

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430124

研究課題名(和文) 癌細胞特異的成熟mRNA再スプライシング現象の網羅的影響解析及び発生機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the global effect and the mechanism of cancer specific mature mRNA re-splicing

研究代表者

亀山 俊樹 (Kameyama, Toshiki)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：60298544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： mRNA再スプライシングの制御因子を探索する目的でRNA結合タンパク質156遺伝子に対するsiRNAライブラリーの網羅的スクリーニングを行った。その結果、siRNA#51によって再スプライシング産物と同じ異常スプライシングが起こる事を見いだした。この異常産物の塩基配列を確認したところ確かにTSG101 mRNA再スプライシング産物と一致した。

siRNA#51の抑制する遺伝子はRNA結合タンパク質RBM4である。このRBM4遺伝子は癌抑制遺伝子としての働きも注目されつつある。今後、このRBM4遺伝子がどのようなmRNA再スプライシングを制御するのかの詳細を明らかにすることが重要な課題である。

研究成果の概要(英文)： We have discovered cancer-specific mRNA re-splicing that occurs on mature spliced mRNA and generates aberrant transcripts/proteins. The control of the re-splicing could be promoted by unknown activator upregulated and/or repressor downregulated in cancer cells. Recent striking findings represent a breakthrough in the study of mRNA re-splicing. (1) TSG101 delta protein, generated via re-splicing of TSG101, enhances TSG101-stimulated cell proliferation and tumor growth. (2) mRNA re-splicing is repressed by the expression of TP53 often induced by cellular stress. (3) We have identified a repressor candidate of mRNA re-splicing by screening of siRNA library (156 kinds of RNA-binding proteins). Since the identified repressor is a known tumor suppressor, we postulate that global prevention of aberrant mRNA re-splicing, maintaining fidelity of splicing, is critical for the consequent tumor suppression. To prove this hypothesis is underway.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん 異常スプライシング RNA結合タンパク質 siRNAライブラリー

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、新たに転写された mRNA 前駆体の大多数はイントロンと呼ばれる介在配列により分断されている。mRNA が蛋白質合成の鋳型である故に、スプライシング反応においてイントロンに分断されたエクソンを正しく認識しエクソン同士を正確に結合させられなければならない。癌はジェネティック及びエピジェネティックな異常の蓄積によって発生・進展すると考えられているが、様々なスプライシング異常も同時に起きている。癌細胞特異的に存在し、全身正常組織に存在しない異常蛋白質分子は腫瘍マーカーとして癌の早期診断に有用であると共に、それが癌細胞の増殖・浸潤に関与していれば治療の標的分子としても期待される。次世代シーケンズ技術による網羅的な解析から、ある種の癌でスプライシング調節に関わる複数の因子に変異が見つかる (K. Yoshida et al., 2011. Nature) 等、近年癌特異的異常スプライシングが注目されている。

我々は最近、癌細胞で既にスプライシングが完結したはずの成熟 mRNA が繰り返しスプライシングされることにより異常転写産物が生じてしまうという『癌細胞における成熟 mRNA 再スプライシング現象』を発見し報告した (T. Kameyama et al., 2012. Nucleic Acids Res.)。mRNA 再スプライシング現象は最初癌感受性遺伝子 TSG101 で起きることを証明したが、後に全く別の癌抑制遺伝子 FHIT においても生じていることを発見し証明した。TSG101 遺伝子では潜在的なスプライス部位を用いて成熟 mRNA が再びスプライシングされている。正常細胞においても多段階で繰り返しスプライシングが起きる現象が既に知られており、網羅的 RNA-seq 解析からまた最近注目を集めている (Suzuki et al., 2016. Int.J.Mol.Sci.; Sibley et al., 2015. Nature; Duff et al., 2015. Nature; Suzuki et al., 2013. FEBS Letters.)。ここで注目すべき点は正常細胞における多段階スプライシングの最終産物はあくまでも mRNA である。この最終産物の点において正常細胞で生じている現象は、成熟 mRNA が再スプライシングされてしまうことで異常産物を生成する癌細胞での現象と決定的に異なる。このことから、正常細胞にはスプライシング反応が終結した成熟 mRNA を認識し、過剰にスプライシングされ無い為のスプライシング反応終結機構が存在する事、癌細胞ではそのスプライシング反応終結機構が破綻している事が示唆される。

