

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：33916
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2011
 課題番号：23651198
 研究課題名（和文） 癌細胞における成熟 mRNA 再スプライシングによって生じる異常転写産物の網羅的探索
 研究課題名（英文） Exhaustive screening of aberrant transcripts made by mature mRNA re-splicing in cancer cells
 研究代表者
 亀山 俊樹（KAMEYAMA TOSHIKI）
 研究者番号：60298544

研究成果の概要（和文）：

イントロンの長さは 100 塩基以下のものから数十万塩基にも及ぶ巨大なものまで多様である。従ってスプライシング反応のイントロンが切出される際に生じる副産物<投縄状 RNA 中間体>の大きさもまた多様である。次世代シーケンサーを用いた癌細胞由来投縄状 RNA スプライシング中間体の網羅的な配列決定には、様々なサイズの投縄状 RNA から高品質のライブラリー作製が必須である。しかしながら特に巨大な投縄状 RNA は生化学的にも物理的にも壊れやすく、高品質の投縄状 RNA を精製することが非常に困難であった。様々な RNA 抽出法を試した結果、ゲノム DNA 抽出操作と同様全ての操作に物理的にマイルドな処理を行うことが重要であった。今回直面し解決した問題点に留意しながら現在高品質投縄状 RNA 中間体ライブラリーの作製を行っている。

研究成果の概要（英文）：

The length of the intron is widely diverse from under 100 nucleotides to hundreds of thousands of nucleotides. Therefore, the lariat RNA intermediates, a by-product of splicing reaction, have various sizes. To sequence lariat RNA intermediates from cancer cells exhaustively using next generation sequencer, construction of high quality library from various size lariat RNA is essential. However, purification of high quality lariat RNA is very difficult because large lariat RNAs break easily biochemically and physically. We tested some RNA purification methods, and as a result, we find that handling very mildly during RNA purification like genomic DNA purification is very important for high quality lariat RNA purification. Now, we are trying to construct high quality lariat RNA library paying attention to this point.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：異常スプライシング、成熟 mRNA 再スプライシング、投縄状 RNA 中間体、TSG101 遺伝子、FHIT 遺伝子、RNase R、RNA 抽出法

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム、プロテオーム解析技術の進

歩により、癌細胞では正常細胞で見られないスプライシング変化が多く見られることが明らかとなっている。癌細胞に起こるスプラ

イシング変化は、感度・特異性の高い癌診断マーカーや副作用の少ない抗癌剤開発の一助となることが期待される。

1997年に異なる研究室から乳癌や前立腺癌、肺癌など多様な癌細胞において癌感受性遺伝子 TSG101 の異常転写産物が発現しているという報告がなされた。我々は最近、この TSG101 遺伝子の異常転写産物が、成熟 mRNA が再びスプライシングされてしまうということが癌細胞で起きてしまうことに由来するという事実を発見した。この再スプライシング現象の証明において、我々は RNase R を用いてエクソンの配列のみからなる投縄状 RNA スプライシング反応中間体の存在を厳密に確かめることによって示した。

2. 研究の目的

この再スプライシング現象の発見は蛋白質合成の鋳型としての mRNA の品質管理上以下の2点において非常に重要と考えられた。癌細胞特異的に再スプライシングが起きることから、①正常細胞で働く未知の再スプライシングを抑制する機構すなわち『スプライシング反応停止機構』が癌細胞で破綻しているということが示唆される。さらに、癌細胞でスプライシング反応停止機構が破綻しているならば、②mRNA上に存在する潜在的なスプライス部位をもちいて、多くの遺伝子で成熟 mRNA の再スプライシングが起きている可能性がある。

本研究ではこの作業仮説に立脚し、特に②の多くの遺伝子で成熟 mRNA の再スプライシングが起きている可能性に焦点を絞り、癌細胞特異的再スプライシングをうける遺伝子を次世代シーケンズにより網羅的に探索する。各候補遺伝子が実際に再スプライシングを受けているか否かは RT-PCR によって確認する。また、再スプライシングを受ける遺伝子の網羅的探索に当たり、微量且つ特殊な（環状）構造を持つ RNA の次世代シーケンズという新手法開発も必須であり、その手法開発自体が主要な目標でもある。

3. 研究の方法

まず、第一に癌細胞で異常スプライシングを起こす遺伝子をデータベース上で検索し、その遺伝子が再スプライシングを受ける可能性があるか否か確認を行う。

さらにその上で、網羅的な探索を行う。

再スプライシングでは一旦正常な成熟 mRNA が形成されてから異常スプライシング産物が生成される。従って、普通のトランスクリプトーム解析を行った場合、異常転写産物は量的にも多い正常 mRNA に隠されてしま

