

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 12 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640081

研究課題名(和文) ゲノム変異に依存しないプロテオーム異常をスプライシング制御破綻から探る

研究課題名(英文) Search for the cause of proteomic disorder without genomic mutations in the global mis-regulation of splicing

研究代表者

前田 明 (MAYEDA, Akila)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：50212204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA前駆体のスプライシングによってできた成熟mRNAが、癌細胞では再びスプライシングされ、異常なmRNA産物が生成しているという現象を発見した。この成熟mRNAの再スプライシング現象は癌細胞におけるスプライシングの大規模な破綻を説明するだけでなく、正常細胞での無分別なmRNA再スプライシングを抑制するmRNA品質管理機構の存在を示唆するので、その現象を制御する因子を探索した。興味深い事に、癌抑制遺伝子産物p53が再スプライシングを抑制し、逆に上皮間葉転換の誘導因子TGF- $\beta$ が、再スプライシングを促進する事がわかった。mRNAスプライシング現象が、癌の進展や抑制に深く関わっているに違いない。

研究成果の概要(英文)：We discovered re-splicing event in cancer cells that occurs on mature spliced mRNA and generates aberrant mRNAs. This 'mRNA re-splicing' event not only explains a global splicing mis-regulation in cancer, but also implies an mRNA-quality control mechanism that prevents deleterious extra re-splicing in normal cells. Therefore, we tried to search for the regulation factors of the mRNA re-splicing. Intriguingly, tumor suppressor p53 factor prevented mRNA re-splicing, while it was promoted by the epithelial-mesenchymal transition factor TGF- $\beta$ . Our results suggest considerable implication of the mRNA re-splicing event in the progression and suppression of cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現調節 スプライシング mRNA 品質管理機構 癌

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物では、遺伝子から転写された mRNA 前駆体は、ほとんどの場合イントロンと呼ばれる介在配列によってずたずたに分断されている。数多くのイントロンに分断されたエクソンを正しく認識しエクソン同士を正確に結合させるスプライシングは、mRNA が蛋白質合成の鋳型であるが故に、遺伝子発現での必須過程である。高等生物になるほどイントロンの大きさと数は増し、スプライシングをあえて複雑化させているが、それが選択的スプライシングの組み合わせを飛躍的に増加させた。2万個余りのヒトの遺伝子から、低く見積もっても12万種の蛋白質が生み出され、高度な生命機能を演出している原理がそこにある。最新の解析によると、ヒト遺伝子の9割以上が選択的スプライシングされ、その内6割が組織特異的な調節を受けている。一方、複雑化されたスプライシング系は、危険と表裏一体である。厳密に制御されるからこそ高次な生命現象を具現化できるわけで、それがひとたび破綻すれば深刻な結果となる。異常なスプライシングやスプライシングの制御不全によって、細胞機能に重大な影響を及ぼし、さまざまな難病や癌をひき起こしている事実は枚挙にいとまがない。

本研究課題の主題となる疾患は癌である。細胞が癌化すると突然変異に依存しない異常蛋白質が増える事がよく知られているが、その原因はよくわかっていない。上記で述べた昨今の知見から、この原因を最も合理的に説明できる可能性は、転写後、翻訳前の必須過程であるスプライシング制御の破綻にある。最近、私たちは癌細胞でグローバルなスプライシングの破綻を引き起こす原因となる新しい一つの現象『成熟 mRNA の再スプライシング』を、細胞増殖に必須な *TSG101* 遺伝子で発見した[雑誌論文①,③]。通常、遺伝子から転写された mRNA 前駆体はスプライシングされた後、成熟 mRNA となって細胞質に輸送され、蛋白質合成の鋳型となる。癌細胞では、本来は再びスプライシングされるはずがない成熟 mRNA が、エクソン上のスプライス部位に似た配列を使って再びスプライシングされていたのである(図1)。この事実は重要である。なぜなら、正常細胞では一旦スプライシングされた mRNA は、それ以上のスプライシングを受けないようにする抑制機構の存在が示唆されるからである。この未知のスプライシング完了機構を知る事は、蛋白質合成の鋳型として正確な mRNA を作る品質管理機構の解明につながるだろう。私たちが発見した *TSG101* 遺伝子での現象は、その問題解決のための絶好のモデル系になっている。

