

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17465

研究課題名(和文) laminA/CのG-quadruplexを介した大腸がん悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Effects of G-quadruplex in LaminA/C promoter on colon cancer phenotype

研究代表者

西川 達哉 (Nishikawa, Tatsuya)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・腫瘍循環器科診療主任

研究者番号：80781757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Lamin A/Cタンパク質はLMNA遺伝子から転写・翻訳される。LMNA遺伝子の転写産物1つを今回LMNA-V6と名付けこの転写産物の解析を行った。このLMNA-V6のプロモーター領域には6つのG-quadruplex構造をもつ領域が存在しており、それらがLMNA-V6の発現制御を行っていた。さらに、LMNA-V6は機能性RNAとしてLMNA遺伝子の主要産物である、Lamin A/CのmRNA発現を制御していた。LMNA-V6のノックダウンや過剰発現モデルの網羅的な解析にて、大腸がん細胞ではp53遺伝子発現が変化することがわかり、がんの悪性形質転換などに関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LMNA遺伝子はがん関連遺伝子の1つである。本研究では、LMNA遺伝子の転写産物のうち、LMNA-V6についてその存在を証明し、機能を解析した。LMNA-V6のプロモーター領域にはG-quadruplex構造をとる領域を認め、LMNA-V6の発現を制御していた。さらにLMNA-V6は新規の機能性RNAとして、Lamin A/CのmRNAの発現制御を行っていた。また、LMNA-V6は大腸がん細胞内で、p53遺伝子というがん抑制遺伝子の発現を変化させた。LMNA-V6の制御が今後のがんに対する治療法の発展に寄与できる可能性があり、有用な研究結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Lamin A/C proteins, major components of the nuclear lamina, are encoded by the LMNA gene. Among the LMNA transcript variants, we focused on a spliced variant 6 (termed LMNA-V6), which contains unique 3 exons upstream of exon 1 of LMNA. The promoter region of LMNA-V6 formed multiple G-quadruplexes and increased its transcriptional activity. Moreover, LMNA-V6 negatively regulated other LMNA mRNA variants, lamin A and lamin C, via direct interaction with their promoter. Knockdown of LMNA-V6 decreased the proliferation of colon cancer cells, whereas overexpression of the unique 3 exons of LMNA-V6 increased cell growth. Furthermore, microarray gene expression profiling showed that alteration of LMNA-V6 levels influenced the expression of p53 in colon cancer cells. Taken together, the results suggest that LMNA-V6 may be a novel functional RNA whose expression is regulated through multiple G-quadruplexes in colon cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：G-quadruplex LMNA遺伝子 Lamin A/C 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

G-quadruplex 構造(G4)はグアニンを多く含む配列で認められる核酸の立体構造である。G4 はこれまで、DNA の複製、テロメアの保護、転写、ゲノムダメージの修復、DNA 組換え、エピジェネティックな修飾など、様々な制御に関与していることが報告されている。がん遺伝子とがん抑制遺伝子の多くでプロモーター領域に G4 が存在していることが報告されている。しかし、それらの遺伝子がどのように G4 構造を介して発現が制御されているかはほとんどわかっていない。

また、LMNA 遺伝子より転写、翻訳される lamin A/C タンパク質は、がん細胞ではその発現制御に異常が認められることが報告されている。この LMNA 遺伝子より転写される mRNA の 1 つである variant6 (LMNA-V6)の上流には複数の潜在的な G4 構造が配列上、存在していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、LMNA 遺伝子の転写産物の 1 つである、LMNA-V6 がそのプロモーター領域の G-quadruplex によりどのように発現制御されるのか、そしてがん細胞においてどのような機能をもっているのかを解析することにより、将来的な大腸がんの治療ターゲットや、悪性度のマーカーなどの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) LMNA-V6 自体とプロモーター領域の G 4 の存在の証明

LMNA-V6 に特異的なエクソンが 3 つ存在するため、主にその領域から下流を含むプライマーセットで PCR を行い、さらにその増幅産物の DNA シークエンスを確認し、存在を証明した。また、LMNA-V6 のプロモーター領域には 6 つの G 4 構造が予想される領域を認めた。これらが G 4 形成しているかどうかを、クロマチン免疫沈降 (ChIP-PCR)、ゲルシフトアッセイ、円二色性 (CD) スペクトラム解析を用いて行った。ChIP-PCR やゲルシフトアッセイには G 4 構造特異的な抗体である B G 4 抗体を用いた。