2. 研究の目的

成熟 mRNA 上には多数のスプライス部位に成り得る配列 (GU-AG) が存在する事から、このスプライシング反応終結機構の破綻は大規模なトランスクリプトームの破綻を招き、細胞にとって重大な影響を及ぼすことが

予想される。スプライシング反応終結機構の実体は何かを知ることにより、がんにおけるトランスクリプトームの破綻を回避できる全く新しい治療戦略を立てることも可能となる。そこで我々は成熟 mRNA 再スプライシングを制御する因子を探索しようと考えた。

3. 研究の方法

mRNA 再スプライシング調節因子の発現を考えると図 1 の表に示すように、mRNA 再スプライシング促進因子であれば正常細胞に比べ癌化した細胞及び高悪性度 (治療抵抗性獲得細胞) でより高発現していると予測され、反対に mRNA 再スプライシング抑制因子であれば正常細胞に比べ癌化細胞及び高悪性細胞で発現が低下していると予測される。また、想定される mRNA 再スプライシング制御因子はスプライシング反応中及び反応後に mRNA に結合しているはずと考えられる (図 1)。

そこで我々は TSG101 遺伝子の mRNA 再スプライシングが非常に低頻度でしか起きていない HeLa 細胞を用い、RNA 結合タンパク質に対する siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングを行った。



図1. 再スプライシング制御因子スクリーニング法

4. 研究成果

我々はまず RNA 結合タンパク質 156 遺伝子に対する siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングを行い mRNA 再スプライシング抑制因子の探索を行った (図 1)。TSG101 遺伝子の mRNA 再スプライシングが非常に低頻度でしか起きていない HeLa 細胞に 156 種の siRNA をそれぞれトランスフェクションした後 RNA を精製、RT-PCR により TSG101 の再スプライシング産物の増加が見られるものを探した。156 種の siRNA のスクリーニングの結果、7 つの siRNA によって TSG101 の異常転写産物が誘導される事を見いだした (図 2)。

各異常転写産物の配列を解析したところ、4 つの異常スプライシングのパターンに分類された (図 2)。まず、siRNA #41、#51、#70、#105 のトランスフェクションによって引き起こされる異常産物 1 はエクソン 3 を飛ばしてエクソン 2 と 4 が連結されるエクソンスキ

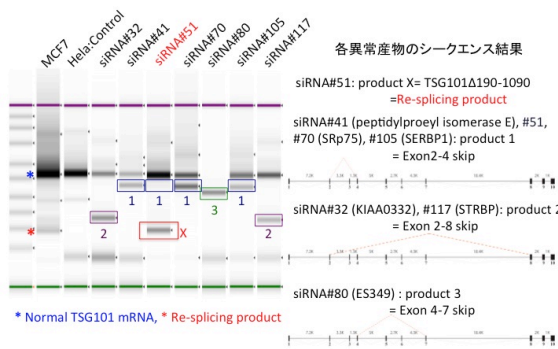


図2. siRNAライブラリースクリーニング
異常スプライシングを引き起こす因子とそのノックダウンの結果
生じる異常スプライシング産物

ッピングであった。また、siRNA#32、#117によって引き起こされる異常スプライシング産物はエクソン3から7を飛ばすマルチエクソンスキッピング、siRNA80によって引き起こされる異常スプライシング産物はエクソン5と6をスキップするマルチエクソンスキッピングであった。

一方、siRNA#51によって引き起こされる主要な異常スプライシング産物Xをシーケンシングしたところ、901塩基欠損するTSG101 Δ190-1090であり、これはまさにTSG101 mRNAが再スプライシングされて出来た異常産物であると考えられた。

そこで、次にsiRNA#51の抑制する遺伝子(*gene#51*とする)について新たに2種類siRNAを合成し、別の頭頸部がん由来細胞株であるTW01細胞にトランスフェクションしTSG101 mRNAの再スプライシングが促進されるのかの確認を行ったところ、確かにこの*gene#51*遺伝子のノックダウンによりTSG101 mRNAの再スプライシングが促進されていることが明らかとなった(図3)。

現在、*gene#51*遺伝子の過剰発現実験を行うと共に、どのようなメカニズムでmRNA再スプライシングを制御しているのか詳細な解析をさらに進めているところである。

