

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08762

研究課題名(和文)新規RNAメタボリズム調節機構とその破綻による膠芽腫進行メカニズムの解明

研究課題名(英文)Role of Aurora kinase in RNA metabolism

研究代表者

片山 博志 (Katayama, Hiroshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90713975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の主要な結果として：(1)オーロラAのhnRNPリン酸化はオーロラBプロモーターを活性化した。(2)hnRNP発現異常が、タキソールによって誘発された紡錘体チェックポイント停止を乗り越え、オーロラBの機能の獲得または喪失によって観察される表現型に類似した倍数性細胞を産生した。(3)hnRNP発現異常が細胞運動性を高めた。これらの結果は、オーロラA/hnRNPがオーロラB RNAの代謝調節を通じて染色体安定性に重要な役割を果たし、この複合体の機能破綻が腫瘍形成と転移を促進することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーロラAの機能破綻によって誘導される染色体不安定性のメカニズムとして中心体の過剰生産が広く知られていたが、本研究からオーロラAが染色体分配機構のメインプレイヤーであるオーロラBの発現量を直接調節していることが明らかになり、オーロラAが多様なシグナル経路を調節することで染色体安定性を保証していることが示された。この知見は、臨床試験されているオーロラAとBの両阻害剤の組み合わせが癌細胞特有の染色体不安定性の脆弱さを効率よく標的化できることを予見するものであり、臨床試験で今後検討されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we report for the first time the essential role of Aurora-A-hnRNP interaction in Aurora-B transcriptional regulation. The results can be summarized as follows: (1) hnRNP controlled Aurora-B mRNA decay by direct binding and transactivated Aurora-B promoter by indirectly affecting CHR region in the promoter. (2) Aurora-A phosphorylated hnRNP on at least two serine residues in vivo. (3) Aurora-A phosphorylation of hnRNP upregulated hnRNP' transactivation activity to Aurora-B promoter. (4) Both hnRNP loss or overexpression overrode Taxol induced spindle checkpoint arrest and resulted in the production of polyploidy cells, resembling to the phenotypes observed by gain or loss of function of Aurora-B. (5) Both hnRNP loss or overexpression enhances cell motility. These results indicate that Aurora-A/hnRNP play an important role in chromosome stability by regulating Aurora-B RNA metabolism and the deregulation of this complex would promote tumorigenesis and metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オーロラキナーゼ RNA プロモーター リン酸化 RNA結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オーロラ A は、染色体の均等分配を調節する必須のキナーゼである。膠芽腫を含む多種の腫瘍で高発現しており、正常細胞でのオーロラ A の過剰発現が染色体不安定性 (染色体の数的・構造的異常) の誘発と癌細胞への形質転換を誘導することが明らかにされている。膠芽腫においては、N-Myc のタンパク質安定性に寄与していることが知られている。代表者は、マウスモデルやヒト腫瘍サンプル等を用いて、オーロラ A による p53 癌抑制タンパク質ファミリーの機能阻害を明らかにしてきた (Katayama et al., Nature Genetics 2004; Oncogene 2008; Cancer Cell 2012; Carcinogenesis 2016)。オーロラ A の機能の全体像を明らかにすることを目標として掲げた 2013 年の支援 (科研費スタートアップグラント) を受け、核内に局在するオーロラ A の結合タンパク質の網羅的解析から、hnRNPF を新たに同定した。

hnRNPF は、約 30 種類のメンバーから成る核内 RNA 結合タンパク質グループの 1 つであり、pre-mRNA と複合体を形成し、遺伝子発現調節、mRNA への選択的スプライシングや安定性、核外輸送など RNA メタボリズムに関わることが推定されている。hnRNPF は p53 など数種類の mRNA のスプライシングを調節していることが報告されているが、機能調節等の詳細は不明である。hnRNPF は、ヒト膠芽腫で最も高発現している遺伝子の 1 つであり、膠芽腫発生及び進展に非常に重要な機能を果たしていることが推測される。

