

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12759

研究課題名(和文) 網羅的RNAiによるドラッグリプロファイリングに向けたアプローチ

研究課題名(英文) Use of genome-wide RNAi screening to identify modes of action of bioactive compounds

研究代表者

松本 健 (Matsumoto, Ken)

国立研究開発法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号：60222311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：化合物を基礎として生命科学の研究を進める上で、化合物の細胞内標的の同定は、非常に重要だがとても困難な課題である。本研究では、プール型shRNAライブラリーを用いたスクリーニングによる遺伝学的解析を効率化して、化合物の標的の同定と関連パスウェイの同定に用いた。この方法で海洋天然物オーリライドBの解析を行った結果、ナトリウムポンプの触媒サブユニットATP1A1蛋白質が細胞のオーリライドBに対する感受性を決める因子であることがわかった。ATP1A1蛋白質の阻害剤ウアバインをオーリライドBと共に細胞に作用させると、単独の場合よりも低濃度でオーリライドBが細胞増殖抑制を引き起こした。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide RNA interference (RNAi) with pooled and barcoded short-hairpin RNA (shRNA) libraries provides a powerful tool for identifying cellular components that are relevant to the modes/mechanisms of action of bioactive compounds. We used multiplex barcode sequencing technology which enables parallel analysis of multiple samples. An shRNA library screen with this system revealed that downregulation of ATP1A1, a catalytic subunit of Na⁺/K⁺ ATPase, conferred significant sensitivity to aurilide B, a natural marine product that induces mitochondria-mediated apoptosis. Combined treatment with ouabain which inhibits Na⁺/K⁺ ATPase by targeting catalytic subunits potentiated sensitivity to aurilide B.

研究分野：分子生物学

キーワード：化合物 RNAi スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

天然および合成化合物を基礎として生命科学の研究を進める上で、生理活性を有する化合物が得られたのちの細胞内標的の同定は、非常に重要だがとても困難な課題である。化合物の標的分子の同定には、化合物を修飾して接合する分子を検出する方法、酵母などのモデル生物を用いた遺伝学的方法、既知の化合物との比較に基づくプロファイリング法などが用いられてきているが、どの方法が適しているかは化合物ごとに異なるため、複数の方法を試す必要がある。動物培養細胞、特にヒト培養細胞での RNA 干渉を利用した shRNA ライブラリースクリーニングは、遺伝学的に化合物の標的分子に迫ることができる手法の一つである。予備実験でプール型 shRNA ライブラリーを導入した細胞を DNA トポイソメラーゼ II の阻害剤であるエトポシドを処理すると、非処理細胞に比べ DNA トポイソメラーゼ II の shRNA を持つ細胞が顕著に増加したことから、この系が化合物の作用機構同定に使えることが確かめられた。

2. 研究の目的

本研究では、化合物の標的同定と変異細胞の原因遺伝子に関連するパスウェイ同定の方法として、プール型 shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングによる遺伝学的解析を利用する。(1) shRNA ライブラリーを導入した細胞に、細胞増殖を抑制する化合物を添加し、増殖抑制活性を指標にスクリーニングを行って、ノックダウンにより化合物に対して抵抗性にする遺伝子やより感受性にする遺伝子を明らかにする。期間内に少なくとも5つ程度の化合物のスクリーニングを行う。(2) この標的同定法のスループットをあげるため、多検体を同時に配列解析する方法を確立する。ハイスループット化により既知薬剤のドラッグリプロファイリングに利用できる系を作成する。(3) 遺伝子変異を持つ培養細胞の増殖抑制を指標にスクリーニングを行い、合成致死遺伝子の候補を得る。

3. 研究の方法

培養細胞にまずバーコード付きレンチウイルスプール型 shRNA ライブラリーを導入して、培養細胞のプールを作る。この細胞プールを2つにわけ、一方を化合物処理群、他方を非処理対照群とする。各細胞群のゲノム DNA から shRNA 特異的バーコード領域を増幅し次世代シーケンス解析を行うことで各 shRNA を持つ細胞の頻度を定めるが、こ

の増幅の際に多検体処理解析を行う方法を確立する。増殖速度の差によって生じた shRNA を持つ細胞の頻度の違いから、化合物標的や作用機序が関与するパスウェイを明らかにしたり、遺伝病の変異に対する合成致死遺伝子を得る。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制を指標とした化合物の作用機構解明に向けたスクリーニング

研究期間内に、6つの化合物の shRNA ライブラリースクリーニングを行い、各化合物の細胞増殖抑制作用に関わる遺伝子群の同定を行った。以下、海洋天然物オーリライド B とスプライシング阻害剤スプライソスタチン A の結果について述べる。

