

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870308

研究課題名(和文) STAT3スプライシングアイソフォームの発現制御、及びその生理機能に関する研究

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of STAT3-alternative splicing and the physiological functions of STAT3-splicing isoforms

研究代表者

正木 聡 (Masaki, So)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70711977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生体応答に関連するSTAT3は、 α タイプと β タイプの2つのスプライシングアイソフォームを持つことが知られているが、それらの発現を調節するスプライシング制御機構やアイソフォーム間の機能差は十分に解明されていなかった。

本研究では、STAT3の選択的スプライシングの制御機構をケミカルバイオロジーの手法によって解明するため、適切な実験系を構築し、化合物スクリーニングを実施した。その結果、 β タイプのスプライシングを誘導する候補化合物を得た。また、細胞内で α タイプは β タイプとは異なる制御を受けることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：STAT3 has been recognized as a modulator related various biological responses. STAT3 is known to undergo alternative splicing, and their “alpha” and “beta” splicing isoforms likely have different roles. However, the mechanism of STAT3-alternative splicing remains unclear.

In this study, to unveil the molecular mechanisms of alternative splicing of STAT3 and identification of the chemical compounds that control the balance of splicing isoforms, we established the methodology of elucidation of splicing mechanisms based on the screening to identify small chemical compounds that switch STAT3-alternative splicing patterns. As results, we obtained drug candidates of β -type-inducing factors and a stir, directly or indirectly, to “splicing black box”.

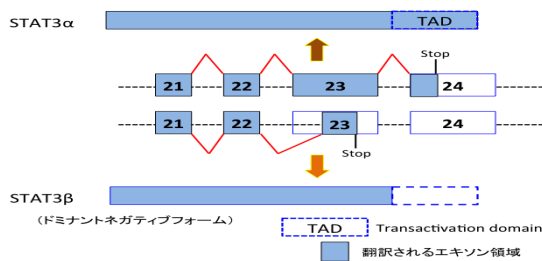
Regarding the difference of physiological functions between STAT3 α and β in cells, we found out that STAT3 α is regulated in a different manner from STAT3 β .

研究分野：シグナル伝達を中心とした分子生物学

キーワード：スプライシング シグナル伝達 スクリーニング 化合物ライブラリー

1. 研究開始当初の背景

多くの生体応答に関連する Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)は、腫瘍組織や癌細胞において恒常的に活性化され、その活性は癌の悪性化と相関することが広く知られている。STAT3 には、現在までよく研究されている STAT3 と、活性を有しないと予想されている STAT3 の 2つのスプライシングアイソフォームの存在が知られている(図1)。しかしながら、それらの発現を調節するスプライシング制御機構やアイソフォーム間の機能差は十分に解明されていない。タイプはドミナントネガティブアイソフォームと報告されており、タイプの活性を抑制する。その一方で、transactivation domainを欠失しているタイプも DNA 結合能を有しており、単にタイプと拮抗するだけでなく、タイプ固有の転写因子としての機能を有する可能性が幾つかの報告で示唆されているが、その詳細は解明されていない。



(図1)

STAT3 のように生体応答を担う分子にはスプライシングバリエーションを持つものが少なくない。スプライシングバリエーション間で異なった機能を持つ分子、細胞が癌化すると発現するスプライシングバリエーションの割合が変化する分子など、同一遺伝子から生じる転写産物の機能は精妙かつ複雑に生体を制御している。これらのことから、STAT3 の選択的スプライシングを制御するメカニズムを解明することや、そのバランスを調節する因子を同定することは、高等真核生物の基本原則の解明のみならず、疾患とスプライシング変

化との観点から、新たな治療標的を創出できる研究基盤となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は以下の3点を主な研究目的として設定した。

(1) ケミカルバイオロジーの手法を用い、タイプからタイプへのスプライシングスイッチの機構を解明する。また、RNA 結合タンパク質の cDNA ライブラリーを用いて、STAT3 のスプライシングスイッチを担う分子を同定する。

(2) タイプへのスプライシングスイッチを優位にすることで、タイプの活性によって引き起こされる癌の悪性化に寄与するシグナル伝達を抑制できるか検証し、スプライシングスイッチを起点するコンセプトに基づいた治療標的を見いだす。

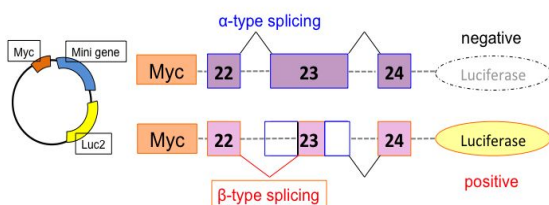
(3) STAT3 とのアイソフォーム間の生理的意義、及び細胞内制御の相違を解析する。STAT3 の生理機能の差異を解析することで、スプライシングアイソフォームが有する各々の機能バランスの総合的な結果として STAT3 の機能が発現するという、新しい概念を実証することにつながる。

これら(1)～(3)に示した課題にアプローチすることで、STAT3 のスプライシングアイソフォームが生じる反応機構から個々の機能差までを解析し、包括的に「STAT3 のスプライシング」の生理的意義を解明することが目的である。