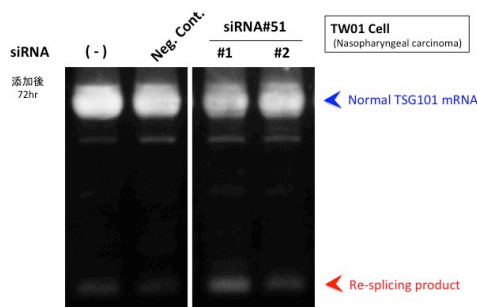


図3. TW01細胞でのsiRNA#51ノックダウンはTSG101 mRNA再スプライシングを促進する

今回RNA結合タンパク質に対するsiRNAライブラリーの網羅的スクリーニングによりTSG101 mRNAの再スプライシングを制御する因子の候補を得ることが出来た。HeLa細胞及びTW01細胞において、この*gene#51*遺伝子のノックダウンはTSG101 mRNAの再スプライシングを促進していることから、この

*gene#51*遺伝子はmRNA再スプライシング抑制因子として機能していると考えることが出来る。

また、最近この*gene#51*遺伝子は正常組織では広範な発現が認められるが細胞のがん化と共にその発現が低下することが報告されている。また、がん関連遺伝子の選択的スプライシングに関与し、それによりがん細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖抑制、転移能の抑制に関与するという癌抑制遺伝子としての働きも注目されつつある。mRNA再スプライシングは細胞のがん化・悪性化と共に促進されるが、一方で*gene#51*遺伝子がん化によりその発現が消失する。この癌抑制遺伝子*gene#51*の発現変化とmRNA再スプライシングの有無との相関は*gene#51*遺伝子がmRNA再スプライシング抑制因子であるということを示す事実であると考えられる。*gene#51*遺伝子はスプライシング制御因子としてだけでなく、最近では翻訳、miRNAによる遺伝子サイレンシングや核内外へのmRNA輸送にも関与するなど多彩な機能を持つタンパク質であると言われている。今後、この*gene#51*遺伝子がどのようにmRNA再スプライシングを制御するのかの詳細を明らかにすることが重要な課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8件)

1. Hitoshi Suzuki *, Yoshitsugu Aoki, Toshiki Kameyama, Takashi Saito, Satoru Masuda, Jun Tanihata, Tetsuya Nagata, Akila Mayeda, Shin'ichi Takeda, Toshifumi Tsukahara. (2016). Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-splicing at the DMD

Mutation Hotspot. International Journal of Molecular Science. 17, 1722. 【査読有】

2. Abe A, Mizuta S, Okamoto A, Yamamoto Y, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2016). Transcriptional activation of platelet-derived growth factor receptor α and GS homeobox 2 resulting from E26 transformation-specific variant 6 translocation in a case of acute myeloid leukemia with t(4;12)(q12;p13). International journal of laboratory hematology. 38. e15-e18. 【査読有】

3. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Kanie T, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Mizuta S, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2016). ETV6-LPXN fusion transcript generated by t(11;12)(q12.1;p13) in a patient with relapsing acute myeloid leukemia with NUP98-HOXA9. *Genes, chromosomes & cancer* 55(3) 242-250. 【査読有】

4. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Kanie T, Tsuzuki M, Akatsuka Y, Mizuta S, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2015). NUP214-RAC1 and RAC1-COL12A1 Fusion in Complex Variant Translocations Involving Chromosomes 6, 7 and 9 in an Acute Myeloid Leukemia Case with DEK-NUP214. *Cytogenetic and genome research* 146(4) 279-284. 【査読有】

5. Yuki Miyatake, Shinsuke Matsuzaki, Manabu Taniguchi, Hironori Takamura, Kohei Yamada, Tsuyoshi Hattori, Toshiki Kameyama, Takayuki Manabe, Masaya Tohyama, Taiichi Katayama. (2015). Identification and characterization of a novel splice variant of disrupted in schizophrenia 1 (Disc1). *Journal of brain science* 45 5-34. 【査読有】

6. 亀山俊樹、前田明 (2015) がん細胞で異常なタンパク質が作られるしくみを「mRNA 再スプライシング」現象から探る *ファルマシア* 51(1), 22-26. 【査読無・招待有】