オーリライド B

オーリライド B は海産ラン藻からアポトーシス誘導活性を持つ化合物として単離され、構造決定の結果、オーリライドと類似の構造を持つことが報告されていた化合物である。オーリライドについてはこれまでに、プロヒビチンと結合しミトコンドリアの OPA1 のプロセッシングを促進することによってアポトーシスを誘導することが報告されている。

shRNA ライブラリーを導入したヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を、6 ng/ml オーリライド B で10日間あるいは10 ng/ml オーリライド B で7日間処理し、非処理細胞と共に、ゲノム DNA を調製した。つぎに、下の(2)の方法でバーコード領域を PCR 増幅し、次世代シーケンス解析によって各バーコードのリード数を求めることで各 shRNA を持つ細胞の頻度を決定した。オーリライド B 処理細胞と非処理細胞の間で、各 shRNA を持つ細胞の頻度を比較し、一定の閾値以上減少した shRNA が標的とする遺伝子を、合成致死遺伝子の候補として選択した。

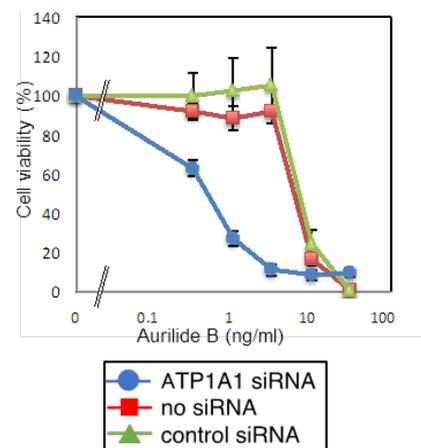


図1 (文献①より)

2種の処理条件で共通して得られた合成致死遺伝子候補について siRNA で個々にノックダウンした細胞の化合物感受性変化を調べたところ、ATP1A1 遺伝子をノックダウンした場合にオーリライド B に対して顕著に感受性が高まることがわかった (図 1)。同様の結果は肺がん由来 A549 細胞および大腸がん由来 HT29 細胞でも得られた。

ATP1A1 蛋白質は Na/K ATPase (ナトリウムポンプ) の α サブユニットであり、その阻害剤として強心配糖体が知られている。そこで、強心配糖体のひとつウアバインとオーリライド B を細胞に共処理したところ、単独の場合よりもオーリライド B 感受性が高まった。さらに、アポトーシス誘導の指標である PARP の切断が、ウアバインとの共処理によって促進されることが分かった。以上の結果は、ATP1A1 蛋白質が細胞のオーリライド B に対する感受性を決める因子であることを示している。

白血病、腎臓がん、前立腺がんの細胞株において、オーリライド B の感受性が高いことが知られており、強心配糖体もさまざまながん細胞に対して選択的に増殖抑制活性を持つ。オーリライド B と強心配糖体の併用により、特定のがん細胞に対する細胞増殖抑制効果が強いのかなどを明らかにすることで、新たな治療戦略につながる可能性が考えられる。

スプライソスタチン A (SSA)

SSA は抗がん活性を持つ化合物 FR901464 の誘導体で、mRNA スプライシングに必要な SF3b に結合してスプライシングを阻害することが知られている。SSA (終濃度 1.5 nM) を shRNA ライブラリースクリーニングに供したところ、合成致死遺伝子の候補として複数のスプライシング因子遺伝子がリストアップされた。この結果は、SSA による細胞増殖抑制が、スプライシング阻害によるものである可能性を示唆している。選択されたスプライシング因子遺伝子の多くはノックダウンによって細胞死を引き起こしたので、増殖必須遺伝子と考えられた。

(2) shRNA ライブラリースクリーニングの効率化

我々が用いた shRNA ライブラリーでは、shRNA の同定の際、サンプルごとに次世代シーケンサーによる解析を行っていたため、処理効率が低くコストが高いという問題があった。そこで、ゲノム DNA からバーコー

ド領域を PCR 増幅する際に、PCR プライマーにインデックス配列を付加することで、シーケンス後のサンプルの区別ができるようにすることで処理効率の上昇を目指した。

新たな PCR プライマーを用いたことから、実験間の再現性やバーコード増幅の定量性についても個別に検討した。再現性は、従来の方法に比べ結果に影響がないことを確認した。定量性については、ゲノム DNA に外から 3 種のバーコード DNA を spike-in として添加してから PCR 増幅を行い、シーケンス解析によってこれらのバーコードの頻度が添加量に応じ定量的に増加することを確認した (図 2)。

