

がん抑制因子によるスプライシング 大規模破綻の抑制を検証する

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 教授 前田 明
共同研究者： 藤田保健衛生大学・医学部・腎泌尿器外科学講座 教授 白木 良一

1. 研究の背景・目的

私たちは癌細胞で見られる大規模なプロテオーム異常は、ゲノム変異だけではまったく説明できないが、その主たる原因がスプライシング制御のグローバルな破綻であるという仮説を提起した。その発端となったのは、癌細胞でスプライシングされた成熟 mRNA が、再びスプライシングされ、異常な

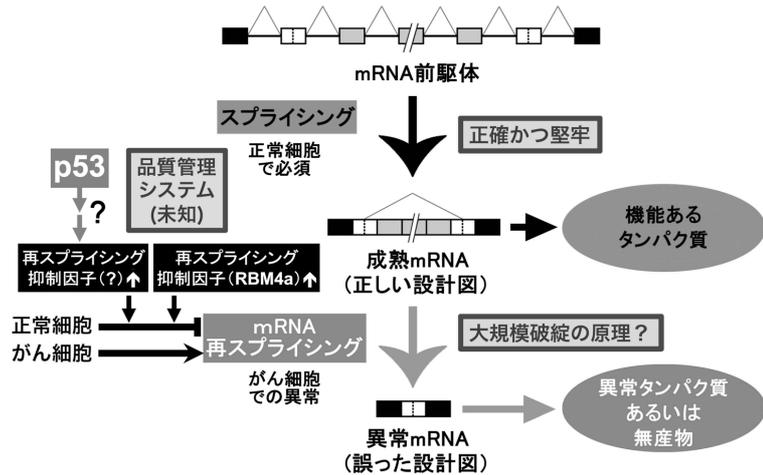


図1 遺伝子発現系における mRNA 再スプライシング現象の意義

mRNA 産物が生成しているという発見であり、TSG101 遺伝子をモデルとして、その現象の証明に成功した[1, 2]。この『成熟 mRNA の再スプライシング』現象は癌細胞でのスプライシングのグローバルな破綻を矛盾なく説明できるだけでなく、正常細胞ではこの異常な再スプライシングが抑制されているという mRNA 品質管理機構の存在を示唆し、生物学的にも重要な知見である (図1)。

最近、癌特異的な再スプライシングを証明するのに私たちが用いた TSG101 mRNA の再スプライシング産物 TSG101 Δ 154-1054 (以後 TSG101 Δ) の癌に関連する機能が報告された[3]。また、この再スプライシング現象が、癌抑制因子 p53 によって抑制されることがわかり[3]、このプロジェクトは、きわめて重要な意義を有する新たな展開を迎えている。

2. 研究の対象ならびに方法

スプライシング産物は、ヒト培養細胞 (HeLa, MCF7, TW01) を用い、内在性 TSG101 遺伝子の転写物を、部位特異的な DNA プライマーを用い RT-PCR で解析した。ヒト RNA 結合蛋白質に対する siRNA ライブラリーは、廣瀬哲朗教授 (北海道大学) より分与していただき、HeLa 細胞を用い、RNA 結合蛋白質の発現抑制を行った。RBM4a 因子の過剰発現は、上記の培養細胞を RBM4a 発現プラスミドで形質転換した。培養細胞内での mRNA

発現はノーザン・ブロットィングで、蛋白質の発現はウエスタン・ブロットィングで確認した。

3. 研究結果

(1) mRNA 再スプライシング抑制因子として RBM4a を同定した

私たちは 156 種類の RNA 結合蛋白質の siRNA ライブラリーを用いた網羅的ノックダウン実験を行い、1つの因子 RBM4a のノックダウンが TSG101 mRNA 再スプライシングを顕著に活性化することが

表1 mRNA 再スプライシング抑制・促進因子の検証実験

細胞	再スプライシング活性の変化		因子	実験	
正常細胞 (HMEC等)	-	⇒	++	再スプライシング 促進因子候補	遺伝子 導入
				再スプライシング 抑制因子候補	遺伝子 ノックダウン
癌細胞 (TW01等)	++	⇒	-	再スプライシング 促進因子候補	遺伝子 導入
				再スプライシング 抑制因子候補	遺伝子 ノックダウン

