

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659370

研究課題名(和文) SRSF遺伝子のPTCバリエントを介した大腸がん悪性化の分子基盤

研究課題名(英文) Oxidative stress-induced PTC variants in colonic cancer cells

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00563454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：選択的スプライシング調節因子SRSF遺伝子群より転写される、premature stop codon (PTC)を含むPTCバリエントRNAの細胞内機能の解析を行った。大腸がん細胞株HCT116において酸化ストレス応答性PTCバリエントの同定、さらにヒト大腸がん組織において高発現するPTCバリエントのスクリーニングを行った。また核内において、PTCエクソンに特異的に結合するRNA bindingタンパク質を質量分析法により網羅的に解析した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant alternative splicing participates in many genetic and acquired diseases including cancer. Oxidative stress specifically facilitated premature stop codon (PTC)-containing isoforms production in colon cancer cell line. Several RNA-binding proteins associated with PTC isoforms and regulated its RNA stability in the nucleus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：選択的スプライシング 中途ストップコドン SRタンパク質 大腸がん

## 1. 研究開始当初の背景

選択的スプライシングは、mRNA 前駆体から成熟 mRNA にプロセスする過程で、エクソンを含む(inclusion)か、あるいはスキップする(skipping)かによって決定される。限られた遺伝子領域から複数の転写産物(RNA)を生成し、生物の多様性を生み出すこの機構は、組織・発達段階特異的であると同時に、環境変化(ストレス)に応答して、極めて広範囲に遺伝子発現プログラムを変化させる。

申請者は、ヒト白血球の選択的スプライシング反応を網羅的に解析し、急性心理的ストレスにより、p53の活性化に必須な領域(exon 63)を欠損した *SMG-1* mRNA バリエーションが生成されることを報告した(*Neurosci Lett* 2011)。また近年、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の選択的スプライシング異常は、細胞のがん化をはじめとして様々な疾患と関連することが報告されている。しかしながら、消化器がんと選択的スプライシングの関連は、未だ十分には明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

選択的スプライシングの主要な調節因子であるヒトのSR (Ser/Arg)タンパク質ファミリー (Ser/Arg-rich splicing factor (SRSF))遺伝子群は多くの組織に恒常的にかつ普遍的に発現しており、発現量だけで組織・病態特異的で複雑なスプライシング反応と疾患の関連性を説明することは難しい。これらの因子をコードする遺伝子ファミリーは共通して途中にストップコドン premature termination codon (PTC)を含んだ転写産物(PTC バリエーション)を生成するが、その細胞内機能は未だ明らかにされていない。本研究では、酸化ストレスによって特異的に誘導される SRSF 遺伝子の PTC バリエーション RNA の新しい細胞内機能と消化管の発がんとの関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) ストレス応答性の PTC バリエーションのスクリーニング

SRSF 遺伝子ファミリーの PTC バリエーション及びレファレンス配列を特異的に認識するプライマーを設計し、酸化ストレス(過酸化水素、UV-C、アルセナイト等)処理による発現変動をリアルタイム PCR 法を用いて解析する。

(2) PTC バリエーションの翻訳効率の解析

中途ストップコドンを含む PTC バリエーションから翻訳されるタンパク質を、特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法、及びリボゾームと RNA の結合を分画するポリゾームプロファイリング法により解析する。

(3) PTC バリエーションと相互作用する因子の同定

PTC バリエーション RNA を *in vitro* 転写を用いてビオチン化ラベルし、磁気アビジンプーズを用いて相互作用する可能性のある RNA 結合タンパク質を、質量分析法により網羅的に解析する。

(4) 大腸癌における PTC バリエーションの発現解析

24例の大腸がん Tissue パネルを用い、SRSF 遺伝子ファミリーの PTC バリエーションの発現量をリアルタイム PCR 法及びノーザンブロット法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(1) ストレス応答性の PTC バリエーションの同定

