

成熟 mRNA 再スプライシングに由来する 癌細胞特異的異常転写産物の網羅的探索

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

研究目的

真核生物では、新たに転写された mRNA 前駆体の大多数はイントロンと呼ばれる介在配列により分断されている。mRNA が蛋白質合成の鋳型である故に、スプライシング反応において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られなければならない。癌はジェネティック及びエピジェネティックな異常の蓄積によって発生・進展すると考えられているが、様々なスプライシング異常も同時に起きている事がよく知られている。我々は異常転写産物を作る一つの要因としてまったく新しい、成熟 mRNA 再スプライシングが癌細胞特異的に起きている事を証明し報告した (Kameyama *et al.*, NAR. 2012)。この事は正常細胞では未知のスプライシング終結機構が細胞の癌化により破綻するという可能性を示唆している。本研究ではその破綻の影響として癌細胞でより多くの成熟 mRNA で再スプライシングが生じているはずと予想し、独自に開発したスプライシング中間 (副) 産物濃縮法と次世代シーケンサーによる解析を組み合わせ用い、癌細胞特異的異常スプライシング産物を網羅的に探索し、その中からユニークな新規腫瘍マーカーを探す。また、スプライシング終結機構が破綻した場合、広範にその影響が及ぶことからどのような因子が再スプライシングに影響を及ぼすのか、さらに細胞のがん化で破綻するスプライシング終結機構の実体は何なのかについて明らかにする必要がある。

研究結果と考察

スプライシング中間 (副) 産物である投げ縄状 RNA は、スプライシング反応の 1 段階目においてイントロンの 5' スプライス部位の G がイントロン中の A と 2'5'-ホスホジエステル結合を形成することで投げ縄状の構造をとる (イントロン中のこの A をブランチ部位と呼ぶ)。大腸菌由来の RNA 分解酵素の一つ RNase R は 3'-5' エキソヌクレアーゼであり線状のほとんどの RNA を分解する。投げ縄状 RNA も 3' 末端はホスホジエステル結合のあるブランチ部位まで分解されるが、環状部分は分解されずに残る。この性質を利用してヒ

ト正常前立腺上皮細胞およびヒト前立腺癌細胞 DU145 の全 RNA から投げ縄状 RNA を濃縮した後、次世代シーケンス解析用ライブラリーを構築、パイロット的に配列を解読した (Lariat-seq)。詳細は現在解析中であるが、癌細胞で成熟 mRNA 再スプライシングを受ける mRNA を効率よく探索するにはさらに RNase R 処理の条件検討を行う必要がある結果であった。今後 RNase R 処理条件をさらに検討し成熟 mRNA 再スプライシングにより生じるトランスクリプトーム異常を詳細に解析していく予定である。

一方、成熟 mRNA 再スプライシングに影響を及ぼす因子については興味深い知見が得られた。がん組織の内部は低酸素環境となっているが、低酸素下は癌細胞の治療抵抗性や転移の誘発など様々な問題となっている。我々は、この低酸素環境が成熟 mRNA 再スプライシングに対してどのような影響を及ぼすか検討した。乳癌由来 MCF-7 及び Hcc1428 細胞に対し CoCl₂ 処理により擬似的に低酸素ストレスを与え、リアルタイム PCR により TSG101 遺伝子の異常産物を定量した。その結果、TSG101 異常産物の正常産物に対する比率は MCF-7 と Hcc1428 細胞でそれぞれ最大 1.6 倍、3.6 倍に増大していた (図 1)。そこで、低酸素ストレスで発現誘導され

る因子を探したところ、RNA ヘリカーゼであり HIV-1 mRNA の核外輸送などにも関与することが知られている DDX3 が低酸素ストレスにより発現が誘導されるという報告があることがわかった (Bollagunta *et al.*, PLOS one. 2011)。

正常乳腺上皮細胞 (HMEC) と MCF-7 細胞で DDX3 の発現量を定量比較したところ、がん細胞である

MCF-7 の方が正常細胞より 1.8 倍と発現量が多いことがわかった。siRNA による DDX3 のノックダウン実験を行ったところ、コントロールに対して最大 0.6 倍と弱いながらも TSG101 の異常産物の低下を引き起こしていることが明らかとなった。今後は再スプライシング制御機構における DDX3 の効果を mRNA 核外輸送等の観点からもより詳細に明らかにすると共に、低酸素ストレスにより発現変動する遺伝子を RNA-seq により網羅的に探索し、スプライシング反応停止機構にかかわり、成熟 mRNA 再スプライシングに影響を及

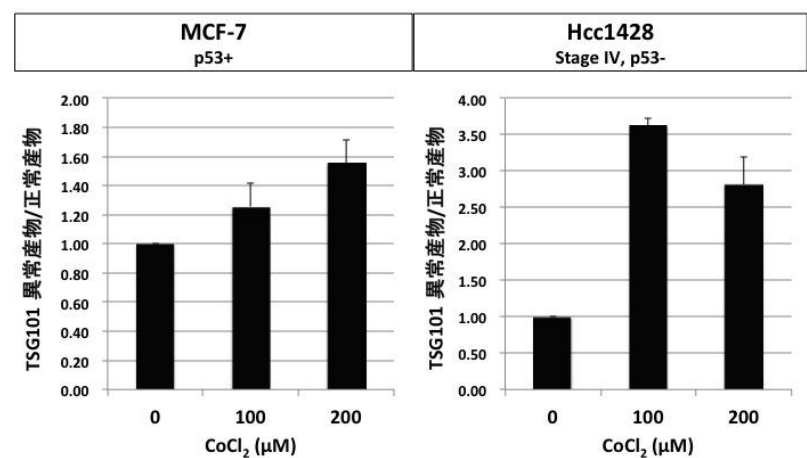


図1 低酸素ストレスによるTSG101 mRNA再スプライシングへの影響

ぼす因子の実体をつきとめその作用機構を明らかにしたいと考えている。さらに、Lariat-seqを正常細胞と癌細胞の比較だけでなく低酸素ストレスを与えた条件下のものとも比較していきたいと考えている。こうすることで、がん組織内低酸素環境による治療抵抗性や転移誘発などを引き起こす原因となる異常トランスクリプトームの新側面を見いだすことが出来るのではないかと考えられる。