

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700974

研究課題名(和文)ヌクレオフォスミンの新規ターゲットの探索と解明

研究課題名(英文) Investigation into novel splicing targets of Nucleophosmin

研究代表者

鈴木 仁 (Suzuki, Hitoshi)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・特任助教

研究者番号：00447690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NPM(ヌクレオフォスミン)は、中心体複製等の制御に関する多機能性蛋白質である。本研究では、中心体から離脱したT199リン酸化NPMがスプライシングを抑制する事に注目し、選択的スプライシングへの関与を検証した。まず、NPMの標的となる選択的エキソン群が不明であった為、エキソンアレイ解析を行なった。解析には、リン酸化NPMを模倣する変異型を細胞に過剰発現させ、そのtotal RNAを使用した。アレイ解析とRT-PCR法による検証で確認できた標的エキソンは予想以上に少なかったが、細胞周期に関するG蛋白質や白血病に関連する転写因子等の選択的エキソンがNPMにより制御される事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：NPM (Nucleophosmin) is a multifunctional protein, such as a regulator of the centrosome duplication. It was reported that the phospho-Thr(199) NPM departed the centrosome and localized into the nuclear speckle. Also, this protein had a repressive activity of the pre-mRNA splicing in vitro. However, the regulation of alternative splicing by NPM was unclear. Using total RNAs of the cells over-expressing T199D-NPM (that imitates functionalities of phospho-Thr(199) NPM), we carried out the Exon Array analysis to identify splicing targets of NPM. Unfortunately, the validation by the RT-PCR suggested that most extracted exons were not actual target exons of NPM. Nevertheless, several alternative exons including the splicing events of a cell cycle-related G-protein and a leukemia-related transcription factor were obtained as potential targets of NPM. These may play critical roles in the alternative splicing by NPM.

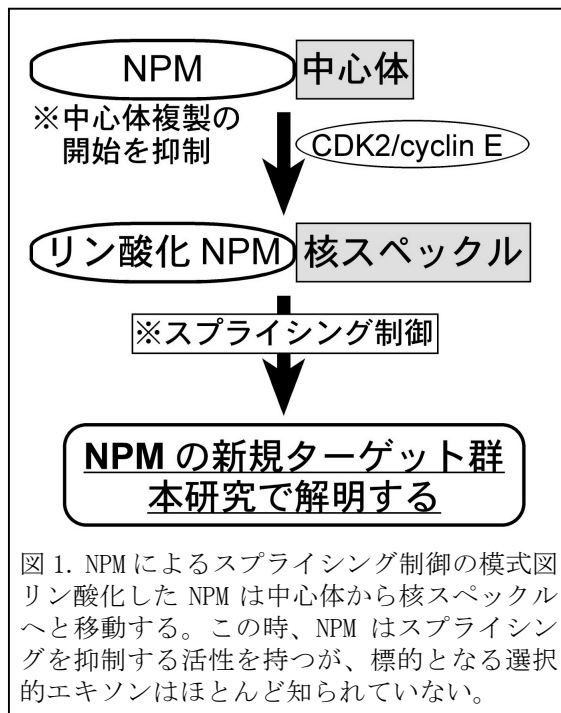
研究分野：分子生物学

キーワード：選択的スプライシング ヌクレオフォスミン 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

スクレオフォスミン (NPM) は多機能性を有すタンパク質であり、リボソームの生合成、細胞周期制御、中心体複製、ゲノム安定化やアポトーシスなどに関与する事が知られている。細胞内のNPMは核小体、核質および中心体などに検出される。NPMの異常はガン細胞で顕著であり、NPMの高発現、異常な細胞質局在や転座による融合タンパク質の生成などが報告されている。とりわけNPMの中心体複製制御は重要であり、その異常は細胞周期制御の乱れと、細胞のガン化に繋がる。

G₁期の中心体に局在するNPMは、中心体複製を抑制的に制御している。細胞周期進行の準備が整うと、CDK2/cyclin Eにより199番目のスレオニン (T¹⁹⁹) がリン酸化される。T¹⁹⁹リン酸化NPMは中心体から離脱し、中心体複製を開始する。非常に興味深いことに、中心体を離脱したT¹⁹⁹リン酸化NPMは、核内に移行し、スプライシングが行われる核スペックルに局在化した。これまでに私は、スプライシング制御因子としてのNPMの機能を検証する共同研究に参加して、T¹⁹⁹リン酸化NPMが*in vitro*の反応系でスプライシングを抑制的に制御することを報告した(図1)。この活性は、選択的スプライシング制御に大きな影響を与えるものと考えられる。実際、NPMがhnRNP H1と協調して、ribosomal protein L3 (rpl3)の第4エクソンの制御に関与するという報告もあるが、その他の選択的スプライシングについては全く分かっていなかった。