膠芽腫では染色体不安定性が顕著にみられ、その組織像は核の大きさの不均一性と多核細胞の出現に特徴づけられている。最新の研究から、膠芽腫癌幹細胞では染色体不安定性が、Stemness 維持ならびに治療抵抗性の獲得と密接な関係にあることが示されている。しかし、膠芽腫癌幹細胞の染色体不安定性の原因となる分子メカニズムは未だ不明な点が多く解明されていない。癌細胞や癌幹細胞では、正常細胞と比較し、RNA メタボリズムが変化していることが知られている。その原因として、反応を触媒している RNA 結合タンパク質の発現量の異常が指摘されている。しかし、各 RNA 結合タンパク質の標的 RNA やその調節については、癌種特異性や標的 RNA の多様な選択的スプライシングのため、未だ不明な点が多い。

これまでオーロラ A の RNA メタボリズム調節への関与を示した例はないため、本研究ではオーロラ A の新しい機能を開拓する上でオーロラ A と hnRNPF の結合の生理的役割を解明し、その機能破綻と染色体不安定性、膠芽腫進行との関係を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

プロテオーム解析により代表者が新たに見出したオーロラ A - hnRNPF 複合体が広範な調節領域を含む RNA メタボリズムのどの領域に関与しているのか、そしてこの複合体の機能破綻が癌進行にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。本研究を開始するに当たり、研究の方向性を定める予備実験を行い、以下の結果を得ていた。

- (1) In vivo 実験からオーロラ A は hnRNPF をリン酸化した。
- (2) hnRNPF の高発現ならびに低発現した細胞ではタキソール処理による分裂期停止が無視され。
- (3) 癌ゲノムアトラスデータベースの解析から、hnRNPF は膠芽腫において発現異常を示す遺伝子の中で上位 1% に入る遺伝子 (88 番目に mRNA の発現異常が多い) であり、発現異常を示す膠芽腫患者群では、全生存期間と無病生存期間の有意な短縮が認められた。
- (4) CLIP 法 (UV Crosslinking and Immunoprecipitation) を用いた結合 mRNA の探索から、hnRNPF がオーロラ B、FOX11、EZH2 の mRNA と結合することを発見した。オーロラ B は、染色体分配を調節し、その発現異常は染色体分配異常と多核細胞を誘導する。転写因子 FOX11 は、オーロラ A などの分裂期関連遺伝子の発現を調節する一方、ヒストンメチル化酵素 EZH2 と共に膠芽腫幹細胞において Stemness 維持や放射線抵抗性獲得に必須であるが明らかにされている。

上記の一連の結果は、オーロラ A の機能異常によって生じる主要な表現型の染色体不安定性と癌細胞の治療抵抗性獲得に hnRNPF を介したシグナル経路が関与することを強く示唆した。そこで、次に挙げる 3 点についてその詳細を検討することとした。

- (1) hnRNPF の標的遺伝子の RNA メタボリズム調節の詳細
- (2) オーロラ A の hnRNPF リン酸化サイトの同定
- (3) (1) で明らかにした hnRNPF の標的遺伝子調節におけるオーロラ A リン酸化の影響
- (4) オーロラ A/hnRNPF 複合体のがん進行との関係

3. 研究の方法

(1) 細胞培養: hnRNPF の高発現が明らかにされている膠芽腫由来細胞株 U87 と U251 (岡山大学医歯薬学総合研究科細胞生理学分野・松井秀樹教授より分与) トランスフェクション効率が高い 293T (ATCC) を用いた。オーロラ A 阻害剤は MLN8237 (Selleck Chemicals) を 200nM、2 時間処理の条件で使用した。トランスフェクションにはプラスミド DNA 1ug 当たり 2ul の Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用した。siRNA のトランスフェクションには 10pmol 当たり 3ul の RNAi Max (Invitrogen) を使用した。

(2) リン酸化部位の同定: オーロラ A のリン酸化コンセンサス部位のセリンあるいはスレオニン残基をアラニンに置換した変異 Flag-hnRNPF を KOD plus Mutagenesis kit (TOYOBO) を用い

て網羅的に作製した。オーロラ A 発現プラスミドと野生型あるいは変異型 hnRNPF を 293T 細胞に共発現させ、24 時間後に RIPA buffer を用いてタンパク質抽出した。Phos-tag SDS-PAGE にて泳動後、Flag 抗体によるウエスタンブロッティングを行い、タンパク質の移動度の差からリン酸化部位を特定した。

