

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07182

研究課題名(和文)成熟mRNA再スプライシングの癌細胞生物学的悪性化に対する広範な影響の解析

研究課題名(英文)Extensive influence on malignancy by cancer specific mature mRNA re-splicing

研究代表者

亀山 俊樹 (Kameyama, Toshiki)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：60298544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々のグループは最近このスプライシング系における秩序を、癌細胞特異的に大規模に破綻させる原理となりうる『mRNA再スプライシング』現象を発見した。本研究では、まずこのmRNA再スプライシングを制御する因子の探索を行った。その結果、がん抑制因子として知られるRBM4aとエクソン・ジャンクション複合体のコア因子群(eIF4A3, Magoh, Y14)がmRNA再スプライシング抑制因子として機能することを発見した。さらに、eIF4A3のノックダウンにより多数のエキシトロン・スプライシングが促進されることを発見し、mRNA再スプライシングがトランスクリプトームに多大な影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、スプライシング反応が完了すると、mRNA上にはまだスプライス部位が残存するにもかかわらず、直ちに核外に輸送されタンパク質に翻訳されると考えられてきた。本研究で我々の発見した結果は、正常細胞にはスプライシング反応をきちんと停止させる機構が存在する事を新たに示唆した。そして、その機構が破綻すると、細胞のトランスクリプトームを破綻させることにつながる事も示し、その大規模な破綻が細胞ががん化など重大な疾患に結びつく可能性を示唆した点が重要である。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated a novel two-step splicing process in which normally spliced TSG101 mRNA is re-spliced to generate aberrant TSG101 mRNA in cancer cells. The mRNA re-splicing implies an important mechanism that prevents deleterious extra re-splicing in normal cells. The control of the re-splicing could be promoted by unknown activator upregulated and/or repressor downregulated in cancer cells. To identify repressor candidates of mRNA re-splicing, we screened siRNA library. As a result, we have identified RBM4a and EIF4A3 proteins as a mRNA re-splicing repressor. RBM4a is also known as a tumor suppressor via controlling apoptosis, proliferation and migration. On the other hand, EIF4A3 is well known as a core factor of the exon junction complex (EJC). We postulate that global prevention of aberrant mRNA re-splicing, termination of splicing precisely, is critical for the consequent tumor suppression. These factors could be key factors to prove this hypothesis.

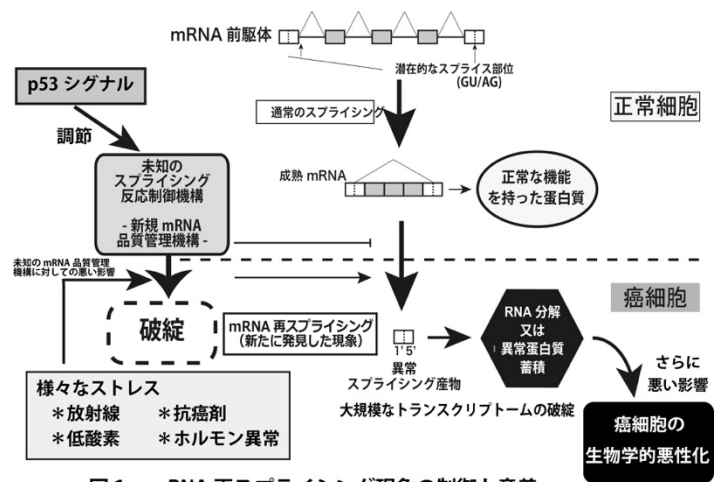
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：mRNA再スプライシング エクソン・ジャンクション複合体 RBM4a エキシトロン がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝子の約 95%が選択的スプライシングを受けることが知られ、選択的スプライシングによって少ない遺伝子から多様な蛋白質群が産み出される。しかし、この遺伝子発現過程上で必須なスプライシング反応の制御機構が破綻すると、様々な疾患の原因ともなる。癌も例外ではなく、異常スプライシングと細胞癌化を示す例が数多く知られている。我々のグループは最近このスプライシング系における