選択的スプライシングも、ガンと密接に関係する。例えば、ガン細胞におけるエネルギー供給に関して、ピルビン酸キナーゼの選択的スプライシングが注目された。ピルビン酸キナーゼは、解糖系においてATP産生を担う

酵素である。ガン細胞や胎性細胞においてそのスプライシングが変化し、過活性化型になることが報告された。血管新生の不十分な状況において、解糖系からのエネルギー供給が細胞分裂に必須であると考えられている。このようなスプライシング制御が、ガンにおける治療のターゲットとなる可能性がある。

選択的スプライシング自体は、90%以上のヒト遺伝子で起こる一般的な現象である。しかし、ガンと密接に関係するNPMが標的とする選択的スプライシングには、治療などに有意義なものが存在すると期待される。NPMの選択的スプライシング制御に関しては、その標的エクソン群を含めて、よく分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究はガン化と密接な関係にあるNPMのスプライシング制御因子としての役割を明らかにするものである。

G₁/S期にリン酸化されたT¹⁹⁹リン酸化NPMは、中心体複製だけではなく、核スペックルに移行しスプライシング制御を担うと予想される。細胞周期などと関連したNPMの標的エクソン群や、その分子機構を検証することは、疾患メカニズムの解明や治療戦略の確立などに貢献すると期待できる。NPMの標的エクソン群を網羅的解析により同定することは、NPMを中心としたスプライシング制御機構の全容を解明する糸口となる。

3. 研究の方法

T¹⁹⁹リン酸化NPMは、核スペックルへの局在化とスプライシングの抑制的制御という2つの特徴を有する。この性質を模倣するNPM変異体として、199番目のスレオニンをアスパラギン酸へと置換したT199D-NPMが知られている。また、スレオニンをアラニンへと置換したT199A-NPMは、核スペックルへ移行せず、スプライシングにも影響しないことが明らかとなっている。本研究では、これらのNPM

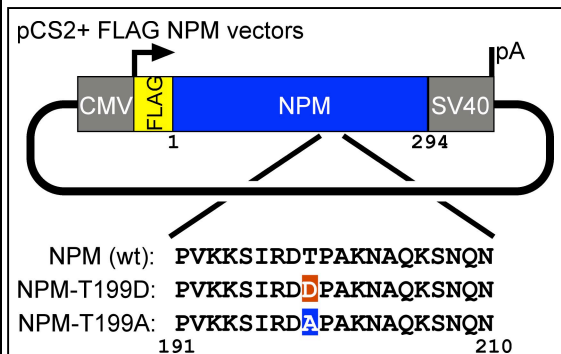
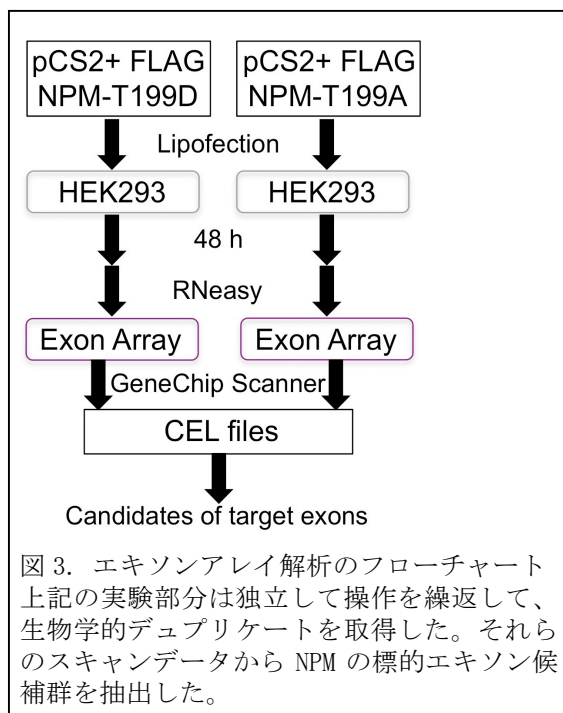


