

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とその制御機構の解析

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

1. 研究の背景・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おり、癌特異的な異常遺伝子発現を網羅的に解析することは変異の解析と共に今後重要な課題と考えられる。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^{1,2}。実は正常細胞においても多段階でスプライシングが起きることが最近明らかになってきたが、正常細胞では多段階でスプライシングが起きるのはあくまでもイントロン内であり mRNA になった後は必要以上にスプライシングされることはない³。が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。さらに未知のスプライシング終結機構(成熟 mRNA 再スプライシング制御因子)を明らかにする為に、成熟 mRNA 再スプライシングに影響を及ぼす細胞外因子の探索を行い、次世代シーケンサーによる RNA-seq により癌細胞特異的に発現亢進(減少)する遺伝子群の中から成熟 mRNA 再スプライシング制御因子の探索を行った。

2. 材料と方法

正常ヒト前立腺上皮細胞(PrEC)、正常ヒト膀胱上皮細胞(HBEC-A)はそれぞれ Lonza 社、KURABO 社より購入した。ヒト前立腺癌細胞DU145、ヒト膀胱癌細胞T24、5637は理研細胞バンクより分与を受けた。ヒト膀胱癌細胞 RT4 は ATCC より購入した。また、ヒト急性骨髄性白血病細胞 NKM-1 は JCRB 細胞バンクより分与を受けた。

RNA 精製及び定量 RT-PCR

全 RNA は培養細胞から TRI 試薬(SIGMA)及び Pure Link RNA mini キット(Thermo Fischer Scientific)によって精製を行い、Bioanalyzer 2100 RNA6000 ナノキットを用いて RNA 品質のチェックを行った。全 RNA は Prime Script II 1st Strand Synthesis Kit (タカラバイオ)を用いて cDNA 合成反応を行い、逆転写後 RNase H 処理を行い、RNA 鎖を分解除去した。定量 PCR は KAPA SYBR Fast qPCR キット(日本ジェネティクス)を用い、イルミナ Eco Real-Time PCR System により解析した。得られた定量 PCR データはさらに qbase+(biogazelle)によって解析した。

RNase R 処理

全 RNA 5 μ g は 65 $^{\circ}$ C 10 分熱変性し急冷後、20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.25 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 μ g RNase R (マイアミ大学 Dr. Malhotra より贈与を受けた)を含む反応液中で 37 $^{\circ}$ C 1 時間処理した。RNase R 処理を行った RNA は RNA Clean & ConcentratorTM-5 キット(ZYMO RESEARCH)により精製した。

RNA シークエンス

RNA-seq に用いるライブラリーは NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina により調整を行い、Bioanalyzer 2100 High Sensitivity DNA キットにより品質チェック、KAPA Library Quantification Kit(日本ジェネティクス)により定量を行った。調整したライブラリーはイルミナ HiSeq1500 を用い、100bp ペア-エンドでシークエンスした。得られたシークエンスデータは CLC Genomics Workbench (CLC bio, QIAGEN) 及び TopHat-Fusion プログラムにより解析した。

3. 結果

(1) 投げ縄状 RNA の網羅的解析

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、次世代シークエ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)。得られた配列をマッピングしたところ、イントロン投げ縄状 RNA の配列よりも、むしろそれとは無関係の短鎖 RNA 配列が大量に読まれていることが判った。これらの配列の多くは、核内に大量に存在する snRNA であった。おそらく強く RNA の二次構造をとっており、その為 RNase R による分解を逃れたのではないかと考えられる。

(2) 膀胱癌における成熟 mRNA 再スプライシングとシスプラチンの成熟 mRNA 再スプライシングに対する影響

これまで、TSG101 遺伝子産物上に起こる成熟 mRNA 再スプライシングは乳癌由来の MCF-7 細胞を用いて証明を行ってきた。また同様の癌細胞特異的な異常スプライシング産物は乳癌の他前立腺癌、急性骨髄性白血病、子宮頸癌など様々な癌で報告されていた。今回膀胱癌でも同様の TSG101 mRNA 再スプライシングが起こっているか否かの確認を行った。正常ヒト膀胱上皮細胞(HBEC-A)においては TSG101 の mRNA 再スプライシングは生じていなかったが、膀胱癌細胞では解析した T24、5637、RT4 の全ての細胞で TSG101 の mRNA 再スプライシングが起こっていた。

