

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15538

研究課題名（和文）新たな癌抑制戦略の基盤となる、癌特異的再スプライシング制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cancer-specific re-splicing regulatory mechanisms as a basis for new cancer suppression strategies

研究代表者

藤田 賢一（Fujita, Kenichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：70816884

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子から転写されたmRNA前駆体は正確にスプライシングを受け、成熟mRNAとなり高次生命現象を具現化する。そのため、スプライシング機構の破綻は様々な疾患、及び癌の原因となる。しかし正常細胞における正確なスプライシング機構が、なぜ癌で破綻するか、全貌は未解明である。この解明へのアプローチとして、癌特異的にスプライシング完了機構が破綻し、成熟mRNAが再度スプライシングされる、再スプライシング現象に着目した。本研究では様々な癌細胞において再スプライシング産物の網羅的同定を行い、加えて、再スプライシング制御機構の全貌を解明することで、再スプライシング阻害に基づく癌抑制戦略への基盤を構築する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究室が過去に発見したTSG101遺伝子由来の再スプライシング産物は、咽頭癌細胞の増殖を促進し、その浸潤と転移を促進することを明らかにしている。この事実は、発癌や癌の悪性を理解するために、トランスクリプトーム異常を同定し、産出機構を解明することに対し、力強い動機づけとなっている。よって本研究による再スプライシング産物の網羅的同定は、新たな癌悪性化機構への理解の進展に繋がる。加えて再スプライシング制御機構の解明は、その阻害に基づいた悪性癌の治療へ向けた基盤となることが期待される。このような解析は世界的に例がない未開拓分野であり、高い社会的意義を持つ研究である。

研究成果の概要（英文）：The precursors mRNA transcribed from genes and undergo precisely splicing to become mature mRNAs that realize higher-order biological phenomena. Therefore, failure of the splicing mechanism causes various diseases and cancers. However, it is not fully understood why the accurate splicing mechanism in normal cells is disrupted in cancer. As an approach to elucidate the mechanism, we focused on the phenomenon of re-splicing, in which the splicing completion mechanism is disrupted and mature mRNA is re-spliced in a cancer-specific manner. In this study, we will comprehensively identify re-splicing products in various cancer cells, and by elucidating the full picture of the re-splicing regulatory mechanism, we will establish a basis for cancer suppression strategies based on re-splicing inhibition.

研究分野：分子生物学

キーワード：再スプライシング がん EJC複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報から転写された mRNA 前駆体は、イントロン境界部のスプライス部位がスプライソソームによって正確にスプライシングされて、成熟 mRNA が完成し、タンパク質の設計図となる。そのため、スプライシングに狂いが生じると、細胞機能に害が生じ、癌を含む様々な疾患の原因となる。実際に癌においては大規模なトランスクリプトーム異常が生じており、その原因究明が望まれている。近年、複数の癌においてスプライシング因子の遺伝子変異が発見され [Nature 478, 64 (2011); Nature 574, 707 (2019)等]、潜在的にスプライシング異常の原因と考えられているが、実態は明らかではない。一方、当研究室では、癌特異的に成熟 mRNA が再びスプライシングされ、異常 mRNA 産物となる「mRNA 再スプライシング現象」を発見した。この現象はゲノム変異の有無に関係せず、異常スプライシング産物が大規模に増加する直接的な原因となりうる [Nucleic Acids Res. 40, 7896 (2012)]。再スプライシングでは成熟 mRNA のエキソンに内在する偽のスプライス部位が利用されるため、多くのエキソンが欠失した異常 mRNA、さらには異常タンパク質が合成される。正常細胞ではこのような現象は決して生じないことから、「完成された成熟 mRNA は再びスプライシングされない仕組み」=「スプライシング完了機構」の存在が示唆される。スプライシング完了機構の実体は未解明であったが、これまでの解析結果からこの機構を制御する因子の同定に成功した。それはスプライシング完了に伴い成熟 mRNA に結合する複合体、EJC (Exon junction complex) である。驚くべきことに、正常細胞で RBM4A と EJC 形成に必須な中核因子 (eIF4A3、Y14、MAGOH) をノックダウンすると、癌特異的であるはずの mRNA 再スプライシングが誘導された。更に癌細胞で各因子を過剰発現させると再スプライシングは抑制された [Int. J. Mol. Sci. 22, 6519 (2021)]。つまり正常細胞では RBM4A、及び EJC から構成されるスプライシング完了機構が mRNA 再スプライシングを抑制し、癌細胞ではその機構が破綻するため、再スプライシングが生じることが想起された。これに加えて