わかった[f, g]。RBM4a は、癌抑制因子として知られており、実際に正常組織では高発現し、進行癌では殆ど発現していない[4]。よって RBM4a 蛋白質は正常細胞において異常な mRNA 再スプライシングを抑制している極めて有力な候補因子である。RBM4a 蛋白質が mRNA 再スプライシング抑制因子であるかどうかを確認した (表1)。再スプライシング活性が強い咽頭癌細胞 (TW01) で、RBM4a を過剰発現させると、mRNA 再スプライシングが抑制された[f, g]。しかし正常な乳腺上皮細胞 (HMEC) における RBM4a の発現を siRNA でノックダウンしても、mRNA 再スプライシングが誘導されなかった。この結果は、正常細胞で mRNA 再スプライシングを抑制している因子は RBM4a 以外にも存在する事を示唆する。

(2) mRNA 再スプライシングを抑制している RBM4a 以外の因子が存在する

p53 野生型の細胞株で mRNA 再スプライシングが起こり、p53 変異型の細胞株で mRNA 再スプライシングが起こっていないケースがあるので、RBM4a 蛋白質の発現は、p53 の直下で制御されているとは考えにくい。RBM4a の発現が、p53 に依存しないならば、p53 によって抑制される mRNA 再スプライシングには、RBM4a 以外の因子が関与していることが予想できる (図1)。p53 の制御下にある mRNA 再スプライシング抑制因子を探索する必要がある。MDM2 阻害剤で p53 を安定化させると mRNA 再スプライシングが顕著に抑制されることがわかった。その条件でマイクロアレーを行い、発現変動の見られた RNA 結合タンパク質やスプライシング関連因子を選び出した。それらの因子に対する siRNA を用い、mRNA 再スプライシングを指標としてスクリーニングを行った。予備的な結果ではあるが、スプライシング完了後の成熟 mRNA に特異的に結合する複合体 EJC (exon junction complex) の中核因子が同定された。

4. 考察

私たちの発見した癌特異的な mRNA 再スプライシング現象が、よく知られた癌抑制因子である p53 と RBM4a に深く関わる事実は、興味深く重要である。なぜなら、私たちは正常細胞で異常な mRNA 再スプライシングを抑制しているという状況証拠を得ており、その解明が発癌の抑制につながると考えられるからである。

興味深いことに RBM4a 因子は、グローバルに癌関連 mRNA 前駆体の選択的スプライシングを種々の様式で変化させることが知られている[4]。エクソン除外や遠位 5' 及び 3' スプライス部位選択を促進する場合は、塩基配列特異的に mRNA 前駆体の特定の部位に結合することが必要であることが示されているが、mRNA 再スプライシング抑制のメカニズムは当然のことながら未知である。mRNA 再スプライシングのモデルである TSG101 mRNA への RBM4a の結合が、癌細胞での mRNA 再スプライシングの抑制に必要なかどうかを、抗-RBM4a 抗体を用いた免疫沈降後の RT-PCR、そして結合部位に変異を導入した mRNA のスプライシング解析などで明らかにしたい。また他のスプライシング因子との相互作用は、免疫沈降解析で調べることができる。

マイクロアレーを用いた探索と siRNA を用いた mRNA 再スプライシング活性を指標にしたスクリーニングで、RBM4a 以外の mRNA 再スプライシング抑制因子候補として、EJC の中核因子が同定できた。EJC はスプライシング依存的に成熟 mRNA に結合するので、EJC が再スプライシングを阻害するのは好都合である。EJC がスプライシング完了のシグナルになっていると仮定すれば、EJC が結合しなければ、mRNA はスプライシングが未完了と認識され、再スプライシングされるという合理的なシナリオである。EJC 中核因子がどのように mRNA 再スプライシングの抑制に関わっているかをぜひ解明したい。

