

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590943

研究課題名(和文)SRp20が制御する選択的スプライシングの異常と発がん

研究課題名(英文)Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells

研究代表者

棚橋 俊仁(Tanahashi, Toshihito)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30380067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質SRp20をノックダウンした大腸がん細胞は、1500遺伝子の発現が変化し、パスウェイ解析により、G1/S移行期の制御遺伝子の変化を捉え、細胞周期停止に関与する遺伝子群を同定した。SRp20ノックダウンにより125遺伝子の選択的スプライシング変化を確認し、G1/S移行期の制御遺伝子とアポトーシス関連遺伝子の選択的スプライシングを捉えた。FLAGタグ標識SRp20過剰発現細胞を用いて、SRp20が結合するmRNAを解析し、G1/S移行期での停止を介在する細胞周期調節転写因子E2F1とE2F7を、アポトーシスを介在するp53に働くキナーゼHIPK2を見出した。

研究成果の概要(英文)：Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) is a member of the SRSF family that plays wide-ranging roles in gene expression. SRSF3 knockdown induced G1 arrest and apoptosis in colon cancer cells (HCT116). Pathway analysis of differentially expressed transcripts in SRSF3-silenced cells and mRNAs immunoprecipitated with overexpressed SRSF3 suggested that SRSF3 preferentially associated with G1/S checkpoint regulator mRNAs and regulated their expression. SRSF3 knockdown decreased mRNA and protein levels of cyclins (D1, D3, and E1), E2F1, and E2F7. SRSF3 knockdown caused skipping of 81 nucleotides of the hipk2 exon 8. Resultant HIPK2 isoform partially lacking the E3 ubiquitin ligase-binding site became resistant to proteasome digestion. Predominant expression of the splice variant by selective decomposition of full-length hipk2 mRNA as well as by SRSF3 knockdown induced apoptosis in a variety of colon cancer cells expressing wild-type or mutated p53.

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 RNA結合タンパク質 大腸がん マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

選択的スプライシングは、RNA プロセッシングはもちろんのこと、エピゲノム、転写調節、RNA 伸長反応、輸送、および翻訳の全ての過程に関わる重要な反応として認識されてきたが、方法論の難しさから研究が進んでいない。申請者は、SRタンパク質のひとつである SRp20 の研究を進め、SRp20 をノックダウンした大腸がん細胞株を用いた解析から、SRp20 は細胞周期の G1/S 移行期の新たな調節因子であり、p53 依存性にアポトーシスを誘導することを突き止めた。

2. 研究の目的

本研究では、選択的スプライシング調節因子 SRp20 (SFRS3) に焦点をあて、1) SRp20 による G1/S 移行期の調節の分子基盤、2) SRp20 によるアポトーシスの調節の分子基盤、3) SRp20 による細胞周期とアポトーシスの調節異常と発がんを明らかにする。SRp20 が大腸がん細胞の G1/S 移行期の新たな調節因子であり、p53 依存性にアポトーシスを誘導することを解明する。RNA が示す多彩な機能に焦点を当てた研究が進んでいるが、選択的スプライシングを制御する機構の研究は、方法論の確立が困難なこともあり、未だ埋もれた研究領域である。SRp20 の機能を解析した先行研究は極めて少なく、さらに SRp20 による選択的スプライシングの制御異常を検討した研究は国内外を含めて存在しない。RIP-Chip やエキソソームなどの最新アレイテクノロジーを用いて、SRp20 が選択的スプライシングを制御する機構を解析し、動的に変換した異常スプライシングバリエーションが関わる広範で多様な細胞機能を探索する新しい研究提案である。

3. 研究の方法

細胞周期を調節する転写因子 (E2F1 と E2F7) および p53 に働くキナーゼ (HIPK2) は、SRp20 によりエキソン選択の制御を受け、異常スプライシングバリエーションを生じることを見出した。これら異常スプライシングバリエーションが細胞周期とアポトーシスの調節異常に関わる機能を解析する。FLAG タグ標識した SFRS3 プラスミドを構築し、大腸癌由来 HCT116 細胞で SRp20 を過剰発現させ、抗 FLAG タグ抗体で免疫沈降し共沈する mRNA を抽出した。この mRNA を遺伝子発現アレイ (アジレント社) で網羅的にスクリーニングし、およそ 1500 遺伝子の mRNA が

SRp20 と特異的な結合を有することを明らかにした。

次いで、siRNA により SRp20 の機能をノックダウンし、約 100 万プローブが搭載されているエキソソームアレイ (アフィメトリックス社) で転写産物を包括的にスクリーニングした。125 種類の異常スプライシングバリエーションを検出しており、RT-PCR 法による検証を加え、解析候補の同定を進め、細胞周期調節転写因子 (E2F1 と E2F7) と p53 に働くキナーゼ (HIPK2) の異常スプライシングバリエーションを同定した。これらは既知のデータベースに登録されていない新規の転写産物であった。

4. 研究成果

SRp20 が結合する mRNA の同定

FLAG タグ標識した SFRS3 プラスミドを構築し、大腸癌由来 HCT116 細胞で SRp20 を過剰発現させ、抗 FLAG タグ抗体で免疫沈降し共沈する mRNA を抽出した。この mRNA を遺伝子発現アレイ (アジレント社) で網羅的にスクリーニングし、およそ 1500 遺伝子の mRNA が SRp20 と特異的な結合を有することを明らかにした。

