

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02423

研究課題名（和文）スプライシング異常細胞を排除する「細胞の品質管理機構」の解明

研究課題名（英文）Study on the cellular quality control mechanisms for eliminating splicing-defective cells

研究代表者

甲斐田 大輔（Kaida, Daisuke）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：60415122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：私たちの体内には、疾患などの原因となりうるスプライシング異常細胞が増殖することを防ぐための分子機構が存在すると考え研究を行なった。その結果、スプライシング異常細胞は細胞周期の停止もしくは細胞死により増殖が抑制されることが明らかとなった。細胞周期停止の分子機構は、CDKインヒビター-p27のトランケート型タンパク質p27\*がG1期サイクリン、M期サイクリンの両方を阻害することにより細胞周期が停止することであることが明らかとなった。また、p27\*は正常型のp27と比較し安定性が高いため、より強い細胞周期停止活性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの研究成果は、私たちの体内でスプライシング異常細胞の増殖がどのように抑制されているかを明らかにするものです。スプライシング異常細胞は様々な疾患の原因となるため、このメカニズムの解明はスプライシング異常に関わる疾患の治療法の開発につながると考えられます。また、高等真核生物ではスプライシングを利用することにより、より複雑な生命活動を行っていますが、より多くのスプライシング異常のリスクがあります。このメカニズムは、高等真核生物への進化を考える上でも重要であると言えます。

研究成果の概要（英文）：We performed experiments to show that there is a molecular mechanism to prevent the proliferation of splicing-defective cells, which can be the cause of diseases. As a result, it became evident that the proliferation of splicing-defective cells is suppressed through either cell cycle arrest or cell death. The molecular mechanism of cell cycle arrest involves the truncated form of the CDK inhibitor p27, called p27\*, which stops the cell cycle by inhibiting both G1 and M phase cyclins. Additionally, p27\* was found to be more stable compared to the wild-type p27, thereby possessing stronger cell cycle arrest activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング 細胞周期 p27

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、転写直後の未成熟な pre-mRNA から、スプライシングによりイントロンが切り出され、エキソンがつなぎ合わされることで成熟型 mRNA がつくられる。したがって、スプライシング異常は、正常な遺伝子発現の低下だけでなく、pre-mRNA が翻訳された異常タンパク質 (トランケート型タンパク質) の産生を引き起こす。トランケート型タンパク質は、機能を持たないだけでなく、正常なタンパク質の機能を阻害するなど、有害な存在である。また個体レベルでは、スプライシング異常細胞の蓄積が疾患の原因になる。そこで、pre-mRNA の分解、pre-mRNA の核内係留、転写伸長の抑制などの、mRNA 品質管理機構が pre-mRNA の翻訳を防いでいる。しかしながら、スプライシングに異常のある細胞を体内から排除するといういわゆる「細胞の品質管理機構」は存在するかどうかに関しては明らかではなく、また、その分子メカニズムに関してもわかっていなかった。

私たちの先行研究から、スプライシング阻害剤 spliceostatin A (SSA) が細胞周期停止や、細胞死を引き起こすことが明らかとなっていた。この細胞周期停止や細胞死は、上述の細胞の品質管理機構の一部だと考えられるが、その詳細な分子機構は明らかではなかった。加えて、CDK インヒビター-p27 の pre-mRNA から翻訳されたトランケート型タンパク質 p27\* が G1 期での細胞周期停止の原因であることも明らかとした。さらに、翻訳阻害剤シクロヘキシミド による遺伝子発現の低下と比較すると、SSA の方が細胞死を引き起こしやすく、G2/M 期での細胞周期停止も顕著であった。これらの結果は、細胞周期停止や細胞死には、遺伝子発現低下だけでなく、正常な機能がなく有害なものだと考えられてきたトランケート型タンパク質も重要であることを示唆している。しかしながら、(1) どのような遺伝子の発現低下やトランケート型が細胞周期停止や細胞死の原因となるのか？(2) スプライシング阻害が細胞死を引き起こすメカニズムはどのようなものか？(3) 細胞周期停止が細胞死を引き起こす可能性はあるのか？などといった疑問が残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の残された疑問点を解明することにより、スプライシング異常細胞を個体から排除する細胞の品質管理機構の存在を証明し、そのメカニズムの全体像を解明することである。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、スプライシング阻害時に発現量が変化する遺伝子や、スプライシング阻害時に発現するトランケート型タンパク質の探索し、それらの遺伝子発現変化やトランケート型タンパク質の発現が、細胞周期停止や細胞死を引き起こすメカニズムを解明する。加えて、細胞周期停止が細胞死を引き起こすかどうかの証明と、そのメカニズムの解明も行う。