う可能性がある。そこで我々はスプライシング反応特異的な投縄状 RNA 中間体の網羅的スクリーニングを行うことで特異的に異常産物を捕まえられるのではないかと考えた。全 RNA を RNase R 処理することによって線状の RNA は全て分解され投縄状 RNA の環状部分のみが残存する（図1）。既に我々はこの特異的投縄状 RNA 中間体の実在によって癌細胞においてスプライシング反応が停止せず

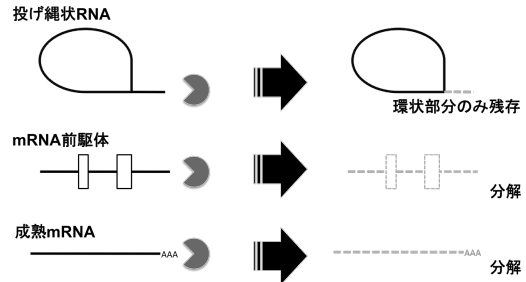


図1 RNase R は投縄状 RNA を濃縮する

RNase R は線状の RNA (mRNA 前駆体、成熟 mRNA、リボソーム RNA、tRNA 等) を分解する。投縄状 RNA の環状部分は RNase R による分解を受けずに残存する

成熟 mRNA が再スプライシングを受けてしまう、という全く新しい概念を証明した。

もし、TSG101 遺伝子と同様、癌細胞において多くの遺伝子が再スプライシングを受ける可能性があるならば、それらの遺伝子についてもエクソンの配列のみから成る投縄状 RNA 中間体が存在するはずである。

癌細胞の全 RNA を RNase R 処理し出来た投縄状 RNA ライブラリーを次世代シーケンサーによって網羅的に配列決定し、照合するデータベースを Reference mRNA Sequence (refseq_rna) Database を用いて解析すればイントロン投縄状 RNA の配列を無視し再スプライシングに由来するエクソン投縄状 RNA だけを特異的にとらえることが出来ると考えられる。

4. 研究成果

データベース検索から癌抑制遺伝子

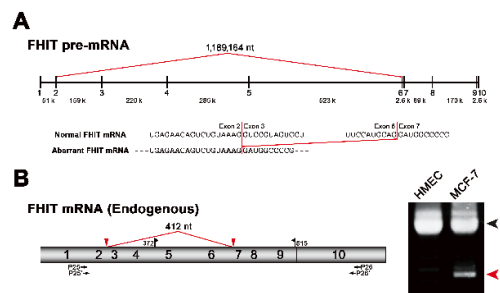


図2 FHIT 異常スプライシングの様式

Fragile Histidine Triad (FHIT)が様々な癌細胞において異常スプライシングされ、これも再スプライシングを受ける遺伝子の候補ではないかと予測された(図2)。FHIT 遺伝子は様々な癌細胞において非常に多種多様な異常転写産物が観察されるが、最も主要な異常転写産物の様式は図2に示す通り、Exon3 から Exon6 がスキップする。Intron2 から Intron6 は全て数十万塩基と非常に長いイントロンであり、一度にエクソンスキッピングが起きるとすると1,189,164塩基もスキップしなければならない、非常に効率が悪いことが予想される。

FHIT mRNA の配列を確認したところ、Exon3 の5'末端の配列がGU、Exon6の3'末端がAGであり、通常構成的スプライシングが生じることによってExon2-Exon3の連結部位に新たな5'スプライス部位が再生され、Exon6-Exon7連結部位に3'スプライス部位が再生されるという様式で再スプライシングされるのではないかと考えられた。

TSG101 遺伝子の時と同じく、イントロンの無い FHIT cDNA を強制発現させ内在性 FHIT と同様のスプライス部位を用いた異常スプライシングが生じる事を確認した。

さらに、TSG101 と同様 RNase R 処理によって投縄状 RNA の存在を確かめる実験を行ったところ、TSG101 の時以上に期待した結果がなかなか得られなかった。すなわち本来 RNase R 処理を行っても必ず検出出来るはずのイントロン由来投縄状 RNA すら非常に検出困難であった。