これまでの研究から TSG101 の異常スプライシングの発生は低酸素ストレス、放射線照射など様々なストレスにより影響を受けることがわかっている。今年度我々は膀胱癌の治療にも一般的に用いられ、DNA 損傷を引き起こすことが知られるシスプラチンにより TSG101 の再スプライシング効率が影響を受けるか検証した。その結果、p53 遺伝子に変異を持つ T24 及び 5637 細胞株においてはシスプラチン処理後 3 日目で約 2 倍と顕著な TSG101 の再スプライシング産物の蓄積が認められた。さらにシスプラチン添加後さらに 2 週間とより長期間培養を続けると TSG101 の再スプライシング産物はコントロールの 4 倍以上とさらにその影響が増大していた。一方、p53 遺伝子が正常である RT4 細胞においてはシスプラチン添加後むしろ TSG101 の再スプライシング産物は減少していた。

(3) RNA-seq による急性骨髄性白血病の新規融合遺伝子産物の探索

癌細胞特異的な異常転写産物の網羅的解析を行う一環として、我々は 本学血液内科学講座との共同研究により急性骨髄性白血病の RNA-seq 解析を行った。その結果、*DEK-NUP214* を持つ AML 患者検体からさらに *NUP214-RAC1* 融合遺伝子産物と *RAC1-COL12A1* 融合遺伝子産物を⁴、*NUP98-HOXA9* を持つ AML 患者の再発時に *ETV6-LPXN* 融合遺伝子産物を⁵、*t(4;12)(q12;p13)* の転座を有する AML 患者から *ETV6-CHI2* 融合遺伝子産物の他に *GSX2ap-ETV6* 融合遺伝子産物⁶ と複数の新規な融合遺伝子産物を発見することができた。

4. 考察

投げ縄状 RNA の網羅的解析は予期しない配列ばかりがシーケンスされ、解析が困難な状況となっている。現在 RNase R の精製度の問題から、反応条件(特に RNA 二次構造を解消する熱変性等)、細胞から全 RNA を精製する際の微量 RNase のコンタミネーションからニックなど RNA に傷が入らず完全な環状 RNA きちんと精製できているかなどまで詳細かつ徹底的に条件を洗い直しているところである。

投げ縄状 RNA の網羅的解析が困難な状況に直面している一方で、成熟 mRNA 再スプライシングに影響を及ぼす因子に関しては昨年報告した低酸素ストレス以外にも、今回新たにシスプラチンが mRNA 再スプライシングに影響を及ぼしているがわかってきた。現在低酸素ストレス、シスプラチン処理をした細胞(正常型 p53 を持つ RT4 及び変異 p53 を持つ T24)のトランスクリプトーム解析を行っており、それら処理により発現量の変化する遺伝子の中から成熟 mRNA 再スプライシング制御因子の候補を探索していく。また、シスプラチンは現在も広範に使用される抗癌剤であるが、抗癌効果と同時に副作用や抵抗性細胞の出現など未説明の問題も存在する。一連の RNA-seq 解析によりシスプラチン応答遺伝子を網羅的に明らかにすることで、副作用やシスプラチン抵抗性獲得につながる遺伝子群の解明にもつながると期待している。

5. 文献

1. Toshiki Kameyama, Hitoshi Suzuki and Akila Mayeda (2012). Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Research*. 40. 7896-7906.
2. 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しくみを「mRNA 再スプライシング」現象から探る *ファルマシア* **51**(1), 22-26
3. Hitoshi Suzuki, Toshiki Kameyama, Kenji Ohe, Toshifumi Tsukahara and Akila Mayeda (2013). Nested introns in an intron: Evidence of multi-step splicing in a large intron of the human dystrophin pre-mRNA. *FEBS letters*. 587. 555-561
4. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Kanie T, Tsuzuki M, Akatsuka Y, Mizuta S, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2015). NUP214-RAC1 and RAC1-COL12A1 Fusion in Complex Variant Translocations Involving Chromosomes 6, 7 and 9 in an Acute Myeloid Leukemia Case with DEK-NUP214. *Cytogenetic and genome research* 146(4) 279-284
5. Abe A, Yamamoto Y, Iba S, Kanie T, Okamoto A, Tokuda M, Inaguma Y, Yanada M, Morishima S, Mizuta S, Akatsuka Y, Okamoto M, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2016). ETV6-LPXN fusion transcript generated by t(11;12)(q12.1;p13) in a patient with relapsing acute myeloid leukemia with

NUP98-HOXA9. *Genes, chromosomes & cancer* 55(3) 242-250

6. Abe A, Mizuta S, Okamoto A, Yamamoto Y, Kameyama T, Mayeda A, Emi N. (2016). Transcriptional activation of platelet-derived growth factor receptor α and GS homeobox 2 resulting from E26 transformation-specific variant 6 translocation in a case of acute myeloid leukemia with t(4;12)(q12;p13). *International journal of laboratory hematology*. 38. e15-e18.