## 4. 研究成果

上述のように、CDK インヒビター-p27 のトランケート型タンパク質 p27\* の発現が G1 期での細胞周期停止に関わることを明らかにしていたものの、他の因子が関わることも考えられる。そこで、G1 期から S 期への移行に関わるいくつかのタンパク質の量が SSA 処理により変化するかどうかを確かめたところ、G1 期から S 期の移行に必須の cyclin E1、cyclin E2、E2F1 のタンパク量が減少していた。一方、同じく G1 期から S 期の移行に必須である CDK2 のタンパク量には変化がなかった。次に、それらのタンパク量の減少が mRNA レベルでも観察されるかどうかを確かめたところ、mRNA レベルでも減少が確認された。mRNA レベルの減少が転写活性の低下によるものかどうかを確かめるために、cyclin E1、cyclin E2、E2F1 遺伝子のプロモーター領域をクローニングして GFP 遺伝子と融合したレポーター遺伝子を作成したところ、これらの遺伝子からの転写は影響を受けていないことが明らかとなった。そこで、遺伝子上に幾つかのプライマーを設計し、転写伸長が影響を受けるかどうかを確かめたところ、これらの遺伝子の転写伸長が抑制され、その結果 mRNA レベルで発現が減少することが明らかとなった。

これらの因子のタンパク量が減少することが G1 期停止の原因であるとすると、これらの遺伝子を過剰発現させることにより細胞周期停止が解除されるはずである。そこで、これらの因子の発現プラスミドを作成し過剰発現させたところ、部分的に細胞周期停止が解除された。さらに、cyclin E1 と E2F1 を同時に過剰発現させ、さらに p27 をノックダウンアウトすることにより、より顕著な細胞周期停止の解除が観察された。これらのことから、p27\* の発現のみならず、cyclin E1、cyclin E2、E2F1 遺伝子の転写伸長が抑制されることによるタンパク量の減少も SSA 処理時の G1 期停止に関わっていると考えられる。

上述の研究を進めている中で、SSA 処理時にはトランケート型である p27\* の発現のみならず、全長の p27 の発現も上昇していることが明らかとなった。全長 p27 の発現上昇も G1 期における細胞周期停止を引き起こすと考えられる。そこで、全長 p27 の発現上昇の分子メカニズムを明らかにするために、SSA 処理時の p27 タンパク質の安定性を調べたところ、SSA 処理により若干 p27 タンパク質の安定性が増加していることが明らかとなった。また、p27 の mRNA 量を測定したところ、SSA の濃度依存的に p27 mRNA 量が増加することが明らかとなった。この mRNA 量の増加が転写活性の上昇によるものかどうかを確かめるため、p27 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、GFP 遺伝子と融合したレポーター遺伝子を作成したところ、SSA は p27 遺伝子の転写には影響を与えないことが明らかとなった。次に、SSA 処理が p27 mRNA の安定性に影響を与えるかどうかを確かめた。新規合成 RNA をウリジンの誘導體であるエチニルウリジン (EU) でラベルし、培地から取り除いた後、ラベルされた RNA の量を測定することで mRNA の安定性を測定したところ、SSA ショリにより p27 mRNA が顕著に安定化することが明らかとなった。この安定化に寄与する p27 mRNA 上の配列を同定したところ、p27 mRNA の 3' UTR が安定化に関わることが明らかとなった。これらのことから、SSA 処理時には p27 の mRNA が安定化することにより p27 タンパク質の量が増加し、G1 期停止につながると考えられる。

以前の研究から SSA 処理により G1 期および G2/M 期で細胞周期が停止することがわかっている。G1 期停止の原因は、上述のような p27\* の発現、cyclin E1、cyclin E2、E2F1 の発現低下、p27 の発現上昇などが挙げられる。一方、G2/M 期停止のメカニズムは明らかになっていない。そこで、G2/M 期停止メカニズムを解析したところ、G2/M 期で停止している細胞においても p27\* が蓄積していることが明らかとなった。全長の p27 は G1 期と S 期の境目でのみ発現が観察されるが、p27\* はそれ以外の時期においても発現していると考えられる。そこで p27\* の過剰発現が G1 期停止のみならず、G2/M 期停止を引き起こすかどうかを確かめたところ、G2 期の細胞が増加することが明らかとなった。G2/M 期の進行には M 期サイクリンと呼ばれる Cdk1-Cyclin A および Cdk1-Cyclin B 複合体が関わるということが知られている。p27\* は G1 期において G1 サイクリンである Cdk2-Cyclin E 複合体の活性を阻害し、細胞周期を停止させることから、G2 期においては M 期サイクリンの活性を阻害することで G2 期停止を引き起こしていると考えられる。そこで、p27\* が M 期サイクリンと結合するかどうかを確かめたところ、p27\* は M 期サイクリンと強固に結合することが明らかとなった。さらに、その際の M 期サイクリンの活性を測定したところ、p27\* により活性が阻害されていることが明らかとなった。これらのことから、p27\* は G1 期のみならず、G2 期においてもサイクリンと結合することによりその活性を阻害し、細胞周期を停止させることが明らかとなった。

