

# 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いる。癌細胞特異的に存在し、全身正常組織に存在しない異常蛋白質分子は腫瘍マーカーとして癌の早期診断に有用であると共に、それが癌細胞の増殖・浸潤に関与していれば治療の標的分子としても期待される。次世代シーケンス技術による網羅的な解析から、ある種の癌でスプライシング調節に関わる複数の因子に変異が見つかる (K. Yoshida et al., 2011. Nature) 等、近年癌特異的異常スプライシングが注目されている。

我々は最近、癌細胞で既にスプライシングが完結したはずの成熟 mRNA が繰り返しスプライシングされることにより異常転写産物が生じてしまうという『癌細胞における成熟 mRNA 再スプライシング現象』を発見し報告した (T. Kameyama et al., 2012. Nucleic Acids Res.)。mRNA 再スプライシング現象は最初癌感受性遺伝子 TSG101 で起きることを証明したが、後に全く別の癌抑制遺伝子 FHIT においても生じていることを発見し証明した。TSG101 遺伝子では潜在的なスプライス部位を用いて成熟 mRNA が再びスプライシングされている。正常細胞においても多段階で繰返しスプライシングが起きる現象が既に知られており、網羅的 RNA-seq 解析からまた最近注目を集めている (Suzuki et al., 2016. Int. J. Mol. Sci.; Sibley et al., 2015. Nature; Duff et al., 2015. Nature; Suzuki et al., 2013. FEBS Letters.)。ここで注目すべき点は正常細胞における多段階スプライシングの最終産物はあくまでも mRNA である。この最終産物の点において正常細胞で生じている現象は、成熟 mRNA が再スプライシングされてしまうことで異常産物を生成する癌細胞での現象と決定的に異なる。このことから、正常細胞にはスプライシング反応が終結した成熟 mRNA を認識し、過

剰にスプライシングされ無い為のスプライシング反応終結機構が存在する事、癌細胞ではそのスプライシング反応終結機構が破綻している事が示唆される。成熟 mRNA 上には多数のスプライス部位に成り得る配列 (GU-AG) が存在する事から、このスプライシング反応終結機構の破綻は大規模なトランスクリプトームの破綻を招き、細胞にとって重大な影響を及ぼすことが予想される。そこで我々はスプライシング反応終結機構の実体は何か、成熟 mRNA 再スプライシングを制御する因子の探索を行った。

## 2. 研究方法

mRNA 再スプライシング調節因子の発現を考えると表 1 に示すように、mRNA 再スプライシング促進因子であれば正常細胞に比べ癌化した細胞及び高悪性度 (治療抵抗性獲得細胞) でより高発現していると予測され、反対に mRNA 再スプライシング抑制因子であれば正常細胞に比べ

細胞	候補因子	実験系	再スプライシング活性変化
正常細胞・低悪性度細胞	再スプライシング促進因子	過剰発現	- → ++
	再スプライシング抑制因子	ノックダウン	(+ → +++)
腫瘍細胞・高悪性度細胞	再スプライシング抑制因子	過剰発現	++ → -
	再スプライシング促進因子	ノックダウン	(+++ → +)

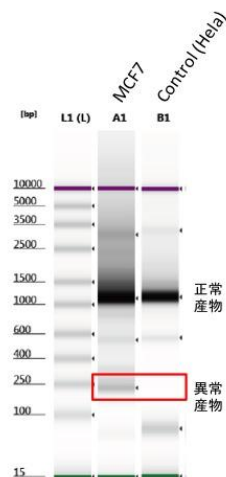


図1. 再スプライシング制御因子スクリーニング法

癌化細胞及び高悪性細胞で発現が低下していると予測される。また、想定される mRNA 再スプライシング制御因子はスプライシング反応中及び反応後に mRNA に結合しているはずと考えられる (図 1)。

そこで我々は TSG101 遺伝子の mRNA 再スプライシングが非常に低頻度でしか起きていない HeLa 細胞を用い、RNA 結合タンパク質に対する siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングを行った。

## 3. 研究結果

我々はまず RNA 結合タンパク質 156 遺伝子に対する siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングを行い mRNA 再スプライシング抑制因子の探索を行った (図 1)。TSG101 遺伝子の mRNA 再スプライシングが非常に低頻度でしか起きていない HeLa 細胞に 156 種の siRNA をそれぞれトランスフェクションした後 RNA を精製、RT-PCR により TSG101 の再スプライシング産物の増加が見られるものを探した。156 種の siRNA のスクリーニングの結果、7 つの siRNA によって TSG101 の異常転写産物が誘導される事を見いだした (図 2)。

