阻害の分子基盤を解明する。

研究成果

1. 活性フラボノイドの細胞内標的の同定

活性フラボノイドが結合する細胞内標的タンパク質を明らかにするためにフラボノイドをビーズに固定した。これを細胞の核抽出物と混合し、結合タンパク質を単離した。これを SDS-PAGE 電気泳動にて分離し、その後質量分析解析を行った。なお、クリシンについてはビーズに結合しなかったため解析対象から除外した。解析の結果、同定されたタンパク質の多くは mRNA splicing 関連タンパク質であった。この観察は、以前に観察していた活性フラボノイドがスプライシングを阻害する結果とよく符合した。

2. 活性フラボノイドによるスプライシング阻害の解析

活性フラボノイドがどのような mRNA のスプライシングを阻害するかについて RNA-seq 解析を行った。その結果を rMATS にて、5' 選択性、3' 選択性、イントロン保持、エキソンスキップ、相互排他的エキソン選択の5種類のスプライシング変化について解析を行なった。その結果、イントロン保持が最も頻度高く(約 10%)検出された。この観察は活性フラボノイドによってスプライシングが阻害されることとよく符合した。またイントロン保持と同程度にエキソンスキップも観察された。さらに頻度はイントロン保持に比べて半分程度以下であったが、5' 選択性、3' 選択性、相互排他的エキソン選択についても観察された。なおアピゲニン、ルテオリンそれぞれにおいて 5' 選択性、3' 選択性、イントロン保持、エキソンスキップ、相互排他的エキソン選択が変化していたが、どちらの因子でも同じ影響を受ける mRNA は半分程度であった。この現象について、実際にスプライシング変化が生じていることを RT-PCR にて確認した。この解析の結果、活性

フラボノイドは当初観察した単純なスプライシング阻害だけでなく、Global な選択的スプライシングの変化を引き起こすことを明らかにした。

なお、同じ影響を受ける mRNA は半分程度にとどまった可能性として2つ考えられた。まず第一に、アピゲニン、ルテオリンのスプライシング関連因子への結合部位が少し異なるために mRNA によってその影響が異なる可能性である。第二に、アピゲニン、ルテオリンには他の作用があり、この作用が影響している可能性である。今後検証を進める予定である。

3. 活性フラボノイドによるイントロン保持の解析

ついでイントロン保持についてさらに解析を行った。影響を受けるイントロンについて解析したところ弱いスプライス部位をもつイントロンが標的となりやすい結果が得られた。そこでミニ遺伝子を作成してその観察の検証を行った。弱いスプライス部位をもつイントロンを持つミニ遺伝子の場合、活性フラボノイドによりスプライシング阻害が観察された。そこで、標的となっているイントロンのスプライスサイトスコアを強くする変異を入れると活性フラボノイドの影響を受けなかった。このことから弱いスプライス部位をもつイントロンが標的となりうることを示した。

結語

食品由来化合物である活性フラボノイドは、選択的スプライシングに変化をもたらし、遺伝子発現制御に大きな影響を与えることが明らかとなった。