る秩序を、癌細胞特異的に大規模に破綻させる原理となりうる『mRNA再スプライシング』現象を発見した。これまで乳癌、急性骨髄性白血病など多くの癌細胞で、癌感受性遺伝子 *TSG101* の蛋白質コード領域の大部分を失う異常スプライシングが生じる事が知られていた。この異常は遠く離れた2つのエクソン内に存在する弱い選択的 5'、3' スプライス部位が使われるという非常に稀な様式を取る。我々は、この異常が正常なスプライシングの後、成熟 mRNA が再びスプライシングされてしまうという新しい様式によって起こる事を証明した (Kameyama *et al.*, 2012. *Nucl. Acids Res*). さらに同様の現象が *FHIT* という別の遺伝子にも起こることを発見した。すなわち『mRNA再スプライシング』現象はひとつの遺伝子状に偶然のミスプライシングではないことを示している。正常細胞においても多段階で繰返しスプライシングが起きる現象が既に知られているが (Hatton *et al.*, 1998. *Mol Cell*; Parra *et al.*, 2008. *EMBO. J.*; Suzuki *et al.*, 2013. *FEBS Letters*.)、あくまでも最終産物は mRNA である。この最終産物の点において正常細胞で生じている現象は、成熟 mRNA が再スプライシングされてしまうことで異常産物を生成する癌細胞での現象と決定的に異なる。このことから、正常細胞ではスプライシングされた mRNA はさらなるスプライシングを受けよう抑制機構の存在が示唆される。この未知のスプライシング終結機構は蛋白質合成の鋳型として mRNA の品質管理の鍵となると考えられる。そして癌細胞ではそのスプライシング反応終結機構が破綻していると予想される(図1)。従って『成熟 mRNA再スプライシング』現象の影響と制御機構の解明は癌細胞での mRNA 品質管理の破綻=大規模なトランスクリプトーム異常解明に資するものと期待した。

2. 研究の目的

以上の学術的背景と先行研究の結果をふまえ、研究期間内に以下の2つの事を明らかにする事を目的とした。

(1) 細胞癌化・悪性化に影響される mRNA再スプライシング制御因子の探索: これまでの研究から mRNA再スプライシングに影響を及ぼす様々な因子・薬剤を明らかにしてきた。本研究ではこれらを解析のヒントに mRNAの品質保証機構となる、正常細胞で mRNA再スプライシングを抑制する因子、そして癌細胞でのプロテオーム異常の原因となりうる mRNA再スプライシングを促進する因子を網羅的に探索する。RNA-seqによる遺伝子発現変化からのアプローチの他、RNA結合因子に対する siRNAライブラリーのスクリーニングを通して因子の探索と機能解明を行う。

(2) mRNA再スプライシング現象のグローバルな探索と癌の生物学的悪性化獲得との関わり: RNA-seq解析により mRNA再スプライシングを受ける遺伝子を網羅的に明らかにし、それぞれ再スプライシングで欠損する領域がタンパク質の機能ドメインと関連するかを包括的に調べ、実際の治療抵抗性獲得や転移能などの悪性化とどう関わるかの解析を行う。

3. 研究の方法

(1)mRNA 再スプライシング制御因子の探索

(1-1)mRNA 再スプライシングを制御する RNA 結合蛋白質の探索

我々は、がん細胞で発現上昇する再スプライシング促進因子、またはがん細胞で発現低下する再スプライシング抑制因子によって mRNA 再スプライシングが制御されていると予想した(表1)。mRNA 再スプライシング制御因子は、核内において直接 RNA に結合しているだろうと予測し、156 種の核タンパク質に対する siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った。

Hela 細胞を用いて siRNA ライブラリーのスクリーニングを行い、RNA を精製し nested RT-PCR により TSG101mRNA 再スプライシングに及ぼす効果を評価した。

