

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号： 24402

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2009 ~ 2011

課題番号： 21550162

研究課題名 (和文) スプライシング因子とその異常による疾病

研究課題名 (英文) The splicing factor and diseases caused by its anomaly

研究代表者

井上 晃 (INOUE AKIRA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号： 50109857

研究成果の概要 (和文) : (1) S1-1 は、抗がん剤による細胞死を抑制した。また S1-1 はスプライシングを調節し、細胞死関連遺伝子群の Fas に働き細胞死抑制性の Fas を産生させた。(2) 癌への S1-1 の関わりを様々なヒト癌組織に対する免疫組織化学で調べた。しかし S1-1 発現と癌種や癌悪性度の間に関連性はなかった。(3) S1-1 は転写調節因子でもあった。即ち遺伝子発現調節機構において S1-1 は転写とスプライシングの両方に作用する調節因子であった。(4) S1-1 の核局在化配列 3 つと、転写活性低下時に S1-1 を核内構造体 (S1-1 nuclear body) に向わせる配列 2 つを分子内に同定した。以上をいくつかの論文として作成している。

研究成果の概要 (英文) : (1) S1-1 suppressed cell death induced by anticancer agents. It regulated splicing, and produced an antiapoptotic Fas isoform. (2) Association of S1-1 with tumorigenesis was examined by S1-1 immunohistochemistry for 350 cancer tissue sections. However, S1-1 expression showed no correlation with cancer cell types or cancer malignancy. (3) S1-1 was also a transcription factor. It is noteworthy that S1-1 regulates both transcription and splicing. (4) Three nuclear localization sequences, and two sequences that sequester S1-1 into S1-1 nuclear bodies under reduced cellular transcriptional activity were identified in the S1-1 molecule. Manuscripts on these findings are in preparation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 複合化学・生体関連化学

キーワード： RNA プロセッシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 選択的スプライシングは一つの遺伝子から異なる mRNA を生成し、構造の類似したしかし異なるタンパク質をつくり出

す反応である。高等生物ではこの選択的スプライシングは遺伝子産物に多様性を与える基本的な機構を成すもので、ヒト・タンパク質遺伝子 21,800 個の約 90%

でみられ、発生や分化の過程、あるいは組織細胞に必要な特定 mRNA をつくりだす。

(2) S1-1 タンパク質は RNA-結合タンパク質で、最近はいより一般的な RBM10 の名で呼ばれるようになっているが、これは 1996 年に本研究成果報告者が発見・クローン化した遺伝子である (A. Inoue et al., Nucl. Acids Res. 24, 2990-97, 1996)。2005 年-2007 年に S1-1 は乳がんや白血病に関わることが報告された (R.-Maki et al., J Cell Biochem. 100, 1440-58, 2007; Mattioli et al., Oncogene 24, 2461-73, 2005)。そして 2008 年に S1-1 が新規の選択的スプライシング因子であることを示唆する論文が報告された (S. Bonnal et al., Molecular Cell 32, 81-95, October 10, 2008)。本研究成果報告者は同 2008 年、この可能性を検討しこれが正しいことを支持する結果を得た。

(3) 上の実験結果から、本報告者はスプライシング因子 S1-1 の異常が標的遺伝子・転写体のスプライシングを混乱させ、さまざまな疾病を引き起す原因になるという着想を持った。

2. 研究の目的

「スプライシング因子 S1-1 の異常がさまざまな疾病を引き起す原因になる」という着想に基づき、次の (1)-(3) の研究を行なうことにした。すなわち、

(1) S1-1 が新規の選択的スプライシング因子であることの証明。

(2) S1-1 はがん危険遺伝子であって、その異常は発ガンの原因になることの検討。

(3) スプライシング調節を受ける S1-1 標的遺伝子群の解析。

3. 研究の方法

(1) S1-1 が新規の選択的スプライシング因子であることを、細胞死関連遺伝子群 (Fas, FLIP, Bax, Bcl-X, caspase の 2, 3, 9 の 7 つの遺伝子群) で解析・証明する。この実験は S1-1 が細胞死を抑制するという、本報告者がそれまでに得ていた実験成績に基づくものである。

(2) S1-1 ががん危険遺伝子であることを明らかにするために、さまざまなヒトのがん組織切片をのせた tissue array を用いて抗 S1-1

特異抗体による免疫組織化学をおこない、S1-1 と発ガンあるいは S1-1 発現とガン悪性度の相関性を調べる。

(3) S1-1 の標的遺伝子群を解析するために、S1-1 の細胞内レベルを変化させ、これに応じて発現変動を起こす遺伝子群を RNA-Seq 法で網羅的に同定し、S1-1 が調節するスプライシング標的遺伝子群とガン関連遺伝子群を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ① 抗がん剤で誘導した細胞死 (アポトーシス) を S1-1 が抑制する事を見出した。② S1-1 はスプライシング調節因子であって、様々なアポトーシス関連遺伝子の中でも Fas 遺伝子の転写体スプライシングに作用し、アポトーシス抑制性の Fas アイソフォーム産生へと導くことを示した。