図2. NPM発現ベクター
野生型及び変異型NPM(NPM1)の蛋白質コード領域を、pCS2+ FLAGベクターに挿入した。下部の配列は、導入した変異の場所を示す。

変異体を用いて、NPM の標的エクソンを同定することとした。

野生型の NPM(wt)、変異型の T199D-NPM、及び T199A-NPM の発現ベクターをそれぞれ調製し、HEK293 細胞に導入した (図 2)。これらの野生型及び変異型 NPM の過剰発現により、細胞内における選択的スプライシングの変化を促し、それぞれ total RNA を精製した。NPM の選択的スプライシングにおける新規標的エクソン群を同定する為、網羅的解析が必要となる。私は、エクソンアレイ解析を行なうこととした。アレイは生物学的デュプリケートを準備して、アフィメトリクス社の GeneChip human Exon 1.0 ST Array を用いて行なった (図 3)。スキャンデータの解析は、生物情報解析サービス会社に依頼して、Expression console 等を用いて解析した。



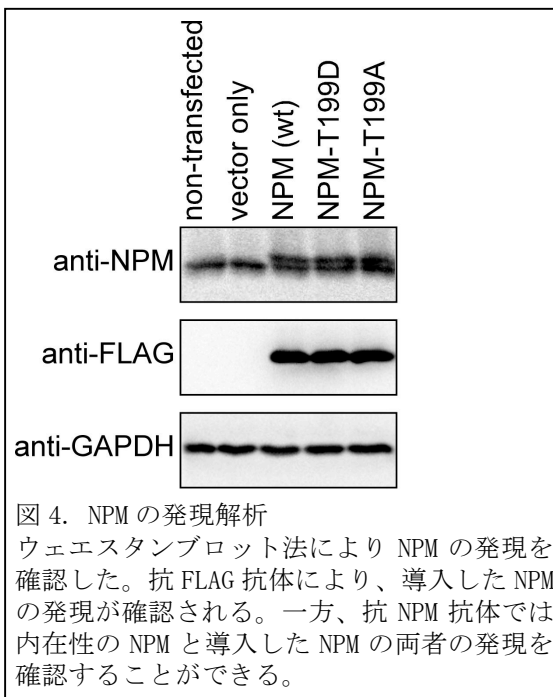
少なくとも遺伝子が発現しているものを選別した後、スプライシングインデックス (SI 値) に注目した。SI 値は、エクソンの発現を遺伝子の発現でノーマライズした後、2 つのサンプル間の変化を示す値である。本研究では、T199D-NPM の過剰発現細胞由来 total RNA と T199A-NPM のものを比較した。SI 値などの指標を用いた抽出の後、選択的エクソンを個別に検証した。検証には、RT-PCR 法を行って、T199D-NPM 依存的な選択的スプライシングの変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 発現ベクターと total RNA の調製

図 2 に示すように、pCS2+ FLAG ベクターに野生型 NPM の蛋白質コード領域を挿入した。これを鋳型として点変異を導入し、NPM-T199D 及び NPM-T199A の発現ベクターを調製した。

これらのベクターは、それぞれ HEK293 細胞に導入して、transient transfection を行なった。48 時間培養の後、細胞を回収して total RNA の精製や細胞抽出液の調製を行なった。導入した NPM の発現は、ウェスタンブロット法を行なって確認した (図 4)。導入した NPM は、抗 FLAG 抗体や抗 NPM 抗体で検出できおり、内在性の NPM と同等の発現レベルが確認された。これと同じ操作を施して回収した細胞から、total RNA を精製した。



(2) エクソンアレイ解析

NPM-T199D の発現は、NPM 依存的な選択的スプライシングを促進して、細胞内の遺伝子発現を変化させたと予想される。また、NPM は多機能性蛋白質であるため、コントロールとして NPM-T199A を用いた。これら 2 種類の total RNA を用いて、エクソンアレイ解析を行なった (図 3)。さらに、独立に同じ実験を行なって、生物学的デュプリケートを取得している。これらのスキャンデータから、CEL ファイルを取得し、数値化を行なった。