(3) RNA 安定性: 細胞を DMSO あるいはアクチノマイシン D (Wako) (5ug/ml) で処理し、経時的に細胞から RNA を抽出した。RevetraAce RT-PCR kit (TOYOBO) にて cDNA を合成後、real-time PCR でオーロラ A、オーロラ B、サイクリン B2 等の RNA 半減期を測定した。

(4) ルシフェラーゼプロモーター・アッセイ: オーロラ A ならびにオーロラ B のプロモーターの長さの異なるホタルルシフェラーゼレポーター構築物 (deletion luc plasmid) (岐阜大学医学部細胞情報学分野・木村正志講師より分与) を使用した。Deletion luc plasmid を hnRNPF と共発現し、48 時間後のルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase reporter assay kit (Promega) とルミノメーターを用いて測定した。

(5) 創傷治癒アッセイ (wound healing assay): hnRNPF を高発現あるいはノックダウンした細胞を創傷治癒アッセイ用シリコンインサート (ibidi) に培養し、2 4 時間後にインサートを外し、間隙の距離を経時的に測定した。

(6) In vitro RNA 結合アッセイ: AmpliScribe™ T7-Flash™ Biotin-RNA Transcription Kit (Epicentre) を用いてビオチン標識した mRNA をストレプトアビジンビーズ (Invitrogen) に固定後、in vitro transcription/translation kit (Promega) を用いて合成した hnRNPF と反応させた。反応後、ウエスタンブロッティングによって hnRNPF の結合を確認した。

4. 研究成果

(1) hnRNPF の標的遺伝子の RNA メタボリズム調節の詳細

CLIP 法により同定した hnRNPF の標的遺伝子オーロラ B、FoxM1、EZH2 について、hnRNPF の発現変化がこれら遺伝子の発現量に変化を与えるかを RT-PCR 法で検討した結果、オーロラ B と hnRNPF の間に正の相関関係を認め、FoxM1 と EZH2 については発現量の変動はなかった。hnRNPF が標的遺伝子の mRNA に直接的に結合しているかをビオチン標識した各 mRNA を用いて調べた結果、オーロラ B についてのみ結合が確認された。そこで以下の実験ではオーロラ B のみに標的遺伝子を絞り込み実験を行った。hnRNPF のオーロラ B mRNA への直接的結合が RNA の安定化に関与している可能性を検討するため、コントロール細胞と hnRNPF ノックダウン細胞をアクチノマイシン D 処理し、RNA の半減期を測定した。その結果、hnRNPF ノックダウン細胞ではオーロラ B mRNA の半減期が短縮されていることが分かった。次に hnRNPF のオーロラ B 遺伝子発現への関与について検討するため、オーロラ B プロモーターのルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、転写開始点上流 -130 以内の領域に hnRNPF の応答部位が存在することが示された。この領域には転写を上方調節する転写因子結合領域が複数存在するため、これら既知の領域に変異を加えたプロモーター構築物に対するレポーターアッセイを行った結果、CHR 部位が重要であることを見出した。他方、オーロラ A プロモーターについても同様の実験を行い、hnRNPF が転写を上方調節することを見出した。しかし、CHR 部位を変異させても転写活性の減少を認めなかったため、CHR 部位以外に調節領域があることが示唆された。これらの結果は hnRNPF が少なくともオーロラ B の転写活性と mRNA の安定性にポジティブな作用していることを示している。

(2) オーロラ A の hnRNPF リン酸化サイトの同定

オーロラ A による hnRNPF のリン酸化部位を同定するため、オーロラ A のリン酸化コンセンサス部位に網羅的に変異を導入し、オーロラ A とともに細胞に発現させた。リン酸化の有無と程度を同時に測定できる Phostag gel を用いて検討した結果、オーロラ A は 2 カ所のセリン残基をリン酸化することが分かった。オーロラ A 阻害剤存在下ではこれら部位のリン酸化が消失するため、オーロラ A 特異的の反応であることが示された。