SRp20 が制御する細胞機能の推定

1500 程度の遺伝子が SRp20 により制御されるため、バイオインフォマティクス手法で関与する細胞機能の推定を試みた。細胞周期、とくに G1/S 移行期の調節に極めて有意に関わると示された。

SRp20 の機能抑制で生じる異常スプライシングバリエーションの同定

siRNA により SRp20 の機能をノックダウンし、約 100 万プローブが搭載されているエキソソームアレイ (アフィメトリックス社) で転写産物を包括的にスクリーニングした。125 種類の異常スプライシングバリエーションを検出しており、RT-PCR 法による検証を加え、解析候補の同定を進めている。細胞周期調節転写因子 (E2F1 と E2F7) と p53 に働くキナーゼ (HIPK2) の異常スプライシングバリエーションを同定しているが、これらは既知のデータベースに登録されていない新規の転写産物であった。

SRp20 による G1/S 移行期の調節

SRp20 の発現は細胞周期依存性に変化し、とくに S 期から G2/M 期にかけて上昇することを確認している。E2F1 と E2F7 の異常スプライシングバリエーションが生じた細胞を用いて、FACScan で細胞周期を解析すると、G1/S 移行期での停止が認められ、バイオインフォマティクス

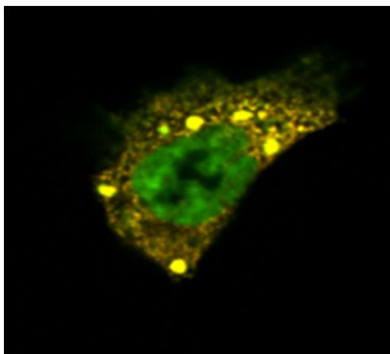
手法での推定と合致していた。E2F1 と E2F7 の異常スプライシングバリエーションのみをノックダウンする siRNA を設計し、これらの生成抑制に伴う細胞周期を観察すると、G1/S 移行期での停止が認められた。

SRp20 による p53 依存性なアポトーシスの調節

SRp20 の機能を抑制すると、p53 に働くキナーゼ (HIPK2) の異常スプライシングバリエーションが増加し、p53 リン酸化 (Ser46) が抑制されることを確認している。この部位の p53 リン酸化はアポトーシスシグナルに影響することが知られている。SRp20 の機能を抑制した細胞では、FACScan と TUNNEL 法によりアポトーシスの促進が認められ、p53 依存性なアポトーシス誘導が確認された。HIPK2 異常スプライシングバリエーションの生成抑制により、Caspase3 などのアポトーシス関連遺伝子の変動を検討した結果、異常スプライシングバリエーションが調節する特異的なアポトーシスシグナルを見出した。

酸化ストレスに応答した SRp20 自身の異常スプライシングバリエーション

申請者は酸化ストレスに応答した Tra2 (SFRS10) の制御不全を見出している。SRp20 も外的環境に応じて変化することが予測されるため、酸化ストレスに反応した SRp20 の変化を観察した。興味深いことに、酸化ストレスに反応して SRp20 自身の異常スプライシングバリエーションが生成されてくることを見出した。この異常スプライシングバリエーションは、SRp20 (20 kDa) の C 末端を部分的に欠損した短いタンパク質 (14 kDa) で、実際に細胞で機能を示すのか全く不明であった。そのため FLAG タグ標識した SRp20 異常スプライシングバリエーションを構築し、細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。SRp20 は核内に局在しているのに対して、異常スプライシングバリエーションは細胞質内で小顆粒を形成し局在が異なっていた。



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 2 件)

Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Yamagishi N, Kajita K, Tanahashi T, Rokutan K. Down-regulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene*. 2014 Mar 13;33(11):1407-17. doi: 10.1038/onc.2013.86. Epub 2013 Mar 18.

Kurokawa K, Tanahashi T*, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol*. 2012 Aug;47(8):883-95.

〔学会発表〕(計 4 件)

Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) regulates G1/S checkpoint and p53-dependent apoptosis. Kurokawa K, Akaike Y, Kajita K, Yamagishi N, Satake Y, Honda M, Nishida K, Kuwano Y, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. 2011 Sep. 3rd EMBO Meeting 2011 Vienna, Austria.

The Mechanism of Transformer 2- β Gene Expression in Response to Oxidative Stress in Human Colon Epithelial Cells. Kuwano Y, Satake Y, Nishida K, Masuda K, Kurokawa K, Teshima-kondo S, Tanahashi T, Rokutan K. 2010 Digestive Disease Week New Orleans, LA, USA

選択的スプライシング調節因子 SRp20 が制御する細胞周期とアポトーシス. 黒川憲、棚橋俊仁、六反一仁. 日本消化器病学会第 97 回総会 2011 年 5 月 13 日 (東京)

酸化ストレスと選択的スプライシングのクロストーク. 棚橋俊仁、黒川憲、六反一仁. 日本消化器病学会第 53 回大会 2011 年 10 月 20 日(福岡国際センター、福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kobepharma-u.ac.jp/rsch/rsch_04r.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

棚橋 俊仁 (Tanahashi Toshihito)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30380067