(1-2)p53 シグナルで発現制御される分子の探索

また、mRNA 再スプライシングは p53 シグナルによって制御されることがよく知られている (Moyret-Lalle *et al.*, 2001. *Cancer Res.* 2001; Chua *et al.*, 2016. *Oncotarget*)。そこで、乳がん由来 MCF-7 細胞に MDM2 の特異的阻害剤 RG7388 を作用させ、マイクロアレイにより発現変動する遺伝子を探索した。発現変動する 48 種の RNA 結合蛋白質に対してそれぞれ siRNA を作成し、MCF-7 細胞を用いて TSG101mRNA 再スプライシングに対する効果を評価した。

(2)mRNA 再スプライシングを受ける因子のグローバルな探索

最も mRNA 再スプライシング抑制効果の強い eIF4A3 の遺伝子のノックダウンを MCF-7 細胞で行い、RNA-seq 解析を行った。ウィーン天然資源大学応用遺伝学・細胞生物学科の Peter Venhuizen 博士と Maria Kalyna 博士の協力を得て、RNA-seq のデータ解析を行い、発現変動するエキシトロンを探索を行った。

4. 研究成果

(1)mRNA 再スプライシング制御因子の探索

(1-1)mRNA 再スプライシングを制御する RNA 結合蛋白質の探索

Hela 細胞を用いて 156 種の核タンパク質に対する siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、がん抑制遺伝子として知られる RBM4a がその候補として同定された。RBM4a の mRNA 再スプライシングに対する効果を異なるがん細胞(鼻咽頭癌由来 TW01 細胞)、異なる siRNA を用いて解析し検証した結果、ノックダウンの効率に対応して TSG101 異常 mRNA が蓄積される事が確認出来た(図2)。

RBM4a はリン酸化により細胞内局在が変化しその機能が制御されることが知られている。そこで、野生型 RBM4a、リン酸化型 RBM4a (RBM4aSD)、脱リン酸化型 RBM4a (RBM4aSA) を乳がん由来 MCF-7 細胞に強制発現し、mRNA 再スプライシングに対する効果の違いを解析した。その結果、脱リン酸化型 RBM4aSA は非常に強く mRNA 再スプライシング抑制効果を示したが、リン酸化型 RBM4aSD はほとんど mRNA 再スプライシング抑制効果を示さなかった。これは当初の予想と異なり、RBM4a タンパク質の安定性にリン酸化制御が強く関与するためと考えられた。実際、リン酸化型 RBM4aSD を強制発現し、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を作用させると、RBM4aSD タンパク質の蓄積と強い mRNA 再スプライシング抑制効果を示すようになった。

細胞	候補因子	実験系	再スプライシング活性変化	細胞増殖能変化	細胞死変化	運動能変化
正常細胞・低悪性度細胞	再スプライシング促進因子	過剰発現	- → ++ (+ → +++)	↑	↓	↑
	再スプライシング抑制因子	ノックダウン				
腫瘍細胞・高悪性度細胞	再スプライシング抑制因子	過剰発現	++ → - (+++ → +)	↓	↑	↓
	再スプライシング促進因子	ノックダウン				

表1 再スプライシング制御因子と細胞癌化・悪性化に対する影響

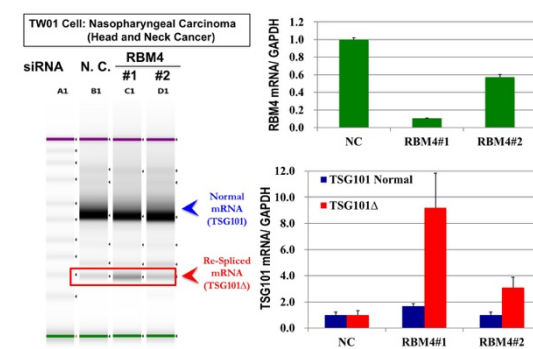


図2 RBM4aノックダウンによる TSG101異常mRNAの蓄積

(1-2) p53 シグナルで発現制御される分子の探索 mRNA 再スプライシングはp53シグナルによって制御されることがよく知られている。まず、MDM2 特異的阻害剤 RG7388 を MCF-7 細胞に作用させ p53 を活性化させると、強く TSG101mRNA の再スプライシングが抑制される事を確認した。次にマイクロアレイを用い、RG7388 処理の有無により発現変動する RNA 結合蛋白質の探索を行い、48 種の候補遺伝子を選定した。我々は、そのそれぞれに対して siRNA によるノックダウン実験を行い、強い

