

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650063

研究課題名(和文) RNAスプライシングを介した新たな細胞分裂開始機構の解明

研究課題名(英文) RNA splicing mediated cell cycle progression

研究代表者

千賀 威 (Senga, Takeshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80419431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SNW1はRNAのスプライシングや特定の遺伝子の転写に関与していることが知られている。申請者はSNW1の発現抑制が細胞分裂の進行を停止させ、細胞死を誘導することを見出した。さらにSNW1がEFTUD2とSNRNP200というスプライシング因子を直接結合することを確認した。EFTUD2とSNRNP200の発現を抑制すると、SNW1発現抑制と同様に細胞分裂の停止、また細胞死の誘導が観察された。さらにSNW1とこれらの結合を阻害するフラグメントタンパク質を発現させたところ、発現抑制と同様な現象が見られた。SNW1の機能抑制は、細胞分裂を阻害し、細胞死を誘導すると思われる。

研究成果の概要(英文)：SNW1 is associated with RNA splicing or transcription of specific genes. We found that SNW1 depletion inhibited cell cycle progression and induced apoptosis. We identified EFTUD2 and SNRNP200 are direct binding partner of SNW1. Similar to SNW1 knockdown, suppression of either EFTUD2 or SNRNP200 inhibited cell cycle progression and induced apoptosis. Expression of mutant SNW1 or EFTUD2 that could disrupt binding of interaction between endogenous SNW1 and EFTUD2 promoted apoptosis by arresting cells in mitosis. These results indicate that inhibition of SNW1 function may inhibit cell cycle progression and promote apoptosis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：RNA スプライシング 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

申請者は細胞分裂に関する様々な因子を同定するため、siRNAを用いたスクリーニングをおこなった。そして多くの細胞分裂に関わる新たな遺伝子を同定し、論文を発表してきた。同定された多くの遺伝子のいくつかは、RNAのスプライシングに参与することが報告されているものであった。例えばこのスクリーニングで同定されたSNW1はスプライシングのある段階に重要な役割を果たしているが、この遺伝子の発現抑制は多くの細胞を分裂期に停止させた。RNAのスプライシングが細胞分裂に関わっているといういくつかの報告はあるが、詳細な分子メカニズムに関しては全く分かっていない。そこで申請者は今回SNW1がどのようにして細胞分裂を制御しているか明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

SNW1がどのような分子機構で細胞分裂を制御するのかを検証する。そしてRNAスプライシングが細胞分裂を制御することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1). タイムラプス顕微鏡を用いた解析。

細胞分裂を観察するために、GFP-Histoneを恒常的に発現させたHeLa細胞をレトロウイルスを用いて作成した。その細胞にSNW1に対するsiRNAを導入し、48時間後にタイムラプス顕微鏡を用いて細胞分裂の異常を観察した。100個以上細胞の分裂を観察し、染色体の整列以上、また分裂にかかる時間などを計測した。

(2). 免疫染色による観察

SNW1の抗体、GFP-SNW1を用いて細胞内におけるSNW1の局在を解析した。また、SNW1の発現を抑制し、分裂期の細胞を微小管、染色体などを染色し、形態の異常を観察した。

(3). 質量分析によるSNW1結合タンパク質の同定。

SNW1と結合するタンパク質を同定するため、Flag-SNW1を恒常的に発現する293T細胞を作製した。まずpQCXIPレトロウイルスベクターにFlag-SNW1をクローニングし、それをVSV,GAG,POLなどを発現するプラスミドと一緒に293T細胞にLipofectamine2000を使って一過性に導入した。48時間後に上製を4マイクロメートルのフィルターに通し、それを293T細胞に感染させた。48時間後にピューロマイシンを用いて感染した

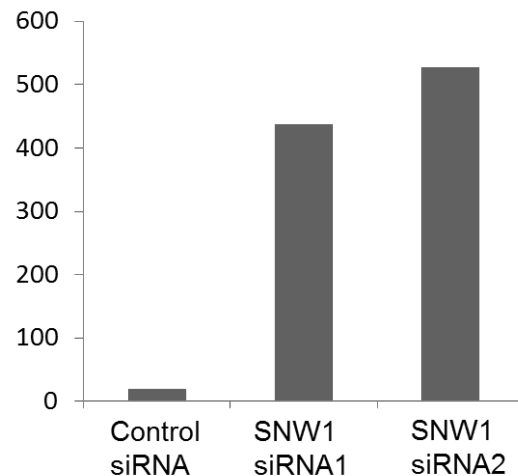
細胞を選択し、恒常的発現細胞を樹立した。

次にその細胞を15センチシャーレ3枚分に増やし、細胞抽出液を作成した。抗Flagビーズを用いてFlag-SNW1複合体を免疫沈降し、そしてタンパク質をFlagペプチドを用いて溶出した。そしてタンパク質をトリプシンで分解し、質量分析装置でタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1). SNW1の発現抑制は細胞分裂を停止し、細胞死を誘導する。

