

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713027

研究課題名(和文)非コードRNA(T-UCR)を介した細胞老化と大腸がんの悪性化の調節機構

研究課題名(英文)Transcribed-ultraconserved regions regulate cellular senescence and proliferation of colon cancer.

研究代表者

桑野 由紀(KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00563454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物のゲノムにのみ100%保存された、超保存領域より転写される機能性RNA(T-UCR)の発現異常は、がん化など細胞内恒常性の破綻の新たなリスクファクターとなる可能性がある。

本研究では、選択的スプライシング因子SR様タンパク質の一つTransformer 2-beta(TRA2B)遺伝子領域より生成されるT-UCR、TRA2-4を介した大腸がん悪性化メカニズムの解明を目的とした。大腸がん細胞の核に高発現するTRA2-4はSp1を阻害することでp21を減少させ、細胞老化が低下し細胞増殖を亢進させた。T-UCRはステムループを形成し配列依存的に大腸がん悪性化に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Ultraconserved regions (UCRs) are >200-bp genomic segments with perfect human-to-rodent sequence identity. Transcribed UCRs constitute a new category of noncoding RNAs whose functions remain poorly understood.

The transformer 2 (TRA2B) exon 2 has premature stop codons, whereas an exon 2-containing splice variant (TRA2-4) was expressed preferentially in the nuclei of human colon cancer cells. TRA2-4 knockdown stimulated CDKN1A transcription and increased p21, resulting in the appearance of senescent cells. TRA2-4 interacted with Sp1 through a Sp1-binding sequence (485-GGGG-488) in a stem-loop structure of exon 2. These results suggest that TRA2-4 may sequester Sp1 from occupying promoters of target genes including CDKN1A, promoting cell growth by interrupting the senescence-related gene expression program.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA RNAプロセッシング 大腸がん 超保存領域

1. 研究開始当初の背景

RNA はゲノム DNA の 90%以上の領域から転写されるが、その過半数はタンパク質をコードしない非コード RNA であることが近年明らかになっている。本研究では、高等生物のゲノムに 200 bp 以上連続して 100%保存された超保存領域 (ultraconserved region: 以下 UCR) より転写される、新規の機能性非コード RNA (Transcribed (T)-UCR) に着目した。超保存領域は、マウス以上の哺乳類に進化の過程でトランスポゾンとして組み込まれ、ヒトゲノム上に 481 カ所存在する。興味深いことに、超保存領域の多くは選択的スプライシング調節因子をコードする遺伝子群 (Serine/Arginine-splicing factor: SRSF ファミリー) の遺伝子領域に分布しており、進化の過程で、遺伝子の多様性や新たな恒常性維持機構の獲得に寄与したと考えられるが、その生理学的意義は未だ不明である。

2. 研究の目的

高等生物のみがコードする超保存領域より転写される機能性 RNA (T-UCR) の発現異常や蓄積は、がん化など細胞内恒常性の破綻の新たなリスクファクターとなる可能性がある。本研究では、T-UCR の生理的意義の解明を目指し、選択的スプライシング因子をコードする Transformer 2-beta (以下 TRA2B) 遺伝子より生成される T-UCR、TRA2β4 RNA を介した大腸がん悪性化メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) T-UCR 安定過剰発現株の構築

Wako 社の pEB-multi ベクターを用い、プラストサイジン S をセレクションマーカーとして、SRSF 遺伝子より転写される T-UCR の安定過剰発現 HCT116 細胞株を樹立した。さらに、樹立した細胞株を用いヌードマウスに移植し、腫瘍形成能の判定を行った。

(2) 全転写産物量の網羅的な解析

TRA2β4 安定過剰発現細胞における、遺伝子発現変化を Agilent テクノロジー社製 whole human genome array システムを用いて、同定・統計学的解析を行った。得られたデータは Gene spring GX12 (Agilent 社) および Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen 社) パスウェイ解析ソフトを用い統計学的かつ生理的・機能的な意味づけを行った。