(1) 再スプライシングによる癌における大規模なトランスクリプトーム異常の詳細

(2) スプライシング完了機構の実体と、癌ではなぜ破綻しているのか？

を知ることが出来れば、癌における再スプライシングの生理的重要性が明確になり、加えて再スプライシングを標的とした癌治療研究への基盤となる。

2. 研究の目的

本研究は「学術的問い」を解明し、癌治療への基盤を構築するため、以下の実施を目的とした。

(1) 再スプライシング抑制因子として発見した eIF4A3 をノックダウンした細胞からトランスクリプトーム解析を行い、再スプライシング現象に共通して生じる原理を見出す

(2) 再スプライシング抑制因子がどのようにしてスプライシング完了機構に働くかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 再スプライシングはがん悪性度によって生じる度合いが変化し、がん培養細胞で顕著に観察できる細胞は限られている。その中でもこれまでに発見された TSG101 の再スプライシングが比較的観察できる MCF7 細胞を用いて eIF4A3 をノックダウンし、トランスクリプトーム解析を行った。

(2) 再スプライシングにおいて、EJC 中核因子 (eIF4A3、Y14、MAGOH) とそれに相互作用する因子が再スプライシングに関わるかを明らかにするため、これらの因子を標的にしたノックダウンを行い、影響を観察した。加えて再スプライシング抑制に EJC 中核因子の結合が直接的に重要であるかを判断するために、再スプライシングを生じる転写産物からミニ遺伝子を作成し、このミニ遺伝子へ強制的に EJC 中核因子を結合させることでスプライシング完了機構への重要性を検証した。

4. 研究成果

(1) 再スプライシング産物を発見するためのパイプラインの作成が困難であり、期待したよりも eIF4A3 ノックダウン細胞から再スプライシング産物を発見することはできなかった。再スプライシング産物は通常のスプライシング産物には見られないエキソンを多く含むリアット産物を構成することがわかっている。そこで、トランスクリプトーム解析に加え、リアット構造を解析するためのトランスクリプトーム解析を準備中である。この一方で、エキソトロンと呼ばれる、通常はスプライシングされないエキソン内の配列における、異常スプライシングが新規に多数検出された。そこで EJC 複合体によるスプライシング完了機構が再スプライシングだけでなく、エキソトロンスプライシングの抑制にも重要であるという新しい知見を得ることができた。

(2) EJC 中核因子は細胞核、細胞質の両方にわたって様々な因子と相互作用して機能する。そこで、これらの因子それぞれについてノックダウンを行い、再スプライシングへの寄与を検証した。結果、再スプライシング抑制には EJC 中核因子が最も重要であることが示唆された。ついでいくつかの再スプライシング産物を標的にしてミニ遺伝子を作成し、内部遺伝子と同様の共同を示すミニ遺伝子を 1 つ得た。このミニ遺伝子は通常、再スプライシングを受けるが、EJC 中核因子を結合させると、再スプライシングが抑制されることを見出した。現在これらの成果をまとめたものを論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Otani Yuta, Fujita Ken-ichi, Kameyama Toshiki, Mayeda Akila	4. 巻 22
2. 論文標題 The Exon Junction Complex Core Represses Cancer-Specific Mature mRNA Re-splicing: A Potential Key Role in Terminating Splicing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6519 ~ 6519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22126519	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 Fujita Ken-ichi, Ito Misa, Irie Midori, Harada Kotaro, Fujiwara Naoko, Ikeda Yuya, Yoshioka Hanae, Yamazaki Tomohiro, Kojima Masaki, Mikami Bunzo, Mayeda Akila, Masuda Seiji	4. 巻 15
2. 論文標題 Structural differences between the closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, fashion distinct functional apo-complexes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-44217-8	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 Fujita Ken-ichi, Yamazaki Tomohiro, Mayeda Akila, Masuda Seiji	4. 巻 703
2. 論文標題 Terminal regions of UAP56 and URH49 are required for their distinct complex formation functioning to an essential role in mRNA processing and export	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149682 ~ 149682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149682	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田賢一, 増田誠司, 前田明
2. 発表標題 Exon Junction Complex (EJC) triggers compacted mRNP structure that represses cancer-associated aberrant splicing in exon (exonic intron)
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ken-ich Fujita, Yuta Otani, Toshiki Kameyama, Peter Venhuizen, Maria, Kalyna, Akila Mayeda
2. 発表標題 EJC CORE-TRIGGERED COMPACTED mRNP STRUCTURE REPRESSES CANCER-SPECIFIC SPLICING IN EXITRON
3. 学会等名 EUKARYOTIC mRNA PROCESSING (国際学会)
4. 発表年 2023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

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