標的エクソンの抽出には、まず、エクソンアレイ解析で遺伝子発現シグナルが極めて低い遺伝子を除外した。そして、デュプリケート間で SI 値の正負が異なるものも除外した。SI 値の平均が 1.4 未満のエクソンも除外すると、約 350 エクソンが抽出される。このうち、約 35% のエクソンが、ゲノムブラウザ上で選択的エクソンと判定された。それらの選択的エクソン群からランダムにエクソンを選択し、エクソンアレイ解析とエクソンの抽出手法の正当性を RT-PCR 法により評価した。残念ながら、大多数のエクソンにおいて顕著な変化が認められなかったため、抽出したものの多くは NPM の標的エクソンではないと示唆された。

(3) RT-PCR 法による標的エクソンの同定

抽出した選択的エクソン群から細胞周期や

がんに関わる遺伝子・エクソンを選別する予定であったが、個々のエクソンを RT-PCR 法により注意深く検証し、数少ない標的エクソンを同定することとした。エクソン抽出に関しても、SI 値の平均値が 1.6 以上で、デュプリケートでいずれも大きな SI 値を示したエクソンに変更して、プライマー設計の容易な 20 個のエクソンを選択して検証した。いずれも顕著な変化とはいえないが、数個のエクソンで NPM-T199D 依存的な変化が示唆された。典型的なスプライシング制御因子の transient transfection の場合でも、導入効率などの影響によりスプライシングの変化が微弱となる。また、内在性の NPM も発現して、スプライシングの変化が検出しにくい状況となったと考えられる。

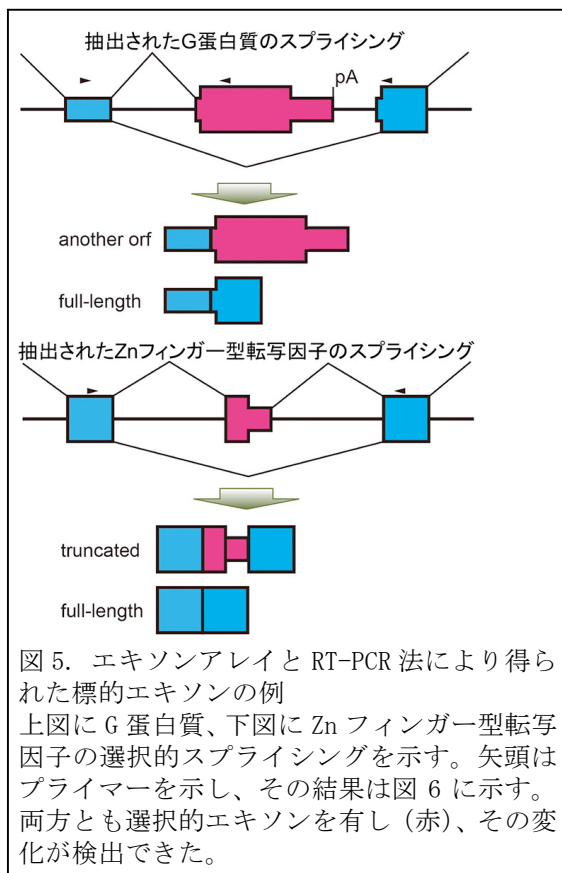


図 5. エクソンアレイと RT-PCR 法により得られた標的エクソンの例
上図に G 蛋白質、下図に Zn フィンガー型転写因子の選択的スプライシングを示す。矢頭はプライマーを示し、その結果は図 6 に示す。両方とも選択的エクソンを有し (赤)、その変化が検出できた。

RT-PCR 法により T199D-NPM 依存的な傾向が示されたエクソンには、遺伝子名を明示しないが G 蛋白質や Zn フィンガー型転写因子の選択的エクソンが存在した (図 5)。この G 蛋白質のエクソンは 3' スプライスサイト選択型であり、Zn フィンガー型転写因子のエクソンはカセット型であった。どちらのエクソン使用でも、全長型の相対的な発現低下が生じると推定される。T¹⁹⁹リン酸化 NPM の重要な標的候補となると考えている。

驚いたことに、Zn フィンガー型転写因子はがん抑制遺伝子のパラログであった。さらに活性化した NPM により誘導され得る短縮型の転写因子は、ある種の白血病患者で高発現することが報告されていた。一方、この G 蛋白質は細胞周期制御に関連する。このように、