染色体を可視化したHeLa細胞にSNW1に対するsiRNAを導入し、48時間後にタイムラプス顕微鏡を用いて観察した。通常細胞は分裂期において染色体が整列した後、速やかに複製した染色体はそれぞれの娘細胞に分配されていく。しかしながら、SNW1の発現を抑制した細胞では染色体が赤道面に整列することができなかった。多くの細胞において染色体は整列することなく、娘細胞に不均等に分配されていった。また、分裂にかかる時間が顕著に長くなっていった(下の図)。

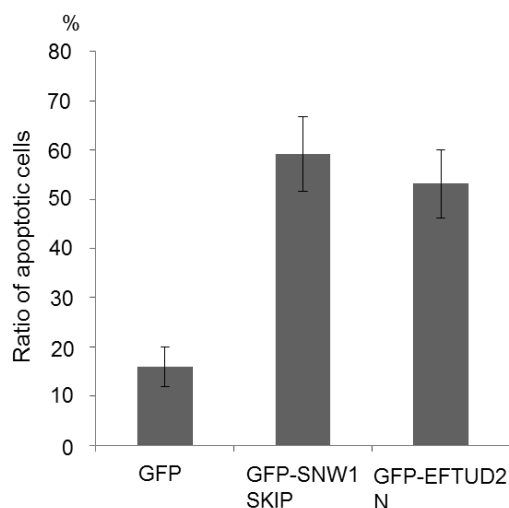


さらにSNW1の発現を抑制した細胞では分裂後に細胞死が誘導されていた。これらの結果は、SNW1が細胞分裂の進行に重要な働きを担っていることを示す。

(2). SNW1の発現抑制した細胞ではチェックポイントが働いている。

細胞分裂において染色体は赤道面に整列し、そして両極からの微小管が染色体のキネトコアに結合し、それぞれの娘細胞に分かれていく。もし染色体と微小管の結合が適切に行われなければ、チェックポイント機構が働き分裂は進行しない。SNW1の発現抑制では染色体が整列せず、分裂の進行が延長したため、チェックポイントが活性化したと考えられる。

さらに SNW1 の機能を阻害するため、SNW-SKIP や EFTUD2-N を MDA-MB-231 細胞に導入し、細胞死が誘導されるか検討した。下の図に見られるように、これらのタンパク質の発現は顕著に細胞死を誘導した。以上の結果は、SNW1 の機能阻害は、癌細胞に細胞死を誘導することを示唆する。



(6) . SNW1 と複合体を形成する BCAS2 も同様に細胞死の誘導を引き起こす。

SNW1 と結合するタンパク質の解析において、上にのべた EFTUD2 や SNRNP200 以外にも多くの RNA スプライシングに関与するタンパク質が SNW1 と複合体を形成することがわかった。その中には、BCAS2 や CDC5L などのタンパク質も存在する。まずこれらのタンパク質が SNW1 と直接結合するか検討をおこなった。しかしながら、直接的な結合は確認できなかった。しかしこれらのタンパク質は PRPF8 と結合することから、PRPF8 を介して SNW1 と複合体を形成していると考えられる。さらに BCAS2 や CDC5L が乳癌の増殖にかんよしているか検討をおこなった。MDA-MB-231、MCF7 細胞に siRNA を導入し、これらの発現を抑制し、TUNEL アッセイ、またはタイムラプス顕微鏡を用いて細胞死を調べた。その結果、SNW1 と同様に多くの細胞死が観察された。また、細胞分裂の時間が顕著に延長することが判明した。これらの結果から、SNW1 と複合体を形成する BCAS2 や CDC5L の発現抑制は、乳癌細胞に細胞死を誘導すると考えられる。

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) . 佐藤直紀、前田真男、杉山麻衣、伊藤聡子、兵頭寿典、増田章男、角田信行、國料俊夫、浜口道成、榎野正人、千賀威

Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells.

Cancer Medicine (2015) 4: 268-77

査読有

doi: 10.1002/cam4.366.

(2) . 浅野恵理、長谷川仁紀、兵頭寿典、伊藤聡子、前田真男、陳丹、高橋雅英、浜口道成、千賀威

SHCBP1 is required for midbody organization and cytokinesis completion.

Cell Cycle (2014) 13:2744-51

査読有

doi: 10.4161/15384101.2015.945840.

(3) 高原悠子、前田真男、長谷川仁紀、伊藤聡子、兵頭寿典、浅野恵理、高橋他雅英、浜口道成、千賀威

Silencing of TBC1D15 promotes RhoA activation and membrane blebbing.

Molecular and Cellular Biochemistry (2014) 389:9-16

査読有

doi: 10.1007/s11010-013-1921-2.

[学会発表] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

千賀 威 (SENGTA Takeshi)
名古屋大学大学院医学系研究科
准教授
研究者番号 : 80419431

(2) 研究分担者

増田 章男 (MASUDA Akio)
名古屋大学大学院医学系研究科
准教授
研究者番号 : 10343203