癌化により再スプライシング抑制機構が破

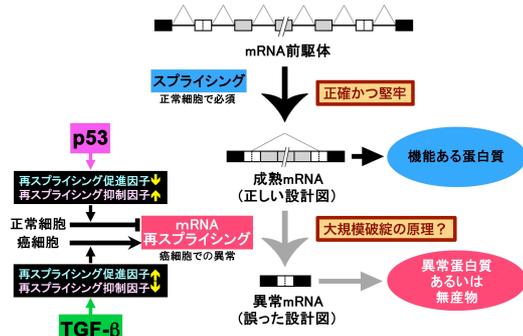


図1 mRNA 再スプライシング現象の発見と意義

綻したとすると、ゲノムに突然変異はなくて一旦正常な mRNA ができたとしても、それから異常な mRNA が生じる事が可能となり、プロテオームにおいては想像より遙かに多くの異常が蓄積し、実際の現象を矛盾なく説明できる(図1)。もしかすると、癌化によるスプライシングの大規模な破綻が、突然変異に依存しない異常蛋白質の生成の主たる原因となっているのではないかと。この大胆な仮説を検証するのが、この『挑戦的萌芽研究』の課題であった。

## 2. 研究の目的

癌細胞で見られる大規模なプロテオーム異常は、ゲノム変異では説明できないが、その原因がスプライシング制御のグローバルな破綻であるという仮説を実証する。私たちはスプライシングされた成熟 mRNA が、再びスプライシングされ、異常な mRNA 産物が生成するという現象を癌細胞で見だし、これがスプライシングのグローバルな破綻を矛盾なく説明する。この現象は、正常細胞での新たな mRNA 品質管理機構も示唆するため、mRNA 再スプライシングを正常細胞で抑制している因子、また逆に癌細胞でそれを促進している因子の探索と同定をめざす(図1)。

## 3. 研究の方法

(1) 癌細胞のゲノムとトランスクリプトームを比較検討する事で、ゲノム変異に依存しないトランスクリプトーム異常の実態を把握した上で、成熟 mRNA から再スプライシングが起こる遺伝子をグローバルに探索し、癌におけるスプライシングの大規模破綻の原理となりうる事を実証する。新しく開発するスプライシング特異的な投縄状(Lariat) RNA 産物を標的とした、次世代シーケンサーによる網羅的配列解析(Lariat-Seq)が成功の鍵となる。

(2) mRNA 再スプライシングの抑制・促進機構に関与する因子を網羅的に探索し、未知の mRNA 品質保証機構・再スプライシング機構の解明に挑戦する(図1)。RNA 結合蛋白質

の siRNA ライブラリーのスクリーニングが有力な戦略となる。

#### 4. 研究成果

(1a) 成熟 mRNA 再スプライシング現象を Lariat-Seq によって網羅的に解析する研究において、本学の「疾患遺伝子網羅的解析センター」の大型次世代シーケンサー (HiSeq1500, Illumina) が利用できるようになった。膨大な配列データを投縄状 RNA にマップするプログラムは市販されておらず、特殊なプログラムを必要とするので、トランスクリプトーム解析の第一人者である MIT の C. Burge 教授の研究室で開発されたプログラムを用いて、精力的に解析を進めている (共同研究)。