(2) G 4 による LMNA-V6 の発現制御

LMNA-V6 のエクソン U 1 の上流で、6 つの G 4 を含むプロモーター領域を、ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域に組み込んだレポーターベクターを用いた。G 4 を安定化させる pyridostatin (PDS) という薬剤を用いて、ルシフェラーゼの発現変化を調べることでプロモーター活性の変化を解析した。

(3) LMNA-V6 による lamin A、C の発現変化の解析

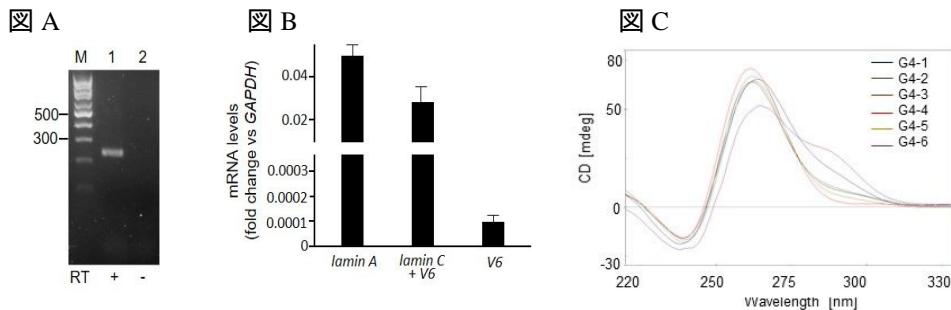
LMNA-V6 のノックダウン細胞と特異的な 3 つのエクソン領域 (U1-3) の過剰発現細胞を作成した。ノックダウンは siRNA を用いて行い、過剰発現は pcDNA3.1 ベクターに組み込み、細胞内で発現させた。大腸がん細胞株 (HCT116) を用いて解析を行った。リアルタイム PCR での lamin A、C の発現変化や、ウエスタンブロット法によるタンパク質発現量変化の解析を行った。

(4) LMNA-V6 による大腸がん細胞の形質変化の解析

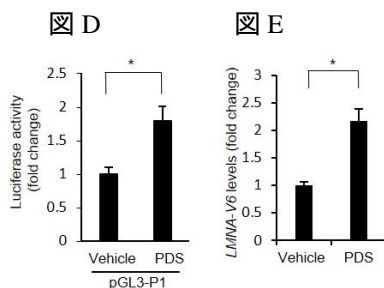
LMNA-V6 のノックダウン細胞と過剰発現細胞を用いて、大腸がん細胞 (HCT116) の細胞増殖能の変化を解析した。また、マイクロアレイを用いて、LMNA-V6 により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。またマイクロアレイの情報からパスウェイ解析ソフトを用いて統計学的かつ生理的・機能的な意味づけを行った。

4. 研究成果

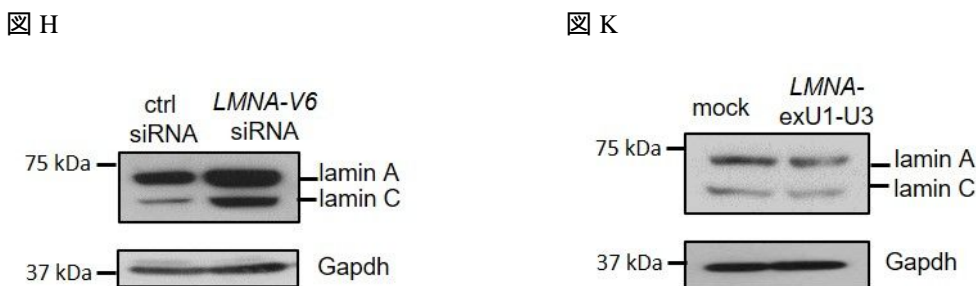
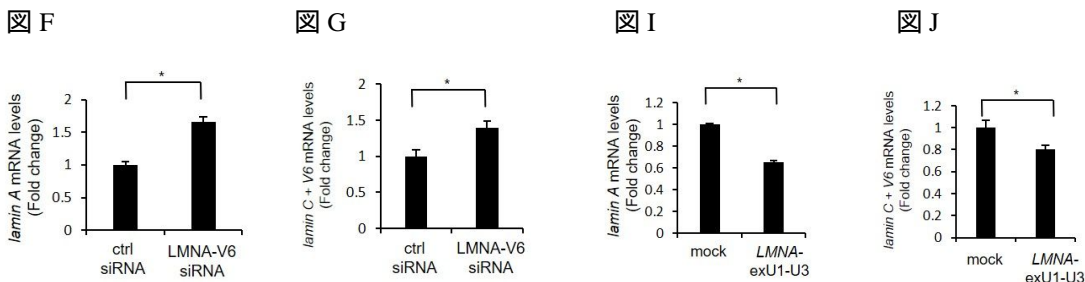
(1) LMNA 遺伝子の主な mRNA は lamin A/C タンパク質をコードする lamin A と lamin C である。LMNA-V6 という lamin A、C のエクソン 1 のさらに上流に 3 つのエクソン (エクソン U 1, 2, 3 と名付けた) が存在する転写産物がある。そしてこの LMNA-V6 の存在を特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ、大腸がん細胞において発現が確認された (図 A、B)。さらにエクソン U 1 の上流 (プロモーター領域) には、6 か所の潜在的な G-quadruplex (G4) 構造をとりうるグアニンが豊富に存在する領域を認めた。これら 6 配列をもちいて、クロマチン免疫沈降 (ChIP-PCR)、ゲルシフトアッセイ、円二色性 (CD) スペクトラム解析 (図 C) を行ったところ、すべてで G 4 が形成されていると考えられた。