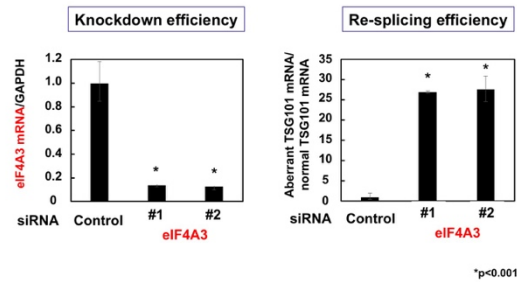


図3 eIF4A3ノックダウンによるmRNA再スプライシング効率の上昇

mRNA 再スプライシング抑制効果を持つ因子として eIF4A3 を同定した(図 3)。eIF4A3 はエクソン・ジャンクション複合体(EJC)のコアタンパク質としてよく知られる。そこで、他の EJC コア因子についても mRNA 再スプライシング制御効果の解析を行ったところ、Magoh と Y14 が eIF4A3 と同様に強く mRNA 再スプライシング抑制作用を示し、EJC コア因子が mRNA 再スプライシング抑制因子として作用することが明らかとなった。また、EJC はコア因子の外殻に様々なタンパク質が緩く結合しスプライシング制御、mRNA 核外輸送、ナンセンス依存性 RNA 分解という多様な機能を担っている。我々はそれらに関与する因子のノックダウンを行い、mRNA 再スプライシングとの関連を調べたところ、スプライシング制御、mRNA 核外輸送、ナンセンス依存性 RNA 分解のいずれとも関係がないことが明らかとなった。以上の結果から、我々は EJC コア因子がスプライシング停止シグナルという新たな機能を持つのではないかと考えている。

(2)mRNA 再スプライシングを受ける因子のグローバルな探索

オーストリア・ウィーン天然資源大学応用遺伝学・細胞生物学科の Marya Kalyna 博士等は植物細胞でのトランスクリプトーム解析から、エクソン内に存在するイントロン(Exitron:エキシトロン)を発見した。エキシトロンはヒトでも存在し、その多くはがん関連遺伝子であった。エキシトロンはその定義からわかる通り 1 個のエクソン内にあり、我々の発見した TSG101 と FHIT の mRNA 再スプライシングは複数のエクソンを跨いでいる。この様な違いはあるが、どちらもがん細胞で多く観察されること、エクソン内にある弱いスプライス部位が活性化されてスプライシングされるという共通点がある。そこで我々はエキシトロン・スプライシングも mRNA 再スプライシングによって引き起こされる異常スプライシングの 1 つではないかと仮定し、共同研究を開始した。

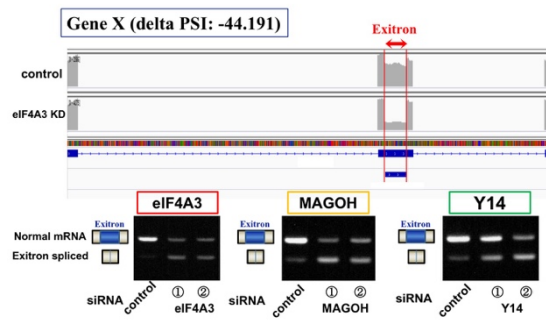


図4 EJCによりスプライシング制御されるExitron

MCF-7 細胞にコントロール siRNA と eIF4A3 に対する siRNA を作用させ、それぞれ RNA-seq 解析を行い、発現変動するエキシトロンの探索を行った。その結果、362 遺伝子に計 453 個のエキシトロンを見いだした。さらに、78 のエキシトロンに変化があり、そのうち 71 このエキシトロンは eIF4A3 のノックダウンによりエキシトロン・スプライシングが上昇していることが明らかとなった(図 4)。その内のいくつかの遺伝子は細胞のがん化や悪性化に関与することが知られており、エキシトロン・スプライシングがそれら遺伝子の機能にどのような影響を及ぼすのか、今後慎重に検討を進める必要がある。