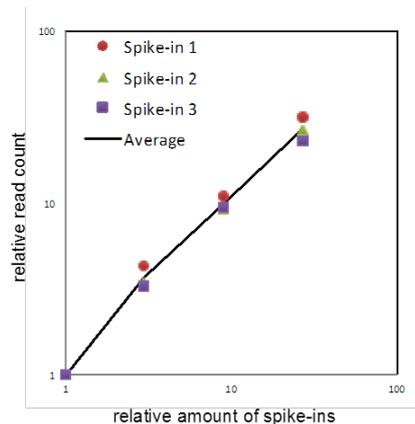


図2 (文献①より)

これまで、同時に 4 つのサンプルをシーケンスした後に区別することが可能となり、処理効率が上がるとともにコストダウンが図られ、(1)の結果に結びついた。

(3) 遺伝子変異を持つ培養細胞での合成致死遺伝子の探索

がん抑制遺伝子を発現しないことによってがん化した培養細胞に shRNA ライブラリーを導入し、一部からはゲノム DNA を調製し (培養前サンプル)、残りは 2 週間ないし 3 週間培養を行ったのちにゲノム DNA を調製した (培養後サンプル)。培養後サンプルにおいて特異的に減少した shRNA が標的としている遺伝子をこのがん抑制遺伝子との合成致死遺伝子候補としてリストアップした。

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 6 件)

Takase, S., Kurokawa, R., Arai, D., Kanto, K., Okino, T., Nakao, Y., Kushiro, T., Yoshida, M., and Matsumoto, K. (2017) A

quantitative shRNA screen identifies *ATPIA1* as a gene that regulates cytotoxicity by aurilide B. *Sci. Rep.*, **7**, 2002. 査読有
doi:10.1038/s41598-017-02016-4.

Lim, J. P., Shyamasundar, S., Gunaratne, J., Scully, O. J., Matsumoto, K., and Bay, B.-H. (2017) *YBX1* gene silencing inhibits migratory and invasive potential via *CORO1C* in breast cancer *in vitro*, *BMC Cancer*, **17**, 201. 査読有
doi: 10.1186/s12885-017-3187-7.

Lv, D., Liu, J., Guo, L., Wu, D., Matsumoto, K., and Huang, L. (2016) PRAS40 deregulates apoptosis in Ewing sarcoma family tumors by enhancing the insulin receptor/Akt and mTOR signaling pathways. *Am. J. Cancer Res.*, **6**, 486-497. 査読有
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859675/>

Kobayashi, H., Nishimura, H., Matsumoto, K., and Yoshida, M. (2015) Identification of the determinants of 2-deoxyglucose sensitivity in cancer cells by shRNA library screening, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**, 121-127. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.106.

Scully, O. J., Yu, Y., Salim, A., Thike, A. A., Yip, G. W.-C., Baeg, G., Tan, P.-H., Matsumoto, K., Bay, B.-H. (2015) Complement component 1, q subcomponent binding protein is a marker for proliferation in breast cancer. *Exp. Biol. Med.*, **240**, 846-853. 査読有
<https://doi.org/10.1177/1535370214565075>

Abe N., Matsumoto, K., Nakano, Y., Nishihara, M., Shibata, A., Maruyama, H., Shuto, S., Matsuda, A., Yoshida, M., Ito, Y., and Abe, H. (2015) Circular RNA can be translated in living human cells. *Sci. Rep.*, **5**, 16435. 査読有
doi: 10.1038/srep16435.

[学会発表](計 7 件)

高瀬翔平、黒川留美、新井大祐、中尾洋一、久城哲夫、吉田 稔、松本 健: 網羅的 shRNA スクリーニングによる海洋天然物 aurilide B の作用に関わる遺伝子

の同定、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター(宮城県・仙台市) 2017. 3.26

高瀬翔平、黒川留美、新井大祐、中尾洋一、久城哲夫、松本 健、吉田 稔: shRNA スクリーニング法の改良による化合物の標的経路の同定の効率化、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都女子大学(京都府・京都市) 2017.3.18

Matsumoto, K., and Huang, L.: Regulation of the amount and activity of RNA binding proteins in cancer cells. 7th Asia Pacific International Congress of Anatomists (7th APICA), Singapore (Singapore), 2016.3.18 招待講演

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.jp/matsumok/index.html>

プレスリリース

「化合物の標的分子の同定を効率化」
2017.5.23

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170523_2/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 健 (MATSUMOTO, Ken)

理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・専任研究員

研究者番号 : 60222311