(1b)『成熟 mRNA の再スプライシング』は、構造的に見ると内部のスプライシング完結後に再び外部のスプライシングが起こっている現象であるが(図1)、興味深い事に筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィン (*DMD*) 遺伝子に存在する巨大イントロンの内部に相同の現象を発見した[雑誌論文②]。すなわち、10万塩基長を超えるイントロン7内部に、入れ子状に存在する複数のイントロン様断片のスプライシング後に、イントロン7全域を取り除くスプライシングが起こっている実験的根拠を得た。それに基づき、未だに明らかではない巨大イントロンのスプライシング機構の一つとして『入れ子スプライシング仮説』を提唱した[雑誌論文②]。驚くべき事に、その後、次世代シーケンサーを用いたヒト転写物の大規模解析において、長いイントロン内に再帰的スプライシングと呼ばれる現象が広範に起こっている事が実証された[Nature 521, 371 (2015); 他2報]。この再帰的スプライシングは、5'側から順繰りに起こるイントロン内スプライシングであるが、つい最近、同様の大規模解析によって入れ子スプライシングも *DMD* 遺伝子はもちろん、数多くの遺伝子で発見された[RNA Biol. 13, 290 (2016); M. Radtke; 私信]。私たちが1遺伝子内の1イントロンにおける解析データでもって提唱した『入れ子スプライシング仮説』が、遂に一般的な現象として実証され、世界で認知されたのだ。

(2) 私たちは、低酸素や DNA に損傷を与える抗癌剤 (シスプラチン) などのストレスによって、癌細胞での再スプライシングが促進され、それが癌抑制遺伝子 *p53* の発現によって抑制される事を見出した(図1)。すなわち、癌特異的な mRNA 再スプライシング現象が、*p53* 蛋白質の制御下にある事があきらかになったわけであり、mRNA 再スプライシング促進・抑制因子の探索は *p53* 遺伝子の下流にある因子軍に対象が絞られた。その同定は

鋭意推進中である。一方、私たちは、上皮間葉転換の誘導因子である TGF- $\beta$  が、mRNA 再スプライシングを促進するという興味深いデータを得ている(図1)。上皮間葉転換は癌細胞の浸潤・転移の主たる要因なので、癌転移における再スプライシングの関与がきわめて興味深い。

私たちが発見した癌特異的な mRNA スプライシング現象が、きわめて重要な癌関連因子である *p53* や TGF- $\beta$  に深く関わる事実は、mRNA 再スプライシング現象が、癌の基礎研究の主役に躍り出てきたと言っても過言ではない。ありがたい事に、平成28年度より「基盤研究(B)」が本研究課題により採択された。新たな展開を迎えた本研究を、引き続き推進し発展させたい。

#### 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3件)

- ① 亀山 俊樹, 前田 明 (2015). がん細胞で異常なタンパク質が作られる仕組みを「mRNA 再スプライシング」現象から探る. *ファルマシア* 51, 22-26. 査読無 [http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2015/51-01.htm]
- ② H. Suzuki, T. Kameyama, K. Ohe, T. Tsukahara, A. Mayeda (2013). Nested introns in an intron: Evidence of multi-step splicing in a large intron of the human dystrophin pre-mRNA. *FEBS Lett.* 587, 555-561. 査読有 [doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.057]
- ③ T. Kameyama, H. Suzuki, A. Mayeda (2012). Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Res.* 40, 7896-7906. 査読有 [doi: 10.1093/nar/gks520]

〔国際学会発表〕(計5件)

- ① T. Kameyama, S. Matsumiya, A. Mayeda (2015). Hypoxia had an effect on cancer-specific mature mRNA re-splicing. *Eukaryotic mRNA Processing Meeting* (August 18-22), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.
- ② T. Kameyama, A. Mayeda (2014). Novel mRNA re-splicing event: important aspects for understanding robustness and catastrophe in gene expression systems. *RIKEN Symposium / The 15th Tokyo RNA Club* (October 1), Suzuki Umetaro Hall, RIKEN, Wako, Japan.
- ③ T. Kameyama, R. Shiroki, N. Emi, A.

Mayeda (2014). Novel mRNA resplicing event as potential paradigm for understanding robustness and catastrophe in gene expression systems. *The 2nd International Symposium on Dynamical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Integrated Functions* (January 11–12). Campus Plaza Kyoto, Kyoto, Japan.