大腸がん細胞株 HCT116 において 10 種類のヒト SRSF 遺伝子のうち、4 種類の PTC バリエーションが酸化ストレスにより顕著に誘導されることを見出した。さらに、TRA2B 遺伝子は酸化ストレス(アルセナイト・過酸化水素及

びヒートショック)に反応し、プロモーター領域の heat shock element (HSE)を介して転写を活性化することを見出し報告した (*J Gastroenterol.*, 2013)。さらに、TRA2B をノックダウンした大腸癌細胞では、アポトーシスが顕著に誘導されることを見出した (図 1)。

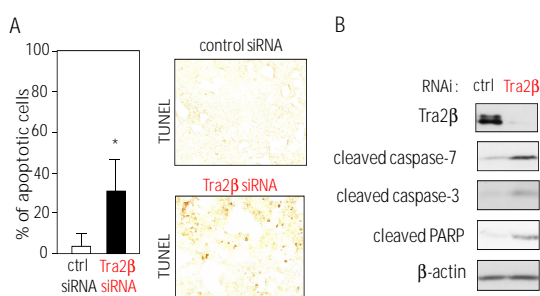


図1. SRスプライシング因子Tra2βをノックダウンした大腸癌細胞では細胞死が誘導される(A: TUNEL染色, B: カスパーゼ活性)

## (2) PTC バリエントより翻訳産物の機能解析

ヒト SRSF3 遺伝子より、酸化ストレスにより選択的に生成される PTC バリエント RNA から翻訳される truncated なタンパク質は、大腸癌細胞において炎症性サイトカインの転写調節に関与した (*Am J Physiol Cell Physiol.*, 2013)。

## (3) PTC バリエントと相互作用する因子の網羅的解析

ビオチンラベル化した PTC バリエントを用いた質量分析法により、PTC エクソンに特異的に結合が認められた 9 種類の核内 RNA 結合タンパク質を同定し、順次ウエスタンブロットにより確認した。

## (4) がん組織における PTC バリエントの発現

ヒト大腸がんパネル及び、大腸がん組織切片を用い PTC バリエントの発現量を正常組織と比較検討した。大腸がん組織においては TRA2b4 RNA を含む数種類の PTC バリエントが有意に発現亢進しており、大腸がん悪性化に

関与する可能性が示唆された (現在論文投稿中)。

## 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 8 件)

1. Kano S, Nishida K, Kurebe H, Nishiyama C, Kita K, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Oxidative stress-inducibly truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 306(3), C250-262, 2013, doi: 10.1152/ajpcell.00091.2013. 査読有
2. Kano S, Nishida K, Nishiyama C, Akaike Y, Kajita K, Kurokawa K, Masuda K, Kuwano Y, Tanahashi T, Rokutan K. Truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 accelerates cell growth through up-regulating c-Jun expression. *J Med. Invest.* 60: 228-235, 2013, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24190040 査読有
3. Honda M, Kuwano Y, Katsuura-Kamano S, Kamezaki Y, Fujita K, Akaike Y, Kano S, Nishida K, Masuda K, Rokutan K. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood. *PLoS One.* 8(10), e75960, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0075960 査読有
4. Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K, Imoto I. NF90 in Posttranscriptional Gene Regulation and MicroRNA Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 14(8):17111-17121, 2013, doi: 10.3390/ijms140817111 査読有
5. Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K. Application of DNA microarray technology to gerontological studies. *Methods Mol Biol.* 1048:285-308. 2013 doi:

- 10.1007/978-1-62703-556-9\_19. 査読有
6. Yamagishi N, Teshima-Kondo S, Masuda K, Nishida K, Kuwano Y, Dang DT, Dang LH, Nikawa T, Rokutan K. Chronic inhibition of tumor cell-derived VEGF enhances the malignant phenotype of colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 13:229. 2013, doi: 10.1186/1471-2407-13-229 査読有
  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;33(11):1407-1417. 2013, doi: 10.1038/onc.2013.86. 査読有
  8. Kajita K, Kuwano Y, Kitamura N, Satake Y, Nishida K, Kurokawa K, Akaike Y, Honda M, Masuda K, Rokutan K. Ets1 and heat shock factor 1 regulate transcription of the Transformer 2 $\beta$  gene in human colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 48(11):1222-1233, 2013 doi: 10.1007/s00535-012-0745-2. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 桑野由紀, 末梢血の遺伝子発現から見たストレス応答の分子基盤, シンポジウム講演第 29 回日本ストレス学会学術総会、2013 年 11 月 9 日、徳島大学・大塚講堂 (徳島県)
2. 宮原圭吾、桑野由紀、西田憲生、赤池瑤子、狩野静香、六反一仁, ストレス応答性 Transformer 2 遺伝子の発現を介した細胞増殖の調節メカニズム、第 29 回日本ストレス学会学術総会、2013 年 11 月 8 日、徳島大学・大塚講堂 (徳島県)
3. 藤田絹代、桑野由紀、西田憲生、赤池瑤子、狩野静香、六反一仁、医療従事者を対象とした社会格差による健康障害メカニズムの検討、第 29 回日本ストレス学会学術総会、2013

- 年 11 月 8 日、徳島大学・大塚講堂 (徳島県)
4. Kuwano Y, Honda M, Fujita K, Akaike Y, Kano S, Satake Y, Nishida K, Rokutan K. Chronic academic stress increases a group of microRNAs in peripheral blood in healthy Japanese students. The international conference on social stratification and health 2013、2013 年 9 月 1 日、東京大学・鉄門講堂 (東京都)
  5. Kuwano Y, Katsuura S, Kawai T, Kamio Y, Rokutan K. Autism-associated gene expression was commonly observed in peripheral blood leukocytes from subjects with autism and healthy mothers having autistic children. **11<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry**, 2013 年 6 月 24 日, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan)
  6. 桑野由紀、本田真奈美、梶田敬介、赤池瑤子、藤田絹代、佐竹譲、西田憲生、増田清士、六反一仁. ヒト末梢血における慢性心理的ストレス応答性マイクロ RNA の同定、Neuro 2013、2013 年 6 月 20 日、国立京都国際会館 (京都府)
  7. Kuwano Y, Kajita K, Satake Y, Akaike Y, Honda M, Fujita F, Nishida K, Masuda K, Rokutan K. Transformer-2beta regulates apoptosis through post-transcriptional regulation of bcl-2. Cell symposia-Functional RNAs, 2012 年 12 月 3 日, Hotel Melia (Sitges, Spain)
  8. Kano S, Nishida K, Kuwano Y, Masuda K, Kurokawa K, Rokutan K. Ultraconserved exon-containing SRSF3 mRNA isoform is specifically translated to the truncated SRSF3 protein under oxidative stress. 第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 12 日、福岡国際会議場 (福岡県)
  9. 桑野由紀、梶田敬介、佐竹譲、赤池瑤子、本田真奈美、藤田絹代、西田憲生、増田清士、六反一仁. 選択的スプライシング因子 Tra2 $\beta$  を介した Bcl-2 の転写後調節, 第 7 回臨床ス

トレス応答学会大会、2012年11月24日、東京女子医科大学・弥生記念講堂（東京都）

10. 本田真奈美、桑野由紀、佐竹讓、梶田敬介、赤池瑤子、藤田絹代、西田憲生、増田清士、六反一仁. 精神的ストレスに応答するヒト末梢血マイクロRNAの発現, 第7回臨床ストレス応答学会大会、2012年11月24日、東京女子医科大学・弥生記念講堂（東京都）

11. Kajita K, Kuwano Y, Satake Y, Akaike Y, Honda M, Fujita F, Nishida K, Masuda K, Rokutan K. Ultraconserved element-containing Transformer 2β4 mRNA regulates cellular senescence. The 4th EMBO Meeting, 2012年09月22日, Novotel Nice Centre (Nice, France).

## 6 . 研究組織

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO, Yuki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：00563454