(3) T-UCR に直接結合する因子の同定

タンパク質に非翻訳であると考えられる T-UCR 転写産物が、機能性 RNA として働いている可能性が示唆される。そこで、UCR 領域を *in vitro* 転写させビオチン化した RNA 産物をプローブとして用い、結合タンパク質を

RNA-タンパク質免疫沈降し、精製した結合タンパク質を質量分析により網羅的に解析した。その結果、TRA2β4 の超保存領域に結合する 20 個の RNA 結合タンパク質を同定した。さらに、biotin-pull down アッセイと特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により、個々のタンパク質の結合のバリデーションを行った。これらの結合タンパク質は、すべて核内 RNA 結合タンパク質であった。

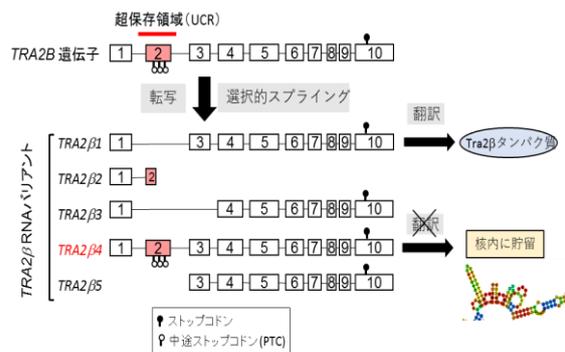
(4) T-UCR の機能配列の同定

RNA 構造予測ソフトウェアを用い、超保存領域内におけるステムループ形成等の 2 次構造を検討した。さらに、Mutagenesis kit を用い複数塩基を変換し 2 次構造形成を破壊した変異型 TRA2β4 を発現した細胞株を樹立した。野生型細胞株と比較し、抗癌剤耐性能、足場非依存性増殖、スクラッチアッセイ、浸潤能などのがん悪性化のフェノタイプを観察し、T-UCR のもつ生理作用が RNA 配列によるものであることを明らかにした。さらに、T-UCR の機能配列を特異的に認識可能なビオチンまたは蛍光 *in situ* hybridization 用 RNA プローブの設計を行い、大腸がん組織検体を用いた蛍光組織染色を行った。

4. 研究成果

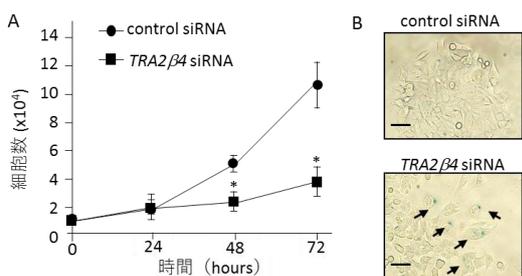
(1) TRA2β4 はエクソン 2 に超保存領域がコードされているが、中途ストップコドンを含むため正規 Tra2β タンパク質に翻訳されない (図 1 参照)。しかしながら、シクロヘキシミド処理や NMD 酵素本体 UPF1 のノックダウンによって NMD による RNA 分解を阻害しても TRA2β4 レベルは変化しないことから、NMD による分解を免れていることを見出した。さらに、RNA-蛍光 *in situ* hybridization において、TRA2β4 は主に核に局在することで、細胞質における NMD による RNA 分解を免れている可能性が示唆された。

また、大腸がん細胞において TRA2β1 アイソフォームも高発現しており、翻訳された正規の Tra2β タンパク質が高発現がし、細胞死抵抗性に寄与することを見出した (*Cell Death & Diff* 2015)。



(図 1) TRA2B 遺伝子より生成される RNA バリエーションの模式図

(2) human 大腸がん組織検体 24 例をそれぞれの正常部における TRA2 β RNA の発現をリアルタイム PCR により比較したところ、大腸がん部において非癌部に比較し、TRA2 β が有意に高発現していた。さらに、大腸がん細胞株 HCT116 において siRNA を用いて発現を減少させると、細胞増殖の低下及び β ガラクトシダーゼ陽性の細胞老化の誘導が確認された (*Oncogenesis*, 2016) (図 2、矢印)。さらに、TRA2 β ノックダウン細胞においては、p53 非依存的に、細胞周期インヒビターのひとつである p21 の発現が増加していた。