- ④ T. Kameyama, A. Mayeda (2013). Resplicing of mature mRNA in cancer cells: Indication of the hidden splicing termination mechanism in normal cells. *BRI International Symposium 2013: RNA World in Brain* (July 27–28), Center for Integrated Human Brain Science, Niigata University, Niigata, Japan.
- ⑤ T. Kameyama, A. Mayeda (2012). Mature mRNA Resplicing in cancer cells postulates undiscovered quality control mechanism of mRNA in normal cells. *Gordon Research Conference on the Biology of Post-Transcriptional Gene Regulation* (July 15–20), Salve Regina University, Newport, Rhode Island, U.S.A.

〔国内学会発表〕(計8件)

- ① 亀山 俊樹, 松宮 翔太, 前田 明 (2015). 低酸素ストレスは癌細胞特異的成熟 mRNA 再スプライシングに影響を与える. 第17回日本RNA学会年会(7月15–17日). ホテルライフオート札幌. 札幌市. 北海道.
- ② 亀山 俊樹, 増田 誠司, 前田 明 (2014). がん細胞での成熟 mRNA 再スプライシング活性に影響を与える核外輸送因子. 第16回日本RNA学会年会(7月23–25日). ウィンク愛知. 名古屋市. 愛知.
- ③ 亀山 俊樹, 前田 明 (2014). 癌細胞における成熟 mRNA 再スプライシングの発見と意義. 平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ: 個体レベルからみた炎症とがん発生・進展における個体内相互作用 (2月17–18日). 琵琶湖ホテル, 滋賀.
- ④ 前田 明 (2013). mRNA 前駆体スプライシング研究の最前線-異常スプライシングから見えてくる疾患の原因と治療. 東海血液疾患フォーラム(7月24日). ヒルトン名古屋. 名古屋市. 愛知.
- ⑤ 前田 明 (2013). mRNA の再スプライシング現象から探る未知の mRNA 品質管理機構. 平成24年度 新学術領域研究「RNA 制御学」班会議(1月7–9日). ホテルレオパレス仙台. 仙台市. 宮城.
- ⑥ 亀山 俊樹, 前田 明 (2012). がん細胞における成熟 mRNA 再スプライシングの発見から想定される正常細胞での mRNA 品質管理機構. 第35回日本分子生物学会年会(12月11日–14日). 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡. 福岡市. 福岡.
- ⑦ 亀山 俊樹, 前田 明 (2012). Mature mRNA Resplicing in cancer cells postulates undiscovered quality control mechanism of mRNA in normal cells. 第22回 CDB ミーティング “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II” (6月11日–13日). 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター. 神戸市. 兵庫.
- ⑧ 前田 明 (2012). mRNA の再スプライシング現象から探る未知の mRNA 品質管理機構. 平成23年度 新学術領域研究「RNA 制御学」班会議(1月6–7日). 神戸ニチイ学館. 神戸市. 兵庫.

〔図書〕(計1件)

A. Mayeda, A.R. Krainer (2012). In vitro splicing assays. In *alternative pre-mRNA splicing: theory and protocols*. S. Stamm, R. Lührmann eds., Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp. 320–329.

〔その他〕

研究室のホームページ:

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~gem-1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 明 (MAYEDA, Akila)  
藤田保健衛生大学 総合医科学研究所・教授  
遺伝子発現機構学研究部門

研究者番号: 5 0 2 1 2 2 0 4

### (2) 連携研究者

亀山 俊樹 (KAMEYAMA, Toshiki)  
藤田保健衛生大学 総合医科学研究所・助教  
遺伝子発現機構学研究部門

研究者番号: 6 0 2 9 8 5 4 4

白木良一 (SHIROKI, Ryoichi)  
藤田保健衛生大学医学部 腎泌尿器外科学・教授  
研究者番号: 7 0 2 2 6 3 3 0

杉岡 篤 (SUGIOKA, Atsushi)  
藤田保健衛生大学医学部 肝脾外科学・教授  
研究者番号: 2 0 1 7 1 1 5 0

内海 俊明 (UTSUMI, Toshiaki)  
藤田保健衛生大学医学部 乳腺外科学・教授  
研究者番号: 1 0 1 7 6 7 1 1