各異常転写産物の配列を解析したところ、4 つの異常スプライシングのパターンに分類

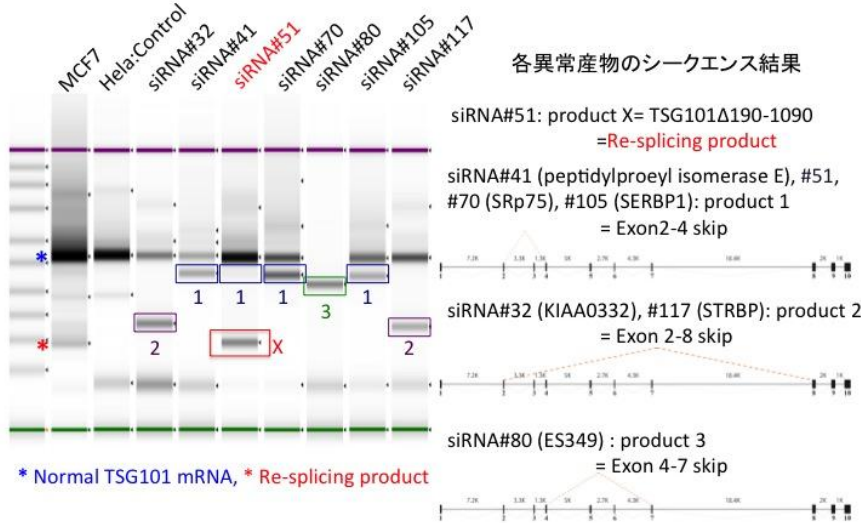


図2. siRNAライブラリースクリーニング  
異常スプライシングを引き起こす因子とそのノックダウンの結果  
生じる異常スプライシング産物

された (図2)。まず、siRNA#41、#51、#70、#105 のトランスフェクションによって引き起こされる異常産物1はエクソン3を飛ばしてエクソン2と4が連結されるエクソンスキッピングであった。また、siRNA#32、#117によって引き起こされる異常スプライシング産物

物はエクソン3から7を飛ばすマルチエクソンスキッピング、siRNA80によって引き起こされる異常スプライシング産物はエクソン5と6をスキップするマルチエクソンスキッピングであった。

一方、siRNA#51によって引き起こされる主要な異常スプライシング産物Xをシーケンシングしたところ、901塩基欠損するTSG101Δ190-1090であり、これはまさにTSG101 mRNAが再スプライシングされて出来た異常産物であると考えられた。

そこで、次にsiRNA#51の抑制する遺伝子 (*gene#51* とする) について新たに2種類 siRNAを合成し、別の頭頸部がん由来細胞株であるTW01細胞にトランスフェクションしTSG101 mRNAの再スプライシングが促進されるのかの確認を行ったところ、確かにこの*gene#51* 遺伝子のノックダウンによりTSG101 mRNAの再スプライシングが促進されていることが明らかとなった (図3)。

現在、*gene#51* 遺伝子の過剰発現実験を行うと共に、どのようなメカニズムで mRNA再スプライシングを制御しているのか詳細な解析をさらに進めているところである。

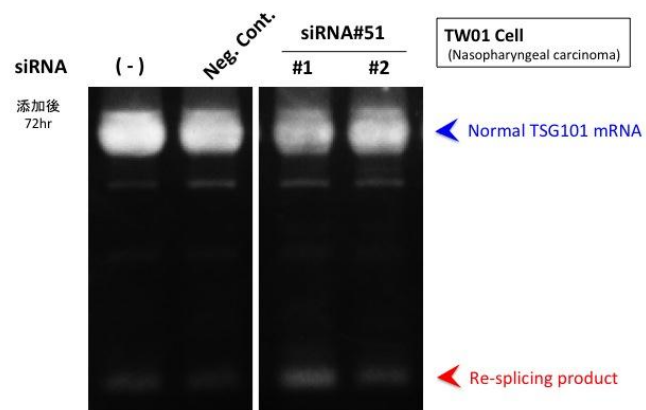


図3. TW01細胞でのsiRNA#51ノックダウンはTSG101 mRNA再スプライシングを促進する

#### 4. 考察

今回 RNA 結合タンパク質に対する siRNA ライブラリーの網羅的スクリーニングにより TSG101 mRNA の再スプライシングを制御する因子の候補を得ることが出来た。HeLa 細胞及び TW01 細胞において、この *gene#51* 遺伝子のノックダウンは TSG101 mRNA の再スプライシングを促進していることから、この *gene#51* 遺伝子は mRNA 再スプライシング抑制因子として機能していると考えることが出来る。

また、最近この *gene#51* 遺伝子は正常組織では広範な発現が認められるが細胞のがん化と共にその発現が低下することが報告されている。また、がん関連遺伝子の選択的スプライシングに関与し、それによりがん細胞のアポトーシス誘導、細胞増殖抑制、転移能の抑制に関与するという癌抑制遺伝子としての働きも注目されつつある。mRNA 再スプライシングは細胞のがん化・悪性化と共に促進されるが、一方で *gene#51* 遺伝子がん化によりその発現が消失する。この癌抑制遺伝子 *gene#51* の発現変化と mRNA 再スプライシングの有無との相関は *gene#51* 遺伝子が mRNA 再スプライシング抑制因子であるということをサポートする事実であると考えられる。*gene#51* 遺伝子はスプライシング制御因子としてだけでなく、最近では翻訳、miRNA による遺伝子サイレンシングや核内外への mRNA 輸送にも関与するなど多彩な機能を持つタンパク質であると言われている。今後、この *gene#51* 遺伝子がどのように mRNA 再スプライシングを制御するのかの詳細を明らかにすることが重要な課題である。

#### 5. 文献

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.

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

Hitoshi Suzuki \*, Yoshitsugu Aoki, Toshiki Kameyama, Takashi Saito, Satoru Masuda, Jun Tanihata, Tetsuya Nagata, Akila Mayeda, Shin'ichi Takeda, Toshifumi Tsukahara. (2016). Endogenous Multiple Exon Skipping and Back-splicing at the DMD Mutation Hotspot. *International Journal of Molecular Science*. 17, 1722

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

Kenichi Yoshida et al., (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69

Christopher R. Sibley et al., (2015). Recursive splicing in long vertebrate genes. *Nature* **521**, 371–375

Michael O. Duff et al., (2015). Genome-wide identification of zero nucleotide recursive splicing in *Drosophila*. *Nature* **521**, 376–379