

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15294

研究課題名(和文) 超保存領域に内在された抗老化コードと発がんの分子基盤

研究課題名(英文) Novel roles of PTCs-containing ultraconserved exons in cancer cell growth

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：00563454

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)：約23,000の限られた遺伝子領域から10万種以上のタンパク質を作り出し、生物の多様性に寄与する選択的スプライシング機構は、高等生物に発達している。RNAプロセシングの過程で産生される中途ストップコドン(PTC)を含むRNAは、通常、細胞質におけるRNA品質管理機構により分解される。しかし、新規非コードRNAであるTranscribed UCR (T-UCR)の一部は、PTCを含むにもかかわらず、がん細胞核内に蓄積して分解を免れることを見出した。T-UCRはがん細胞において、ヌクレオリン等の核内RNA結合タンパク質の制御を受け核に局在する、新たな核内機能性RNAである可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alternative splicing of pre-mRNAs generates protein diversity from a limited number of genes. Alternative splicing occurs in a developmental stage-, sex- or tissue-specific manner and in response to the surrounding microenvironment. At the same time, aberrant alternative splicing participates in many genetic and acquired diseases including cancer. Serine/Arginine splicing factors (SRSFs) family genes contain ultraconserved regions. Several SRSFs generate transcripts which contain pre-mature termination codons (PTCs). Interestingly, these transcripts are not degraded by NMD in colon cancer cells. The aberrant expression of T-UCRs is posttranscriptionally regulated by miRNA and RNA-binding proteins. In this study, we show that a nuclear protein, nucleolin regulates nuclear localization of T-UCRs in colon cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA 中途ストップコドン RNA結合タンパク質 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

約 23,000 の限られた遺伝子領域から 10 万種以上のタンパク質を作り出し、生物の多様性を生み出す RNA プロセッシング機構は、特に高等生物に発達している。申請者らは、大腸がんが高発現するスプライシング調節因子 SR(Ser/Arg)蛋白質(SRSF3)は、酸化ストレス下で HIPK2 のスプライシングパターンの変化させ、p53 の活性化を抑制することを見出した (*Oncogene* 2013、*Oncogene* 2014)。

ultraconserved region (UCR) はマウス以上の高等生物に進化の過程でトランスポゾンとして組み込まれた 100% 保存されたゲノム領域であり、ヒトゲノムでは 481 カ所存在する。興味深いことに、UCR は大部分が重要な転写因子・RNA 結合タンパク質をコードする遺伝子領域に分布している。なかでも、SRSF ファミリー遺伝子は UCR を内在しており、細胞内ストレス刺激に依存的に UCR をコードするエクソンを含んだバリエーション RNA (T-UCR) を生成する。さらに、その挿入されたエクソンには中途ストップコドン (PTC) も含むことを見出した (*Mol Cell Biol*, 2014)。

PTC を含む RNA は、通常、正規のタンパク質に翻訳されず“ジャンク RNA”として RNA 品質管理機構 (NMD) により分解されるはずであるが、SRSF 遺伝子から生成される T-UCR は、RNA の形で核内に留まり NMD による分解を受けず蓄積するが、そのメカニズムや生理的意義はいまだ不明である。

2. 研究の目的

RNA プロセッシングの過程で産生される中途ストップコドン (PTC) を含む RNA は、通常、細胞質における RNA 品質管理機構により分解される。しかし、Transcribed UCR (T-UCR) の一部は、選択的スプライシングの過程で PTC エクソンを含むにもかかわらず、がん細胞の核内に蓄積して分解を免れる。PTC バリエーションは、約 80% の遺伝子から転写されているが、生体内恒常維持への関与の研究は未だ国内外ともに行われていない。

本研究では、PTC バリエーションが新たな核内機能性 RNA 分子である可能性を明らかにし、その発現制御メカニズムと大腸がん悪性化機構の関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) T-UCR 安定過剰発現株の機能解析

これまでに、T-UCR 過剰発現実験はトランスフェクションを用いた一過性の発現系で行っていたが、より長期の細胞状態を観察するため、T-UCR の安定過剰発現系 HCT116 細胞株を樹立した。その後、樹立した安定過剰細胞株を用い、以下 (2) の手法により T-UCR を介した大腸がん悪性化機構を検討する。

(2) 細胞増殖能および浸潤能の検討

Transwell システムを用い、血清の濃度勾配における細胞の浸潤能の計測をおこなう。また、Celltiter glo (Promega 社) システムを用い、細胞増殖速度を検討する。さらに、細胞を同期した上で DNA を染色し FACS を行い、各細胞周期を検討し、G1 期の長さを比較する。また、ヌードマウスに皮下移植し、腫瘍形成能を検討する。以上の実験により、T-UCR 高発現によるフェノタイプを検討する。