当初の計画通りがん関連の標的候補を抽出することに成功した。これらの遺伝子を含めて、T¹⁹⁹リン酸化 NPM の選択的スプライシングにおける新規の標的エクソン候補を同定することができており、NPM とそのスプライシング制御を中心とする細胞にガン化において重要な知見となると考えている。

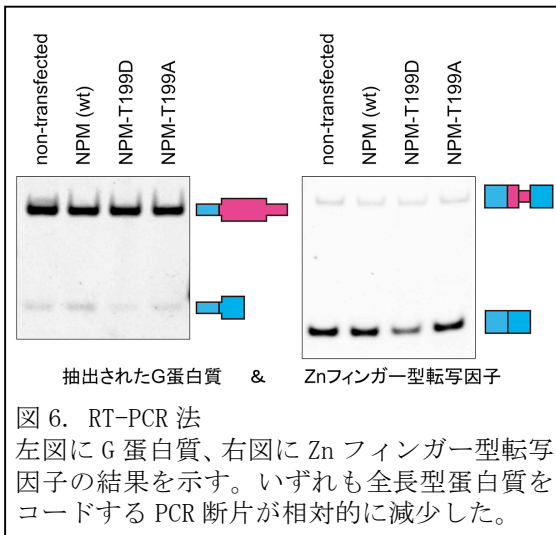


図 6. RT-PCR 法
左図に G 蛋白質、右図に Zn フィンガー型転写因子の結果を示す。いずれも全長型蛋白質をコードする PCR 断片が相対的に減少した。

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 4 件)

- [1] Alam S, Suzuki H, Tsukahara T. Alternative splicing regulation of APP exon 7 by RBFOX proteins. *Neurochem Int.* 査読有. **78** 巻. 7-17 頁. 2014 年.
- [2] Alam S, Phan HT, Okazaki M, Takagi M, Kawahara K, Tsukahara T, Suzuki H. Computational extraction of a neural molecular network through alternative splicing. *BMC Res Notes.* 査読有. **7** 巻. 2014 年. DOI:10.1186/1756-0500-7-934
- [3] Suzuki H, Tsukahara T. A View of Pre-mRNA Splicing from RNase R Resistant RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有. **15** 巻. 9331-9342 頁. DOI: 10.3390/ijms15069331. 2014 年.
- [4] Suzuki H, Kameyama T, Ohe K, Tsukahara T, Mayeda A. Nested introns in an intron: evidence of multi-step splicing of a large intron in the human dystrophin pre-mRNA. *FEBS Lett.* 査読有. **587** 巻. 555-561 頁. 2013 年.

[学会発表] (計 5 件)

- [1] 鈴木 仁, 亀山俊樹, 前田 明, 塚原俊文. 環状型転写産物の包括的理解に向けた DMD 遺伝子ホットスポットの解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- [2] 鈴木 仁. circRNA とスプライシング.

第1回北陸エピジェネティクス研究会. 2014年11月18日~19日. 金沢大学附属医学部図書館 十全記念スタジオ (石川県・金沢市)
[3] Suzuki H, Saito T, Kameyama T, Masuda S, Nagata T, Takeda S, Mayeda A, Tsukahara T. Circular RNA and multiexon-skipping in the DMD gene hotspot. RIKEN Symposium/15th Tokyo RNA club, ncRNA Regulation. 2014年10月1日. 理化学研究所和光キャンパス 鈴木梅太郎ホール (埼玉県・和光市)
[4] シャプフェール アラム, 鈴木 仁, 塚原俊文. RBFoxによるAPP遺伝子 exon7 のスプライシング制御. 第16回日本RNA学会年会. 2014年7月22日~24日. ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
[5] 鈴木 仁, 亀山俊樹, 前田 明, 塚原俊文. DMD 遺伝子のホットスポットのスキップ産物とcircRNA. 第15回日本RNA学会年会. 2013年7月24日~26日. ひめぎんホール(愛媛県・松山市)

[図書] (計1件)

[1] Suzuki H, Tsukahara T. Comprehensive analyses of alternative exons in neuronally differentiated P19 cells. *NOVA science publishers*. New development in alternative splicing research. 2013年. pp. 49-68.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 仁 (SUZUKI Hitoshi)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・特任助教

研究者番号: 00447690

(2) 研究分担者
該当無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
該当無し ()

研究者番号:

(4) 協力研究者
塚原俊文 (TSUKAHARA Toshifumi)

前田 明 (MAYEDA Akila)