7. Terada K, *Izumo N, Suzuki B, Karube Y, Morikawa T, Ishibashi Y, Kameyama T, Chiba K, Sasaki N, Iwatae K, Matsuzaki H. and

*Manabe T. (2014). Fluvoxamine moderates reduced voluntary activity following chronic dexamethasone infusion in mice via recovery of BDNF signal cascades. *Neurochem. Int.* 69. 9-13. 【査読有】

8. Fumio Matsushita, *Toshiki Kameyama, Yuzo Kadokawa and Tohru Marunouchi (2014). Spatiotemporal expression pattern of Myt/NZF family zinc finger transcription factors during mouse nervous system development. *Developmental Dynamics*. 243. 588-600. (*: Corresponding Author) 【査読有】

[学会発表] (計 10 件)

1. Toshiki Kameyama¹, Yoshinosuke Amemoto^{1, 2} Akila Mayeda¹. (2016). Cisplatin-stimulated Cancer-specific Mature mRNA Re-splicing Is under the Control of Tumor Suppressor p53. *The 21th Annual Meeting of the RNA Society/The 18th Annual Meeting of the RNA Society of Japan*. June 28–July 2, The International Conference Center in Kyoto

2. t(8;12;21)(q22;p12;q22) を有する *RUNX1-RUNX1T1* 白血病に認められた *TM7SF4-VPS13B* 融合遺伝子

安部明弘¹、山本幸也¹、岡本晃直¹、徳田倍将¹、稲熊容子¹、山本起代子¹、柳田正光¹、森島聡子¹、蟹江匡治¹、赤塚美樹¹、水田秀一¹、岡本昌隆¹、亀山俊樹²、前田明²、恵美宣彦¹

第 76 回日本血液学会学術集会 2015.10.16-10.18 金沢 石川県立音楽堂

3. Toshiki Kameyama, Shota Matsumiya and Akila Mayeda. (2015). Hypoxia had an effect on cancer-specific mature mRNA re-splicing. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Eukaryotic mRNA Processing”*. August

18-22, CSHL, USA

4. Toshiki Kameyama. (2015). Mature mRNA Re-splicing in Cancer Cells. Invited Seminar for Harvard Medical School. February 5. Beth Israel Deaconess Medical Center. Boston USA
【招待講演】

5. Toshiki Kameyama and Akila Mayeda. (2015). Novel cancer specific mature mRNA re-splicing postulates undiscovered mRNA quality control mechanism in normal cells. The 10th Cold Spring Harbor Conference “Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression”. January 28 - February 1. The Wyndham Grand Rio Mar, Puerto Rico

6. 低酸素ストレスは癌細胞特異的成熟 mRNA 再スプライシングに影響を与える (口頭)

亀山俊樹、松宮翔太、前田明

2015.10.1-2 第 47 回藤田学園医学会 豊明

7. 低酸素ストレスは癌細胞特異的成熟 mRNA 再スプライシングに影響を与える

亀山俊樹、松宮翔太、前田明

2015.7.15-17 第 17 回日本 RNA 学会年会 札幌

8. Additional *NUP214-RAC1* fusion gene in an AML patient with *DEK-NUP214*

安部明弘¹、山本幸也¹、岡本晃直¹、徳田倍将¹、稲熊容子¹、柳田正光¹、森島聡子¹、蟹江匡治¹、都築基弘¹、赤塚美樹¹、水田秀一¹、岡本昌隆¹、亀山俊樹²、前田明²、恵美宣彦¹

2014.10.31-11.2 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪 大阪国際会議場

9. Toshiki Kameyama and Akila Mayeda. (2014). Novel mRNA re-splicing event: important aspects for understanding robustness and catastrophe in gene expression systems. RIKEN Symposium & The 15th Tokyo RNA Club “Noncoding RNA Regulation”. Oct. 1st. Suzuki Umetaro Hall, RIKEN, Wako, Saitama
【招待講演】

10. がん細胞での成熟 mRNA 再スプライシング活性に影響を与える核外輸送因子
○亀山俊樹¹、増田誠司²、前田明¹
(¹藤田保健衛生大学・総合医科学研究所、²京都大学大学院・生命科学研究所)
RNA2014 第 16 回日本 RNA 学会年会
2014.7.23~7.25 名古屋 WINC AICHI

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
亀山俊樹 (Kameyama, Toshiki)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：60298544

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()