(3) 細胞内の動的 T-UCR 局在変化

TRA2B 遺伝子の UCR エクソンを特異的にノックダウンした大腸がん細胞において、ヒストン H3 リン酸化の阻害、CDK タンパク質の発現異常が認められ、細胞周期 G2/M 期における細胞分裂の停止が起こった。本研究では、細胞周期を可視化する FUCCI システム (Takara 社) と生細胞内で RNA をトラッキングできる MS2-RNA タグを用い、細胞周期により発現が変動する細胞周期関連 T-UCR を動的に観察する。

(4) T-UCR の核内局在調節因子の同定

予測ソフトウェアを用い超保存領域内における 2 次構造を検討する。T-UCR の PTC エクソンを RNA プローブとして、RNA-protein 免疫沈降後質量分析、及び RNA-RNA pull down 後マイクロアレイを用いて T-UCR の PTC エクソンに特異的に結合し、相互作用を行うタンパク質及び RNA をスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) UCR を含む PTC バリエーションの大腸がん発現

UCR を含む PTC バリエーションのひとつ TRA2 4 は、エクソン 2 に超保存領域がコードされているが、中途ストップコドンを含むため正規 Tra2 タンパク質に翻訳されない (図 1 参照)。しかしながら、大腸がん細胞において過酸化水素やアルセナイトなどの酸化ストレス刺激により、特異的に誘導されることを見出した (*Mol Cell Biol* 2014)。さらに、SRSF ファミリーのうち、SRSF1,3,6,7,9 の PTC バリエーションが酸化ストレス依存的に誘導されることを確認した。

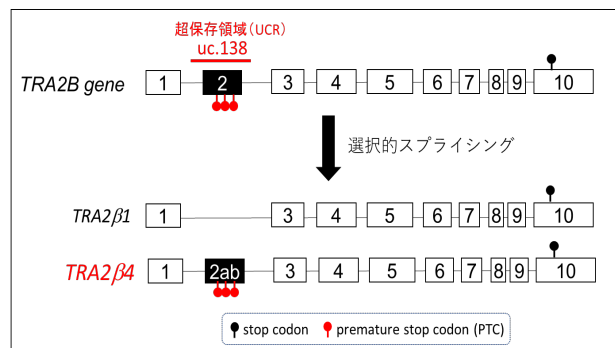


図 1 SRSF ファミリー遺伝子は PTC を含むエクソンを持つ転写産物を生成する

(2) TRA2 4 を安定過剰発現させた大腸がん細胞は、G1 期の短縮が起こる

大腸がんを高発現する TRA2 4 をノックダウンしたがん細胞では、細胞増殖の低下と細胞老化の誘導というフェノタイプが認められた (Oncogenesis, 2016)。過剰発現させた HCT116 細胞においては、細胞増殖の顕著な亢進が認められた。さらに、全遺伝子発現を mock 細胞と比較すると約 1200 個の遺伝子が 2 倍以上変化しており、特に細胞周期関連因子や細胞増殖関連因子の変動が認められた。細胞周期では、G1 期の CDK インヒビターなどの発現低下や、M 期関連因子の発現増加が認められた (図 2)。また、FACS 解析においても G1 期の短縮が認められた。

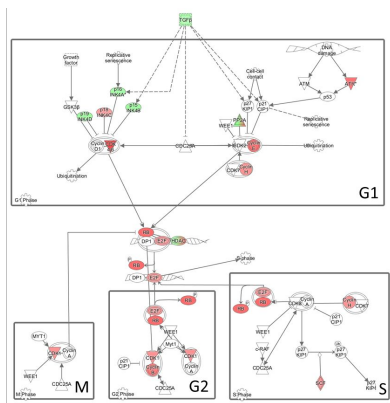


図 2 mock に比較し TRA2 β 4 安定過剰発現細胞において発現が変動した細胞周期関連因子 (赤：発現増加、緑：発現低下)

(3) 核タンパク質ヌクレオリンが T-UCR の核局在に關する

TRA2 4 の PTC エクソンに特異的に結合するタンパク質の一つとして、ビオチン化 RNA pull-down 後の質量分析により、ヌクレオリンを同定した (図 3A)。ヌクレオリンは TRA2 4 のエクソン 2 後半の 2 次構造形成部分に特異的な結合が認められた。ヌクレオリンをノックダウンした HCT116 細胞においては、TRA2 4 は核から細胞質へと移行し、細胞質