(3) hnRNPF の標的遺伝子調節におけるオーロラ A リン酸化の影響

(1) で見出した hnRNPF のオーロラ B mRNA 結合と転写活性化に対するオーロラ A によるリン酸化の影響について調べるため、同定した 2 つのリン酸化部位をアラニン残基に置換した非リン酸化変異とアスパラギン酸に置換した疑似リン酸化変異 hnRNPF を用意し、各測定実験を行った。その結果、RNA 結合についてはリン酸化の影響は認められなかったが、転写調節については疑似リン酸化変異のほうが非リン酸化変異 hnRNPF と比較し、20% 程度転写活性が高いことが示された。

(4) オーロラ A/hnRNPF 複合体のがん進行との関係

がん進行におけるオーロラ A/hnRNPF 複合体の役割を調べるために、hnRNPF が高発現することが既知な膠芽腫培養細胞 U87 と U251 を使用し、hnRNPF の高発現とノックダウンを行い、細胞増殖と細胞遊走への影響を調べた。その結果、細胞増殖への影響は観察されなかったが、細胞遊走は高発現とノックダウンの両条件でコントロールと比較し促進された。この結果は、hnRNPF が関与する細胞遊走のシグナル経路にはオーロラ A が関与しないことを示している。そこで hnRNPF によって影響を受ける細胞遊走関連遺伝子について探索した結果、膠芽腫で高発現している Sox2 遺伝子を見出した。オーロラ B 遺伝子の発現調節とは異なり、オーロラ A の hnRNPF リン

酸化の Sox2 プロモーターに対する影響は観察されなかった。また、hnRNP F と相互作用する転写因子を探索した結果、膠芽腫の予後不良因子に正の相関を示す Oct3/4 と結合することを見出した。現時点でこの相互作用の役割は明らかでない。

本研究から、オーロラ A が hnRNPF のリン酸化を介して染色体分配機構のメインプレイヤーであるオーロラ B の発現量を直接調節していることを明らかにした。オーロラ A の機能破綻によって誘導される染色体不安定性のメカニズムとして中心体の過剰生産が広く知られていることを踏まえると、オーロラ A は多様なシグナル経路を厳密に調節し、染色体安定性を保証するキーププレイヤーの位置にあると結論付けられる。この知見は、根治が極めて困難な疾患である膠芽腫に対し、オーロラ A の分子標的薬が有効である可能性を示唆し、本研究の成果は社会的意義が大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 笹井香織、Warapen Treekitkarnmongkol、伊藤佐智夫、Sanker N. Maity、Subrata Sen、片山博志
2. 発表標題 細胞分裂期制御タンパク質による新規転写調節機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤 佐智夫、邱 艶艶、堺 明子、殷 佩浩、片山 博志
2. 発表標題 肺癌における癌遺伝子候補MYNNとp53の統合的解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 W Treekitkarnmongkol, LM Solis, K Kai, AM Thompson, W Tian, II Wistuba, K Sasai, Y JItsumori, AA Sahin, DH Hawke, JM Lee, L Qin, T Bawa-Khalife, R Rad, KK Wong, CM Abbott, H Katayama and S Sen
2. 発表標題 eEF1A2 facilitates PTEN-GSK3 mediated Aurora-A protein degradation during S-G2 phase inactivated in PTEN-deficient breast cancer
3. 学会等名 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H Katayama, K Sasai, S Sen
2. 発表標題 Aurora-A Signaling Cascade Regulating Transactivation of Mitotic Genes
3. 学会等名 7th Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H Katayama
2. 発表標題 Functional Interaction between Aurora-A Kinase and Mps1 Kinase in the Regulation of Cell Cycle and Genomic Instability
3. 学会等名 2018 Academic Conference on Chinese Medical Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高岡修平, 坂本萌, 實盛好美, 笹井香織, 片山博志
2. 発表標題 RNA結合タンパク質hnRNP Fは細胞分裂進行を調節している
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂本萌, 高岡修平, 實盛好美, 笹井香織, Subrata Sen, 片山博志
2. 発表標題 Emerging role of hnRNP F in mitotic cell cycle progression
3. 学会等名 西日本医学生学術フォーラム2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笹井 香織 (Sasai Kaori) (50722162)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