MCF-7 細胞にコントロール siRNA と eIF4A3 に対する siRNA を作用させ、それぞれ RNA-seq 解析を行い、発現変動するエキシトロンの探索を行った。その結果、362 遺伝子に計 453 個のエキシトロンを見いだした。さらに、78 のエキシトロンに変化があり、そのうち 71 このエキシトロンは eIF4A3 のノックダウンによりエキシトロン・スプライシングが上昇していることが明らかとなった(図 4)。その内のいくつかの遺伝子は細胞のがん化や悪性化に関与することが知られており、エキシトロン・スプライシングがそれら遺伝子の機能にどのような影響を及ぼすのか、今後慎重に検討を進める必要がある。

以上の結果を総合し、本研究を通じて我々は成熟 mRNA 再スプライシング抑制因子としてがん抑制遺伝子 RBM4a、EJC コア因子(eIF4A3、Magoh、Y14)を同定することが出来た。そして、それら各因子が正常細胞において、成熟 mRNA が必要以上にスプライシングされてしまう(再スプライシング)事を防ぐスプライシング停止シグナルとして機能し、mRNA のクオリティ・コントロールに寄与し

ている可能性を示した。

今後は、同定した各因子がどの様に mRNA 再スプライシングを抑制するのか、生化学的な作用機序の詳細を明らかにすると共に、mRNA 再スプライシング/エキシロン・スプライシングを受ける遺伝子の機能変化がどの様に、細胞がん化・悪性化につながるのか慎重に解析を進めていく必要があると考えている。