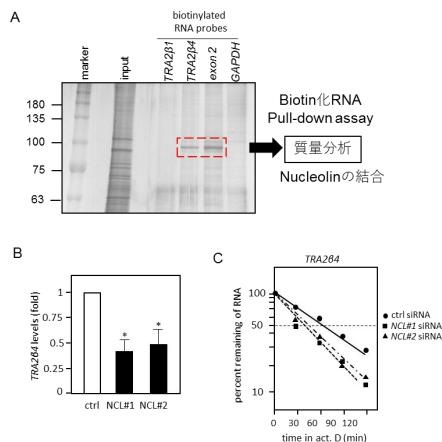


図 3 A: 大腸がん細胞核分画において TRA2 β 4 の PTC エクソン (exon 2) に特異的に結合する因子の同定
B, C: ヌクレオリンノックダウンした HCT116 細胞では TRA2 β 4 の安定性が低下し、発現が減少する

で NMD 分解機構による分解が促進されることを見出した (図 3B,C)。さらに、ヌクレオリンの C 末ドメインである

glycine-arginine-rich (GAR) を欠損した変異体では TRA2 4 との結合能が失われた。さらに、質量分析では hnRBP family を主とする RNA 結合タンパク質との結合も確認され、これらの相互作用が T-UCR ががん細胞核に局在し、高発現するメカニズムの一端を担う可能性が示唆され、さらに研究を進めている。

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 4 件)

1. Kajita K, Kuwano Y, Satake Y, Kano S, Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing Transformer 2 4 controls senescence of colon cancer cells. *Oncogenesis*, 5:e213. 2016. 査読有 doi: 10.1038/oncsis.2016.18.

2. Saijo S, Kuwano Y, Masuda K, Nishikawa T, Rokutan K, Nishida K. Serine/arginine-rich splicing factor 7 regulates p21-dependent growth arrest in colon cancer cells. *J Med Invest* 2016;63(3-4):219-226. 査読有 doi: 10.2152/jmi.63.219.

3. Kuwano Y, Nishida K, Akaike Y, Kurokawa K, Nishikawa T, Masuda K, Rokutan K. Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2: A Critical Regulator of the DNA Damage Response and the Epigenome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016;17(10): e1638. 査読有 doi: 10.3390/ijms17101638.

4. Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Satake Y, Akaike Y, Fujita F, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Transformer 2 and miR-204 regulate apoptosis through competitive binding to 3' UTR of BCL2 mRNA. *Cell Death Differ.* 22(5):815-825. 2015 査読有 doi: 10.1038/cdd.2014.176

[学会発表](計 7 件)

1. Kuwano Y, Satake Y, Nishikawa T, Fujita M, Saijo S, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing transformer 2 4 associates with nucleolin and regulates cellular proliferation. Protein-RNA Interactions: Keystone symposia (Fairmont Banff Springs, Banff, Canada), 2017 年 2 月 7 日

2. Saki Saijo, Kensei Nishida, Tatsuya

Nishikawa, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan,
A novel role of serine/arginine-rich
splicing factor 7 in cell cycle
progression, Keystone Symposia
Conference; Protein-RNA Interactions:
Scale, Mechanisms, Structure and Function
of Coding and Noncoding RNPs (Fairmont
Banff Springs, Banff, Canada), 2017年2
月7日

3. 桑野由紀、西田憲生、西川達哉、六反一仁、
Serine/arginine-rich スプライシング因子
SRSF を介したエピジェネティック調節機構、
シンポジウム「エピジェネティクスを制御す
るクロマチン構造と機能」第39回日本分子
生物学会年会（パシフィコ横浜、神奈川県
横浜市）2016年12月2日

4. 西川達哉、桑野由紀、小玉美幸、西條
早希、田中裕基、板井美樹、藤田絹代、
西田憲生、六反一仁、Ultraconserved
region を内在する *TRA2-4* の発現制御と大腸
がんの細胞増殖メカニズムの解明、第39回
日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜、神
奈川横浜市）2016年12月2日

5. 小玉美幸、桑野由紀、佐竹譲、狩野静香、
藤田絹代、板井美樹、西田憲生、六反一仁
Ultraconserved region を内在する *TRA2-4*
を介した細胞周期調節メカニズムの解析、第
38回日本分子生物学会年会（神戸ポートア
일랜드、兵庫県神戸市）2015年12月3
日

6. 佐竹譲、桑野由紀、狩野静香、藤田絹代、
板井美樹、田中裕基、西田憲生、六反一仁
TRA2-4 と nucleolin の相互作用を介した大
腸癌細胞増殖メカニズムの解明、第38回日
本分子生物学会年会（神戸ポートアイラン
ド、兵庫県神戸市）2015年12月3日

7. Kuwano Y, Kajita K, Kano S, Satake Y,
Fujita K, Itai M, Nishida K, Rokutan K.
Ultraconserved region-containing
transformer 24 inhibits senescence of colon
cancer cells. Cell symposia-Human
genomics (A Star, Singapore), 2015年11
月8日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00563454