(2) 腫瘍形成への S1-1 の関わりを調べるために、S1-1 発現レベルと発がん、S1-1 発現レベルとがん悪性度の関係を 12 種のヒトがん組織切片 350 片をスライドにのせた tissue array (Pantomics 社) を用いて、抗 S1-1 特異抗体による免疫組織化学的方法で調べた。しかしながら、S1-1 発現とガン種や S1-1 発現とガン悪性度に有意な相関性はみられなかった。

S1-1 抗体で得られる組織の染色強度は S1-1 発現量を表わす。上の結果に見られる様に、S1-1 発現量と組織ガンの間の相関性は明確ではない。この結果は、今後は S1-1 に起こる部位特異的変異が原因となって発症する、ガンを含め、さまざまな疾病について解析して行く必要のあることを示している [(5)-② 参]。

(3) S1-1 が転写因子でもある事を明らかにした。すなわち、S1-1 のノックダウン系と再構成系を用いて、S1-1 によって発現の制御を受ける遺伝子群を解析し、炎症性疾患マーカーの cxcl10 や saal、あるいは腫瘍壊死因子 TNFb 等の遺伝子転写を S1-1 が大きく上昇させることを明らかにした。S1-1 による転写制御の機序解明が今後の研究課題となる。

(4) S1-1 を細胞核に局在化させる核局在化配列 (NLS) が、S1-1 分子の 3ヶ所に有ることを明らかにした。1 つは新規の NLS モチーフであった。

さらに、細胞の転写活性が低下する時に S1-1 は S1-1 nuclear body とよぶ核内構造体に隔離される (A. Inoue et al., Biol. of the Cell 100, 523-535, 2008)。この核内構造体への局在化配列 2 つを S1-1 分子内に同定した。

(5) 今後の課題：

① S1-1 のノックダウン系と再構成系を用いて S1-1 発現を変化させ、これに応じて変動する遺伝子群を RNA-Seq 法で網羅的に同定する。RNA-Seq 法により、S1-1 がスプライシング調節する標的遺伝子群の同定のみならず、各転写体上の S1-1 が結合し作用するスプライシング部位の同定、さらに S1-1 が転写調節する標的遺伝子群をも網羅的に明らかにすることができる。

② S1-1 遺伝子は X-染色体にある。この 2 年の間の遺伝学的な研究から、S1-1 は TARP 症候群(X-連鎖多重発生異常症候群)として知られる様々な先天性異常の原因遺伝子であることが明らかにされた (Gripp et al., Am J Med Genet. 155, 2516-20, 2011)。これらは口蓋裂や小顎症、心房中隔欠損症などの心臓形成異常、足底が顔に向く先天性内反足などである。さらに S1-1 が原因となる白血病 (Mattioli et al., Oncogene 24, 2461-73, 2005) や精神遅滞や認知障害といった神経疾患 (Najmabadi et al., Nature, doi:10.1038, 2011)、体細胞の日周リズムの変動 (私信、D Gatfield, 2011) が報告された。これらの情報と S1-1 が転写とスプライシングを調節するという我々の知見から、S1-1 分子に起こる失活や機能低下が、多様な疾病の原因になることは明らかである。

今後、ヒト疾病モデルとして S1-1 のノックアウトマウスを作製し、発生・分化時の異常や、ノックアウトで成体に現れる疾病群を解析する研究の方向性を創り出す。生体への影響を、時間特異的・組織特異的にみるためのノックアウトは条件付変異・誘導可能変異 (eg. Cre-LoxP 変異) が必要となる。

③ スプライシング制御と転写制御での S1-1 の分子レベルの作用機構を明らかにする必要がある。

④ また、S1-1 が研究対象となっていないながら、他の研究者によるいくつかの proteomics 解析論文の supplementary data には、S1-1 が多くの部位でリン酸化修飾をうけることが示されている。これは S1-1 の活性が細胞内シグナル伝達系によって調節を受けることを示唆し、その分子レベルの S1-1 活性の調節機構とその細胞生理学的意義を明らかにすることが必要となることを示している。

⑤ S1-1 遺伝子産物にはアイソフォーム 1 (930 アミノ酸残基) と 2 (852 残基) がある。転写制御とスプライシング制御へのこれらアイソフォームの関わり方とその違いは、今

後の解析テーマとなる。

⑥ 以上の研究成果のいくつかを発表すべく論文作成中である。

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 1 件)

① Ryohei Wakahara, Hiroyuki Kunimoto, Kanae Tanino, Hirota Kojima, Akira Inoue, Haruo Shintaku and Koichi Nakajima, Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45, Genes to Cells, 査読有り, 17, 132-145, 2011, DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x.

[その他]

ホームページ等

(2009 年春までの担当講座)

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/mmbiore/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 晃 (INOUE AKIRA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50109857

(2) 研究分担者

中嶋 弘一 (NAKAJIMA KOICHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00227787

(3) 連携研究者

小島 裕正 (KOJIMA HIROTADA)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40336772