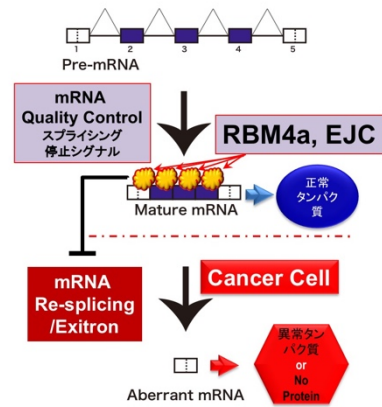


図5 再スプライシング制御因子と新規mRNAクオリティーコントロール因子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chua Huey-Huey, Kameyama Toshiki, Mayeda Akila, Yeh Te-Huei	4. 巻 20
2. 論文標題 Cancer-Specifically Re-Spliced TSG101 mRNA Promotes Invasion and Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 773 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/ijms20030773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Abe Akihiro, Yamamoto Yukiya, Katsumi Akira, Okamoto Akinao, Tokuda Masutaka, Inaguma Yoko, Yamamoto Kiyoko, Yanada Masamitsu, Kanie Tadaharu, Tomita Akihiro, Akatsuka Yoshiki, Okamoto Masataka, Kameyama Toshiki, Mayeda Akila, Emi Nobuhiko	4. 巻 108
2. 論文標題 Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1?RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 208 ~ 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s12185-017-2387-x	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 飴本 剛之介、亀山 俊樹、日下 守、前田 明、白木 良一	4. 巻 42
2. 論文標題 シスプラチン抵抗性ヒト膀胱癌細胞株の樹立と網羅的遺伝子発現解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 藤田学園医学会誌	6. 最初と最後の頁 37 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Abe Akihiro, Yamamoto Yukiya, Katsumi Akira, Okamoto Akinao, Tokuda Masutaka, Inaguma Yoko, Yamamoto Kiyoko, Yanada Masamitsu, Kanie Tadaharu, Tomita Akihiro, Akatsuka Yoshiki, Okamoto Masataka, Kameyama Toshiki, Mayeda Akila, Emi Nobuhiko	4. 巻 .
2. 論文標題 Rearrangement of VPS13B, a causative gene of Cohen syndrome, in a case of RUNX1?RUNX1T1 leukemia with t(8;12;21)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s12185-017-2387-x	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 N Izumo, Y Ishibashi, Y Ono, M Toho, A Sumino, T Kameyama, T Morikawa, Y Shiba, Y Watanabe, T Manabe	4. 巻 2
2. 論文標題 MU314, a novel selective estrogen receptor modulator (SERM), improves estrogen-dependent depressive behaviors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000S1004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大谷 勇太 ^{1,2} 、亀山 俊樹 ¹ 、Peter Venhuizen ³ 、Maria Kalyna ³ 、○前田 明 ¹
2. 発表標題 EJCが癌特異的な成熟 mRNA再スプライシングを抑制する：mRNAの品質管理に関わる新たな EJCの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会【ワークショップ】真核生物におけるストレスに応答した遺伝子発現制御とその破綻に伴う老化および疾患(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Ohtani ^{1,2} 、Toshiki Kameyama ² 、Peter Venhuizen ³ 、Maria Kalyna ³ 、Akila Mayeda ²
2. 発表標題 EJC Core Represses Cancer-specific Mature mRNA Re-splicing: EJC As a Signal to Terminate Splicing.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "EUKARYOTIC mRNA PROCESSING" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Kameyama
2. 発表標題 Cancer specific aberrant mRNA re-splicing and its repressors: What are the splicing termination mechanisms destroyed in cancer cells?
3. 学会等名 Invited Seminar at University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna (BOKU), Department of Applied Genetics and Cell Biology (DAGZ) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiki Kameyama ¹ , Kazuhiro Fukumura ^{1,2} , Masashi Nakatani ³ , Yuta Ohtani ^{1,4} , Kunio Inoue ² , Tetsuro Hirose ⁵ , Akira Mayeda ¹
2. 発表標題 Identification of Tumor Suppressor RBM4a as a Repressor of Cancer-Specific Mature mRNA Re-splicing.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia RNA Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷勇太、亀山俊樹、前田明
2. 発表標題 EJCががん特異的な成熟mRNA再スプライシングを抑制する：スプライシング正常化にはたらく新たなEJCの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀山俊樹
2. 発表標題 Identification of Tumor Suppressor RBM4a as a Repressor of Cancer-Specific Mature mRNA Re-splicing.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀山俊樹、福村和宏、井上邦夫、廣瀬哲郎、前田明
2. 発表標題 がん抑制因子RBM4aはがん細胞特異的な成熟mRNA再スプライシングを抑制する
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiki Kameyama ¹ , Kazuhiro Fukumura ^{1,2} , Kunio Inoue ² , Tetsuro Hirose ³ , Akira Mayeda ¹
2. 発表標題 A Repressor Candidate of Cancer Specific mRNA Re-splicing: A Key factor for splicing fidelity or mRNA quality control?
3. 学会等名 RNA2017 The 22nd Annual Meeting of the RNA Society. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiki Kameyama ¹ , Kazuhiro Fukumura ^{1,2} , Kunio Inoue ² , Tetsuro Hirose ³ , Akira Mayeda ¹ .
2. 発表標題 A Repressor Candidate of Cancer Specific mRNA Re-splicing: A Key factor for splicing fidelity or mRNA quality control?
3. 学会等名 International Symposium on the Hallmarks of Cancer: Focus on RNA (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 亀山俊樹
2. 発表標題 A Repressor Candidate of Cancer Specific mRNA Re-splicing: A Key factor for splicing fidelity or mRNA quality control?がん細胞特異的mRNA再スプライシング抑制因子の探索：スプライシングの忠実度及びmRNA品質保証関連因子
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 亀山俊樹 ¹ , 福村和宏 ^{1,2} , 井上邦夫 ² , 廣瀬哲朗 ³ , 前田明 ¹
2. 発表標題 がん抑制因子RBM4aはがん細胞特異的成熟mRNA再スプライシングを抑制する：mRNA品質保証の鍵となる因子か？
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

藤田医科大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究部門
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~mayeda/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----