3. 研究の方法

目的達成の律速段階となるのは、簡便かつ効果的にタイプとタイプの発現量比を検出することである。そこで申請者は、STAT3 のタイプ、タイプを決定させるスプライシング反応を受けるゲノム配列の前後を抜き出した“ミニ遺伝子”を作製した。ミニ遺伝子は内在性 STAT3 と同様のスプライシング

反応を受け、タイプとタイプで配列が異なる部位を中心とした転写産物を発現させることができるものである。このミニ遺伝子を網羅的スクリーニングのために応用する。STAT3 ミニ遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結させ、タイプのスプライシング反応ではルシフェラーゼをコードし、タイプの場合は途中にストップコドンが入りルシフェラーゼをコードしないように遺伝子操作したベクター (STAT3 mini gene-Luc) を作製する(図2)。このSTAT3 mini gene-Lucを安定的に発現した細胞株を樹立し、網羅的スクリーニングに用いることで、STAT3 mRNAのスプライシングに影響を及ぼす因子を効率的にスクリーニングすることが可能となる。



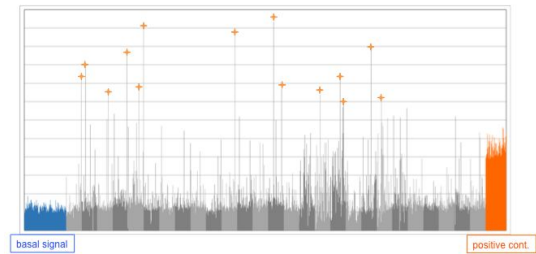
(図2)

また、各アイソフォーム間の機能差の解析については、タイプ、タイプが発現ベクターの作製など、細胞内の / 比を変化させるための分子生物学的解析ツールを種々作製し、解析に適切な細胞に導入することでアイソフォームが存在する生物学的意義を解析する。

4. 研究成果

研究方法の項で記述したように、タイプからタイプへのスプライシングスイッチを簡便に検出するレポーターシステムを作製し、網羅的スクリーニングに供する実験系を確立した。化合物ライブラリーやRNA結合タンパク質ライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、これらの結果から、タイプへのスプライシングを増加させる化合物やRNA結合タンパク質をスプライシング調節因

子の候補として得ることができた(図3)。



(図3 S.Masaki et al. unpublished data)

今後、スクリーニングで陽性であった化合物の標的タンパク質を同定するなど、スクリーニング結果を詳細に解析・検討することで、STAT3のスプライシングスイッチの分子機構に迫り、内在性STAT3の / 比を変化させることで、シグナル伝達等の生体応答に変化が生じるか検証する。

STAT3のスプライシングアイソフォーム間(タイプとタイプ)の機能差に関する解析については、細胞内でタイプはタイプとは異なった制御を受けることが判明した。この制御機構の相違がどのような生理的機能と関連しているのか、2つのスプライシングアイソフォームが存在する意義と関連付けて、さらに詳細に検討する予定である。

細胞内の / 比を変化させた状態での解析については、発現ベクターやsiRNAを組み合わせた方法、タイプを安定的に強発現させる細胞株の樹立を試みたが、良好な結果は得られなかった。生体においてSTAT3は重要な機能を有する分子であるため、目的の解析を行うにあたり、シンプルな発現ベクター導入による方法では、適切な発現レベルに調節できなかったこと、また、安定発現株では過剰なSTAT3の活性を抑制させるようなフィードバックが引き起こされている可能性が推測された。今後は、レンチウイルスによる遺伝子発現システム、Tet-ONシステムによる遺伝子発現調整、CRISPR-Casによるゲノム編集技術などを組み合わせることで、細胞内STAT3 / 比を適切に調節できる実験系の構築を目指したい。

本研究は、研究実施計画に則して、STAT3のスプライシングスイッチ機構から各アイソフォームの機能差の解析まで、多面的にアプローチすることができた。2年間の研究期間で得られた重要な知見を学術的成果として論文にまとめるべく、今後も詳細な解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

正木聡

「Chemical biology unveils the RNA splicing mechanism of functional proteins」

The 2nd IFOM-Kyoto University Joint Symposium

2015年10月6～7日

芝蘭会館(京都市)

正木聡

「ケミカルバイオロジーによる機能性分子のスプライシング制御機構の解明」

第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学大会 合同大会(招待講演)

2015年12月1～4日

神戸ポートピアアイランド(神戸市)

正木聡

「A splicing reporter-based method for screening of RNA splicing switch identifies the novel therapeutic targets for tumor-worsening proteins」

Tenth AACR-JCA Joint Conference

“Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics”

2016年2月16～20日

マウイ(アメリカ合衆国)

6. 研究組織

(1)研究代表者

正木 聡(MASAKI, So)

京都大学大学院医学研究科・特定研究員

研究者番号:70711977

(2)連携研究者

片岡 直行(KATAOKA, Naoyuki)

京都大学大学院医学研究科・特定准教授

研究者番号:60346062