〔図2〕 大腸がん細胞株におけるTRA2 β ノックダウンの影響

(3) TRA2 β による細胞老化調節の分子メカニズムとして、① TRA2 β はエクソン 2 の二次構造 (ステムループ構造) を介して転写因子 Sp1 に結合すること (図 3)、② Sp1 をトラップすることで、プロモーターに存在する Sp1 認識サイトへの結合を阻害すること、③ TRA2 β は Sp1 の細胞老化調節因子 p21 (CDKN1A 遺伝子) のプロモーターへの結合を阻害すること、を初めて見出した。

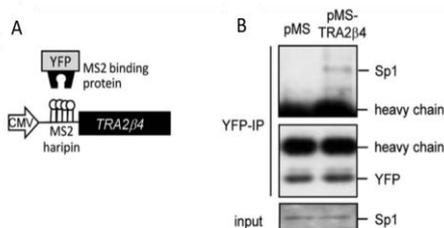


図 3. MS2を用いた細胞内RNAラベリング (A)とSp1とTRA2 β の結合 (B)

これらの結果より、大腸がんで高発現する TRA2 β は細胞周期サイクリンインヒビターである p21 を減少させ、細胞老化を低下させ細胞増殖を亢進させる可能性が示唆された (*Oncogenesis*, 2016)。

(4) TRA2 β 遺伝子より T-UCR である TRA2 β 4 アイソフォームは、大腸がん細胞において酸化ストレス依存的に生成される。そのメカニズムの一つとして、RNA 安定化タンパク質である Hu antigen R (HuR/ELAV1) がエクソン 2 に結合し、エクソンのインクルージョンを促進させること、さらに、その反応は HuR の

リン酸化依存的であることを見出した (*Mol Cell Biol.*, 2014)。

一方で、SRSF3 遺伝子より生成される中途ストップコドンを含んだ RNA isoform は、大腸がん細胞において酸化ストレスにより誘導され、C末が短縮したタンパク質 (SRSF3-truncated (TR)) を生成することを見出した (*Am J Physiol Cell Physiol.*, 2014)。この SRSF3-TR タンパク質は核内局在に必要な RS ドメインを欠損しているため、細胞質にも diffuse に局在した。

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 7 件)

1. Kajita K, Kuwano Y, Satake Y, Kano S, Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing Transformer 2 β 4 controls senescence of colon cancer cells. *Oncogenesis*, 5:e213. 2016. 査読有 doi: 10.1038/oncsis.2016.18.

2. Saijo S, Kuwano Y, Masuda K, Nishikawa T, Rokutan K, Nishida K. Serine/arginine-rich splicing factor 7 regulates p21-dependent growth arrest in colon cancer cells. *J Med Invest* 2016;63(3-4):219-226. 査読有 doi: 10.2152/jmi.63.219.

3. Kuwano Y, Nishida K, Akaike Y, Kurokawa K, Nishikawa T, Masuda K, Rokutan K. Homeodomain-Interacting Protein Kinase-2: A Critical Regulator of the DNA Damage Response and the Epigenome. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016;17(10): e1638. 査読有 doi: 10.3390/ijms17101638.

4. Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Satake Y, Akaike Y, Fujita F, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Transformer 2 β and miR-204 regulate apoptosis through competitive binding to 3' UTR of BCL2 mRNA. *Cell Death Differ.* 22(5):815-825. 2015 査読有 doi: 10.1038/cdd.2014.176

5. Akaike Y, Kuwano Y, Nishida K, Kurokawa K, Kajita K, Kano S, Masuda K, Rokutan K. Homeodomain-interacting protein kinase 2 regulates DNA damage response through interacting with heterochromatin protein 1 γ . *Oncogene* 34(26):3463-3473. 2015 査読有 doi: 10.1038/onc.2014.278.

6. Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Kajita K, Kurokawa K, Satake Y, Shoda

K, Imoto I, Rokutan K. HuR regulates alternative splicing of the TRA2 β gene in human colon cancer cells under oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 34(15):2857-2873, 2014 査読有
doi: 10.1128/MCB.00333-14

7. Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Yamagishi N, Kajita K, Tanahashi T, Rokutan K. Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene.* 3(11):1407-1417, 2014 査読有
doi: 10.1038/onc.2013.86

[学会発表] (計 11 件)

1. Kuwano Y, Satake Y, Nishikawa T, Fujita M, Saijo S, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing transformer 2 β 4 associates with nucleolin and regulates cellular proliferation. *Protein-RNA Interactions: Keystone symposia (Fairmont Banff Springs, Banff, Canada)*, 2017 年 2 月 7 日

2. Saki Saijo, Kensei Nishida, Tatsuya Nishikawa, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan, A novel role of serine/arginine-rich splicing factor 7 in cell cycle progression, *Keystone Symposia Conference; Protein-RNA Interactions: Scale, Mechanisms, Structure and Function of Cording and Noncording RNPs (Fairmont Banff Springs, Banff, Canada)*, 2017 年 2 月 7 日

3. 桑野由紀, 西田憲生, 西川達哉, 六反一仁, Serine/arginine-rich スプライシング因子 SRSF を介したエピジェネティック調節機構、シンポジウム「エピジェネティクスを制御するクロマチン構造と機能」第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)、2016 年 12 月 2 日

4. 西川達哉, 桑野由紀, 小玉美幸, 西條早希, 田中裕基, 板井美樹, 藤田絹代, 西田憲生, 六反一仁, Ultraconserved region を内在する *TRA2 β 4* の発現制御と大腸がんの細胞増殖メカニズムの解明、第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)、2016 年 12 月 2 日

5. 小玉美幸, 桑野由紀, 佐竹 譲, 狩野静香, 藤田絹代, 板井美樹, 西田憲生, 六反一仁 Ultraconserved region を内在する *TRA2 β 4* を介した細胞周期調節メカニズムの解析、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートア

일랜드、兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 3 日

6. 佐竹 譲, 桑野由紀, 狩野静香, 藤田絹代, 板井美樹, 田中裕基, 西田憲生, 六反一仁 *TRA2 β 4* と nucleolin の相互作用を介した大腸癌細胞増殖メカニズムの解明、第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 3 日

7. Kuwano Y, Kajita K, Kano S, Satake Y, Fujita K, Itai M, Nishida K, Rokutan K. Ultraconserved region-containing transformer 24 inhibits senescence of colon cancer cells. *Cell symposia-Human genomics (A Star, Singapore)*, 2015 年 11 月 8 日

8. 桑野由紀, 佐竹 譲, 狩野静香, 藤田絹代, 西田憲生, 六反一仁 新規非コード RNA *TRA2 β 4* を介した大腸がん悪性化の分子基盤、第 10 回臨床ストレス応答学会 (東京農工大学、東京都小金井市)、2015 年 11 月 7 日

9. Kano S, Nishida K, Kuwano Y, Takuya, Rokutan K. Analysis of functional transcribed-ultraconserved regions in SR protein family. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic mRNA processing (Cold Spring Harbor, U. S. A)*, 2015 年 8 月 19 日

10. Nishida K, Saijo S, Kano S, Naruto T, Kuwano Y, Rokutan K. Analysis of 3 end processing factors expression during epithelial-mesenchymal transition. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic mRNA processing (Cold Spring Harbor, U. S. A)*, 2015 年 8 月 19 日

11. Kuwano Y, Kajita K, Satake Y, Kurokawa K, Yamagishi N, Akaike Y, Honda M, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. Transformer 2 and miR-204 regulate cell death through competitive binding to 3 UTR of *BCL2* mRNA. *Cell Symposia Regulatory RNAs (San Francisco, U. S. A)*, 2014 年 10 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：00563454