全長の p27 は G2/M 期にはユビキチン化されプロテアソームにより分解されることで発現が抑制されている。一方、p27\* は G2/M 期においても発現が認められる。そこで、p27\* はプロテアソームによる分解に抵抗性を示すのではないかと考え実験を行ったところ、p27\* は全長の p27 と比較してユビキチン化を受けにくいということが明らかとなった。その結果、プロテアソームによる分解も免れていると考えられる。全長の p27 はその C 末端付近にあるスレオニン残基がリン酸化されることが引き金となりユビキチン化を受けるが、C 末端トランケート型の p27\* はそのスレオニン残基を持たないためユビキチン化を受けにくいと考えられる。これらのことから、pre-mRNA から翻訳されたトランケート型タンパク質である p27\* は、全長の p27 とは異なる性質を持ち、その結果、より強い細胞周期停止活性や抗がん活性を発揮すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Daisuke Kaida and Kenta Shida	4. 巻 608
2. 論文標題 Spliceostatin A stabilizes CDKN1B mRNA through the 3' UTR	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 39-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daisuke Kaida, Takayuki Satoh, Ken Ishida, Rei Yoshimoro, and Kanae Komori	4. 巻 42
2. 論文標題 A Truncated Form of the p27 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Translated from Pre-mRNA Causes G2-Phase Arrest	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biol.	6. 最初と最後の頁 e00217-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mcb.00217-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 甲斐田大輔	4. 巻 94
2. 論文標題 スプライシング異常と細胞周期停止機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 829-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940829	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kei Kikuchi, Daisuke Kaida	4. 巻 22
2. 論文標題 CCNE1 and E2F1 Partially Suppress G1 Phase Arrest Caused by Spliceostatin A Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 11623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222111623	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 -

1. 著者名 Rei Yoshimoto, Jagat K Chhipi-Shrestha, Tilman Schneider-Poetsch, Masaaki Furuno, A Maxwell Burroughs, Shohei Noma, Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Akila Mayeda, Shinichi Nakagawa, Daisuke Kaida, Shintaro Iwasaki, Minoru Yoshida	4. 巻 28
2. 論文標題 Spliceostatin A interaction with SF3B limits U1 snRNP availability and causes premature cleavage and polyadenylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Chem Biol	6. 最初と最後の頁 1356-1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 志田健太、甲斐田大輔
2. 発表標題 スプライソスタチンAは3' UTRを介してCDKN1B mRNAを安定化させる
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐田大輔
2. 発表標題 スプライシング阻害剤はトランケート型タンパク質の産生を介して抗がん活性を発揮する
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐田大輔
2. 発表標題 Study on the molecular mechanisms of G1 phase arrest caused by spliceostatin A treatment
3. 学会等名 第26回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 甲斐田大輔
2. 発表標題 スプライシング阻害がG1期停止を引き起こすメカニズムの解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井結衣子、甲斐田大輔
2. 発表標題 Rbm38がスプライシング阻害による転写伸長抑制を解除する機序の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Kaida, Ken Ishida, Takayuki Satoh
2. 発表標題 Truncated proteins which are produced by pre-mRNA translation protect our body from splicing abnormality
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 甲斐田大輔
2. 発表標題 Comprehensive understanding of the molecular mechanisms of cell cycle arrest caused by splicing inhibition
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池啓、甲斐田大輔
2. 発表標題 スプライシング阻害によるG1停止機構の解明
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井結衣子、甲斐田大輔
2. 発表標題 Rbm38がスプライシング阻害による転写伸長抑制を解除するメカニズム
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 甲斐田大輔	4. 発行年 2021年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 448
3. 書名 ヒトゲノム事典	

〔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	高崎 一郎  (Takasaki Ichiro)  (00397176)	富山大学・学術研究部工学系・准教授   (13201)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岩崎 信太郎  (Iwasaki Shintaro)  (80611441)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員    (82401)	

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