助成番号　210044				5－2

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	ミススプライシング産物の細胞内時空間的運命の決定			
研究テーマ（英文）	Determine the intracellular spatial-temporal fate of mis-splicing products			
研究期間	2021年 ～ 2022年		研究機関名　国立がん研究センター研究所	
研究代表者	氏名	（漢字）	吉見 昭秀	
		（カタカナ）	ヨシミ アキヒデ	
		（英文）	Akihide Yoshimi	
	所属機関・職名		国立がん研究センター研究所がん RNA 研究分野・分野長	
共同研究者（１名をこえる場合は、別紙追加用紙へ）	氏名	（漢字）		
		（カタカナ）		
		（英文）		
	所属機関・職名			

概要　（600 字～800 字程度にまとめてください。）

真核生物において mRNA の転写からスプライシング、翻訳までの過程は細胞内高次構造体により精緻に管理されており、この機構が破綻した際には様々な疾患の発症につながることが示されてきた。ところが、正常スプライシング産物（NSP）あるいはミススプライシング産物（MSP）の細胞内における RNA 分解経路については、体系的な理解がほとんどされていない。特に、細胞内の「どこで」「どのような」MSP が「どれだけ」処理されるのか、あるいは処理されずに翻訳されるのか、という問いに対して、我々はほとんど全く答えを持ち合わせていない。大豆たん白質 APEX（Ascorbate Peroxidase）の変異体である APEX2 は、これまで近接するたん白質の labeling に利用されてきたが、本研究では APEX2 による Proximity labeling 技術の RNA labeling への応用に挑戦し、上記の科学的問いに答えることを目的とする。

本研究ではまず 12 種類の細胞内小器官および各 RNA 分解機構の鍵となる分子に APEX2 を融合させた蛋白質を細胞内で発現させ、その発現・局在を確認した上で、多岐にわたる項目について RNA の Proximity labeling のための条件検討を約 1 年間にわたり行い、最適条件の同定に成功し、実際に対照群と比較して、50-250 倍程度の enrichment が得られるようになった。そこで、構築した最適化プラットフォームを用いて、いよいよ実際に 12 種類の分子に近接する RNA を labeling し、次世代シークエンスによる解析を実施する段階にまで到達することができた。

発表文献 （この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題	なし				
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録 （100 語～200 語程度にまとめてください。）
Products of aberrant RNA splicing are frequently associated with a variety of diseases including cancers and metabolic/genetic disorders. Especially, mutations in genes encoding splicing factors are commonly observed in hematologic malignancies as well as solid tumors. However, intracellular fate of mis-splicing products is largely unknown. Therefore, we aimed to trace the intracellular fate of normal and mis-splicing products in leukemic cells bearing a hotspot mutation in *SRSF2*, a common target of genetic mutations across cancers. To achieve this goal, we utilized a mutant form of APEX protein which is derived from soybean for proximity labeling. Mutant APEX2 protein was expressed in fusions with various proteins that determine the localization of themselves in the cells or that play an important role in the major RNA degeneration pathway, which enabled us to label RNAs around each APEX2 within several nanometers. Then, the labeled RNAs were collected by streptavidin beads and analyzed by next generation sequence. In this study, we successfully generated 12 cell lines with the *SRSF2* hotspot mutation and established a method for the proximity labeling, which will be an essential basis for developing a proximity labeling method for RNA.