最終的な課題でもあるが、mRNA 再スプライシング制御によるトランスクリプトーム正常化は、はたして発癌の抑制に関わっているだろうか？ 興味深いことに、癌細胞で RBM4a を過剰発現させるとスプライシング因子 SRSF1 の発現抑制を起し、細胞増殖が低下する事実がある[4]。SRSF1 は、癌細胞で発現上昇しているだけでなく、過剰発現で癌化を引き起こす癌遺伝子産物でもある[5]。mRNA 再スプライシング抑制と発癌抑制の関係を明らかにするには、まず mRNA 再スプライシング抑制因子（RBM4a と EJC 中核因子）の過剰発現による全転写物の変化を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析（RNA-Seq）する必要がある。この際、癌に関連する因子の変化も注目したい。さらには、p53 の支配する遺伝子を調査すれば、細胞増殖の抑制につながるすべての過程が明らかになるだろう。これらの研究を通して、再スプライシングの正しい制御が mRNA の品質管理を通してトランスクリプトームの正常化をもたらし、その結果、癌を抑制しているという魅力的な仮説を検証していきたい。

5. 文献

1. T. Kameyama, H. Suzuki, A. Mayeda: Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Res.* **40**: 7896–7906 (2012).
2. 亀山 俊樹, 前田 明: がん細胞で異常なタンパク質が作られる仕組みを「mRNA再スプライシング」現象から探る. *ファルマシア* **51**: 22–26 (2015).
3. H.H. Chua, C.S. Huang, P.L. Weng, T.H. Yeh: TSG Δ 154-1054 splice variant increases TSG101 oncogenicity by inhibiting its E3-ligase-mediated proteasomal degradation. *Oncotarget* **7**: 8240–8252 (2016).
4. Y. Yang, D. Chen, H. Qian, Y.S. Tsai, S. Shao, Q. Liu, D. Dominguez, Z. Wang: The splicing factor RBM4 controls apoptosis, proliferation, and migration to suppress tumor progression. *Cancer Cell* **26**: 374–389 (2014).
5. R. Karni, E. de Stanchina, S.W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, A.R. Krainer: The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 185 (2007).

6. 論文出版・学会発表

(1) 論文発表

- a. T. Kameyama, H. Suzuki, A. Mayeda: Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Res.* **40**: 7896–7906 (2012).
- b. H. Suzuki, T. Kameyama, K. Ohe, T. Tsukahara, A. Mayeda: Nested introns in an intron: Evidence of multi-step splicing in a large intron of the human dystrophin pre-mRNA. *FEBS Lett.* **587**: 555–561 (2013).
- c. 亀山 俊樹, 前田 明: がん細胞で異常なタンパク質が作られる仕組みを「mRNA再スプライシング」現象から探る. *ファルマシア* **51**: 22–26 (2015).
- d. K. Fukumura, S. Wakabayashi, N. Kataoka, H. Sakamoto, Y. Suzuki, K. Nakai, A. Mayeda, K. Inoue: The exon junction complex controls the efficient and faithful splicing of a subset of transcripts involved in mitotic cell-cycle progression. *Int. J. Mol. Sci.* **17**: E1153 (2016).

- e. K. Fukumura, K. Inoue, A. Mayeda: Splicing activator RNPS1 suppresses errors in pre-mRNA splicing: A key factor for mRNA quality control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**: 921–926 (2018).

(2) 学会発表

- f. T. Kameyama, K. Fumura, K. Inoue, T. Hirose, A. Mayeda: A repressor candidate of cancer specific mRNA re-splicing: a key factor for splicing fidelity or mRNA quality control. The 22th Annual Meeting of the RNA Society (#615) / International Symposium on the Hallmarks of Cancer: Focus on RNA (#20), Prague, Czech Republic (2017).
- g. 亀山 俊樹, 福村 和宏, 井上 邦夫, 廣瀬 哲朗, 前田 明: がん抑制因子 RBM4a はがん細胞特異的成熟mRNA 再スプライシングを抑制する: mRNA 品質保証の鍵となる因子か? 2017年度 生命科学系学会合同年次大会, 神戸 (2017).