(2) *LMNA-V6* のプロモーター領域をルシフェラーゼプロモーターアッセイを用いて解析すると、G4 構造を安定化させる PDS という薬剤を投与するとプロモーター活性が有意に増加した (図 D)。また、細胞自体に PDS を投与したところ、*LMNA-V6* の発現がリアルタイム PCR 解析で増加していることが確認された (図 E)。

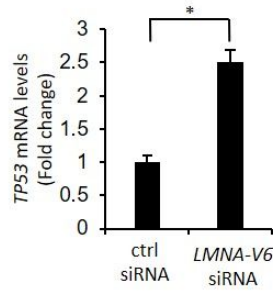


(3) 大腸がん細胞株 (HCT116) で *LMNA-V6* のノックダウンさせたところ、lamin A, C は mRNA、タンパク質レベルで増加した (図 F-H)。逆に *LMNA-V6* の特異的なエクソンである U1-3 を過剰発現させたところ、lamin A, C は mRNA、タンパク質レベルで低下し、両方で矛盾しない結果となった (図 I-K)。このことから、*LMNA-V6* が、lamin A, C の mRNA の発現制御に関与していることが分かった。さらに、*LMNA-V6* は細胞質より確認に多く含まれていることもわかり、機能性 RNA として遺伝子発現制御を行っている可能性が示唆された。

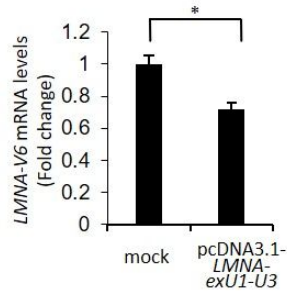


(4) *LMNA-V6* のノックダウン細胞とエクソン U1-3 過剰発現細胞をコントロールと比較し、細胞増殖能を比較したところ、ノックダウンで細胞増殖は低下し、過剰発現で亢進した。さらにマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、*LMNA-V6* ノックダウンで *p53* 遺伝子の発現が増加し、エクソン U1-3 の過剰発現で *p53* 遺伝子発現は減少した。(図 L-O)

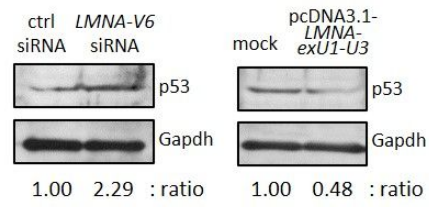
☒ L



☒ M



☒ N



☒ O

以上のことから、*LMNA-V6* は微量だががん細胞内に存在しており、それ自身の発現はプロモーター領域の複数の G4 構造によって制御されていた。また *LMNA-V6* は機能性 RNA として、下流のプロモーターに作用し、lamin A,C の発現制御に関与していた。また、*LMNA-V6* は大腸がん細胞内で *p53* 遺伝子の発現にも影響を与えていることが分かった。上記の結果については、現在論文化し国際雑誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishikawa Tatsuya, Kuwano Yuki, Takahara Yumiko, Nishida Kensei, Rokutan Kazuhito	4. 巻 9
2. 論文標題 HnRNPA1 interacts with G-quadruplex in the TRA2B promoter and stimulates its transcription in human colon cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46659-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------