

Pre-mRNA スプライシング制御機構から解明する新しい抗がん剤耐性メカニズム

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 講師 福村 和宏

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 教授 前田 明

1. 研究の背景・目的

Pre-mRNA スプライシングは遺伝子発現において必須であり、スプライソソームと呼ばれる RNA とタンパク質の巨大複合体によって遂行される。最近、申請者は、ヒトの極端に短いイントロン (65 塩基) のスプライシング機構に着目し、新規のスプライシング因子 SPF45 を同定した。さらに、その分子機構も併せて解明した(文献 1)。興味深い事に、この SPF45 は抗がん剤耐性を獲得したがん細胞で過剰発現していることが報告されている(文献 2& 3)。また、抗がん剤耐性を持つがん細胞に SPF45 遺伝子の発現抑制を行うと耐性を消失させることができる。しかし、そのメカニズムは解明されていない。そこで、申請者は「がん細胞で過剰発現した SPF45 が、下流の短いイントロンを持つがん関連遺伝子のスプライシングを亢進することで、多種類の抗がん剤耐性を獲得するのではないか」という仮説を立て、その解明を目的としている(文献 4)。

2. 研究の対象並びに方法

(1) まず、SPF45 によってスプライシング制御される抗がん剤耐性に寄与する候補遺伝子の同定を試みる。SPF45 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞をシクロヘキシミド (NMD 阻害剤) で処理し、その HeLa 細胞の RNA-Seq を行う事で、スプライシング様式の変化を調べる。この解析により、NMD により分解されて検出できなかった遺伝子のスプライシングの変化を検出できるであろう。同時に、SPF45 を過剰発現させた培養細胞の RNA-Seq 解析を行い、SPF45 がスプライシングを促進、発現上昇させている遺伝子群を併せて同定する。SPF45 の発現抑制によってスプライシングが変化する遺伝子群と、SPF45 の過剰発現でスプライシングが変化する遺伝子群を比較して、共通する遺伝子を SPF45 に制御される「真」の遺伝子とする。同定された遺伝子について、がん関連遺伝子であるかどうか、薬剤感受性に寄与しているか調べていく。

(2) 一般的なスプライシング反応において、イントロン/エキソン境界である 3'スプライスサイトは U2AF と呼ばれるスプライシング因子によって認識される。しかしながら、SPF45 制御下の短いイントロンのスプライシングは、U2AF を必要としない(文献 1)。申請者は、SPF45 によってスプライシング制御されるイントロンの 3'スプライスサイト認識機構も併せて明らかにする。まずは、SPF45 と相互作用するタンパク質因子 X を、SPF45 の免疫沈降-質量分析 (IP-MS) によって同定する。同定した SPF45 相互作用因子 X のノックダウン実験を行い、短いイントロンのスプライシングが阻害されるかどうか RT-PCR で検証する。加

えて、その SPF45 相互作用因子 X と 3 スプライスサイトに結合を RNA 免疫沈降法 (RIP) によって明らかにする計画である。

3. 研究結果

(1) シクロヘキシミド処理を行った SPF45 ノックダウン HeLa 細胞の RNA-Seq 解析を行う実験計画であったが、SPF45 遺伝子のノックダウンとシクロヘキシミド処理は細胞へのダメージが大きく、実験が困難であった。ノックダウン後の培養時間、シクロヘキシミド処理の濃度や時間の検討も行ったが、RNA-Seq を正確に行える量の RNA 回収が難しく断念せざるを得なかった。

そこで RNA-Seq の実験計画を以下のように変更した。前述したように、がん細胞では SPF45 の過剰発現により、抗がん剤耐性が獲得されている。そこで、まず、HeLa 細胞の SPF45 の過剰発現株を創出する。その細胞にビンクリスチン処理を行ない、耐性を獲得できた細胞の RNA-Seq を行ない、スプライシングが変動する遺伝子や発現量が顕著に上昇する遺伝子群の同定を行う。現在、HeLa 細胞に Flag タグ付きの SPF45 を過剰発現株を作製中である。

(2) 我々は、SPF45 の相互作用因子として SAP30BP という因子を同定した。SAP30BP は、元々 HSV1 (Herpes Simplex virus 1) に感染した際に発現上昇する遺伝子として同定された (文献 5)。SAP30BP は、スプライシング反応を触媒するスプライソソームに含まれていることがわかっているが、その機能はわかっていない。我々は HeLa 細胞を用いて、siRNA による SAP30BP ノックダウンを行なった。SAP30BP 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞と SPF45 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞の RNA-seq を行ない、スプライシングが阻害されるイントロンを比較すると、そのほとんどが共通であった。このことから、SAP30BP は SPF45 と協調して、短いイントロンのスプライシングを制御していると考えられる。さらに、SAP30BP と SPF45 のリコンビナントタンパク質を精製し、相互作用を調べて結果、直接結合する事も併せて見出した。今後さらに、このメカニズムの解明を進めていく予定である。

4. 考察

がん細胞で過剰発現した SPF45 が、下流の短いイントロンを持つがん関連遺伝子のスプライシングを亢進することで、多種類の抗がん剤耐性を獲得するのではないかと考えられるが、残念ながらまだ研究途中である。しかしながら、現在進行中である抗がん剤耐性を持った SPF45 の過剰発現株の構築とそのトランスクリプトーム解析によって明らかにする事ができるであろう。さらに、本研究で同定した SPF45 の相互作用因子 SAP30BP は SPF45 と協調してスプライシング制御する事から、SAP30BP 自身も抗がん剤耐性遺伝子なのではないかと考えられる。我々は、SAP30BP を過剰発現させた HeLa 遺伝子でも抗がん剤耐性を獲得できるかどうか解析を進める予定である。

5. 文献

1. Fukumura K, Yoshimoto R, Sperotto L, Kang HS, Hirose T, Inoue K, Sattler M, Mayeda A. SPF45/RBM17-dependent, but not U2AF-dependent, splicing in a distinct subset of human short introns. Nat Commun. 2021; 12: 4910.

2. K. Fukumura, J.P. Venables, A. Mayeda. SPF45/RBM17-dependent splicing implicated in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Mol. Cell. Oncol.*, in press.

3. Sampath J, Long PR, Shepard RL, Xia X, Devanarayan V, Sandusky GE, Perry WL, III, Dantzig AH, Williamson M, Rolfe M, Moore RE. Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1781-1790.

4. Perry WL, III, Shepard RL, Sampath J, Yaden B, Chin WW, Iversen PW, Jin S, Lesoon A, O'Brien KA, Peek VL, Rolfe M, Shyjan A, Tighe M, Williamson M, Krishnan V, Moore RE, Dantzig AH. Human splicing factor SPF45 (RBM17) confers broad multidrug resistance to anticancer drugs when overexpressed—a phenotype partially reversed by selective estrogen receptor modulators. *Cancer Res.* 2005; 65: 6593-6600.

5. Jian-Feng Li 1, Long-Ding Liu, Shao-Hui Ma, Yan-Chun Che, Li-Chun Wang, Cheng-Hong Dong, Hong-Ling Zhao, Yun Liao, Qi-Han Li. HTRP--an immediate-early gene product induced by HSV1 infection in human embryo fibroblasts, is involved in cellular co-repressors. *J Biochem.* 2004 Aug;136(2):169-76.

6. 論文出版・学会発表

Kazuhiro Fukumura, Rei Yoshimoto, Tetsuro Hirose, Kunio Inoue, Akila Mayeda1.

Novel pre-mRNA splicing mechanism discovered in human short introns 第44回日本分子生物学会年会 (2021)