これはひとえに intron2 が約 159,000 塩基、intron3 が約 220,000 塩基、intron4 が約 285,000 塩基、intron5 も約 523,000 塩基と非常に長いためであると考えられた。通常 RNA の精製には酸性フェノールによる激しい処理やフィルターへ結合させ遠心分離を行うなどの処理を必要とする。その際に投縄状 RNA の環状構造にニックなどの切れ目が一カ所でも入ってしまうとその後の RNase R 処理により完全に分解されてしまう。

この問題点を解決するために、RNA 抽出操作の際、激しくシェイク操作を行うところ、ゲノム DNA を抽出する際のように時間をかけてマイルドに行った。また、RNase R 処理も通常2回から3回行い、その間にフェノール抽出とエタノール沈澱操作を行っていたが、酵素反応時間を延長する代わりに途中のフェノール抽出・エタノール沈澱を省略した。

上記の点に注意しながら RNase R 処理したサンプルから RT-PCR を行うことにより、FHIT においてもエクソンの配列のみからなる投縄状 RNA が存在する事の証明を行った(図3)。

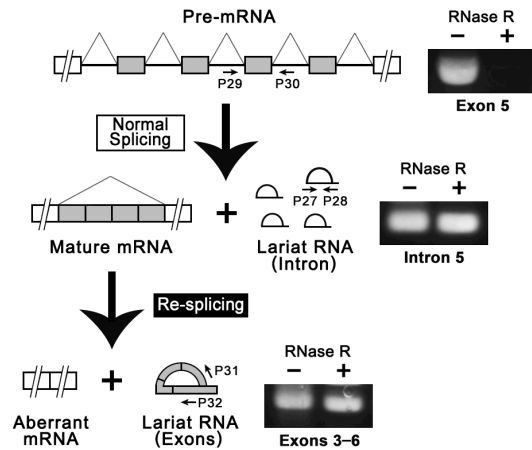


図3 内在性 FHITmRNA の再スプライシングによってエクソン配列からなる投縄状 RNA の存在検証

研究開始当初は次世代シーケンサーにかけるに相当する高品質の投縄状 RNA ライブラリーについては、合成 cDNA が極端に短くないこと、mRNA や pre-mRNA 等線状 RNA の混入がないこと、PCR 等による増幅操作により出来たライブラリーに偏りが無いことの3点のみ満たしていればよいと考えていた。しかしながら、そもそも、ヒトのイントロンの場合 100base 以下の短い物から 100kb を超える長大な物までその長さのバリエーションは大きい。mRNA についても数十キロ塩基と非常に長いものも存在する事から、投縄状 RNA の大きさも、小さなものから非常に大きなものまで多様であることが予想される。

精製した投縄状 RNA 自体の品質も高品質のものを準備しなければならない。この点は通常の次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析で分解のない高品質の total RNA を準備しなければいけないことと同様である。

今回の FHIT 遺伝子を用いた巨大イントロン投縄状 RNA の解析から、当初予想していなかった困難に直面したが、ゲノム DNA 抽出操作と同様マイルドに抽出することで巨大な投縄状 RNA をより完全な状態で精製するというブレークスルーをみいだした。さらに RNA 抽出に関しても酸性フェノールを用いることなく、Proteinase K 処理と時勢ビーズを用いることによってさらに完全な RNA 標品を精製する事も出来る様になった。

現在その手法を用いて高品質投げ縄状 RNA 中間体ライブラリーの作製を鋭意行っているところである。

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 2 件)

① Toshiki Kameyama, Hitoshi Suzuki and Akila Mayeda

Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Research*, 2012, in press. 査読有

② Toshiki Kameyama, Fumio Maysushita, Yuzo Kadokawa and Tohru Marunouchi

Myt/NZF family transcription factors regulate neuronal differentiation of P19 cells. *Neuroscience Letters*, 497, (2011), 74-79. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Toshiki Kameyama and Akila Mayeda

Re-splicing of mature mRNA in cancer cells- Two-step splicing mechanism to activate far distant alternative splice sites.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting

“Eukaryotic mRNA Processing”

平成 23 年 8 月 23 日～27 日

米国 Cold Spring Harbor Laboratory

② Toshiki Kameyama and Akila Mayeda

Aberrant Re-splicing of Mature Spliced mRNA Discovered in Cancer Cells: Considering Its Generality And Significance.

RNA2011, 16th Annual Meeting of the RNA Society.

平成 23 年 6 月 14 日～18 日.

京都

[その他]

ホームページ等

Researchmap に登録し随時更新する他、下記ホームページにおいて、研究の概要、研究成果の発表等を公開している。

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~tkame>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀山 俊樹 (KAMEYAMA TOSHIKI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：60298544

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

