

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（3年継続研究—最終総括）

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
共同研究者： 藤田医科大学・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

生物の基本単位である細胞の核の中で、必要に応じて遺伝子は転写され mRNA 前駆体ができ、そこから mRNA 前駆体スプライシングによってイントロンと呼ばれている不要な部分が取り除かれ、必要なエクソンがつなぎ直されて、ようやく蛋白質の設計図である mRNA ができあがる。正確無比にスプライシングが起これなければ、目的の蛋白質を作れない。ひとたびスプライシングに狂いが生じると、細胞機能に害を及ぼし、しばしば癌や病気の原因になってしまう。実際、正常な細胞では、高い精度でスプライシングが遂行されている事実があるが、その一般的なメカニズムは未だによくわかっていない。

近年、私の研究室ではスプライシングの精度に関与する三つの因子の同定に成功し、この難問を解明するブレークスルーになると確信している。興味深いことに、一つの因子は癌抑制因子であり、二つの因子は、スプライシング完了後に、mRNA のエクソン接合部に結合する複合体 (Exon junction complex, EJC) の中核因子と表層因子であった。前者はスプライシング精度と癌の抑制を結びつける鍵となる可能性があり、後者はグローバルなスプライシング正常化につながるスプライシング完了機構の解明に一石を投じるだろう。なぜなら、スプライシング完了のシグナルをどうやって細胞核が認識するかは、未解決の問題だからだ。3年間継続(2017年5月～2020年4月)の研究課題として、この重要問題の解明に挑戦した。

2. 研究の対象ならびに方法

スプライシング産物は、ヒト癌細胞株 (HeLa, MCF7, TW01)、及び対照として正常様乳腺細胞 MCF10A 細胞を用い、内在性 *TSG101* 遺伝子(下記参照)の転写物を、部位特異的な P4NA プライマーを用い RT-PCR 及び定量的 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(155種類の核蛋白質を含む)は、廣瀬哲朗教授(北海道大学)より分与していただき、上記の細胞株を用い、RNA 結合蛋白質の発現抑制を行った。各候補因子の発現プラスミドを培養細胞に導入して、過剰発現させ、また対応する siRNA を培養細胞に導入して発現抑制を行い、スプライシングへの影響を調べた。培養細胞内での各種 mRNA 発現の促進・抑制はノーザン・ブロッティングと RT-PCR で、蛋白質の発現はウエスタン・ブロッティングで確認した。実験方法の詳細は論文に記載されている[P1, P3, P4]。

3. 研究結果

(1) 癌特異的 mRNA 再スプライシング現象の証明とその抑制因子の発見

私の研究室では、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 mRNA 産物が生成するという現象が、癌細胞特異的に起こっていることを *TSG101* 遺伝子をモデルにして証明した[P1, P2]。最近、台湾大学医学部耳鼻咽喉科との共同研究で、*TSG101* 遺伝子の異常再スプライシング産物(TSG101Δ154-1054 蛋白質)が、実際に癌の浸潤や転移を促進している結果も得られ、臨床医学的な意義も加わり、ますます研究の重要性が増している(図1)[P5]。この現象が、正常

細胞で無秩序で起こったならば、深刻な害を及ぼすことは明白であるから、一旦完成された成熟 mRNA は再びスプライシングされないような仕組みがあると予想できる(図2)。この仕組みの解明につながる重要な研究成果として、最近、mRNA 再スプライシングを抑制する二つの蛋白質因子の同定に成功した。一つは、癌抑制因子として知られていた RBM4a であり[M1-3, M5, M6, M8]、もう一つは成熟 mRNA のエクソン接合部に特異的に結合する EJC の中核因子 eIF4A3、Y14、MAHOH であった(図2)[M7-9, M10]。これら3つの EJC 中核因子は、EJC 形成に必須であるから、機能の実体としては EJC 本体と考えていいだろう。興味深いことに、別の研究から、EJC がスプライシング精度に寄与している実験的根拠も得られていたが[P3]、その研究が今年になってから予想外に大きく進展し、以下の重要な発見につながった。

(2) mRNA 前駆体スプライシング精度に関わる因子の発見

20年余りに応募者(前田)が、スプライシング促進因子として RNPS1 を精製・同定した[1]。その後、RNPS1 は EJC の表層に結合する因子としても同定された[2]。一方、前田研究室では RNPS1 がスプライシング複合体(スプライソソーム)にも存在し、他の因子と相互作用しながら、種々の選択的スプライシングを調節していることを明らかにした[3, 4]。

3年余りに、EJC がスプライシング精度に寄与している根拠が得られたため[P3]、EJC の表層因子かつスプライシング促進因子である RNPS1 に注目し、そのヒト培養細胞での発現を、siRNA を用いて抑制した。驚くべきことに、AURKB mRNA 前駆体から、異常な複数のスプライシングが誘導されることがわかった(図3)。RNPS1 は 5'スプライス部位の上流に結合していることがわかり、正しい5'スプライス部位の選択を誘導していると考えられた(図4)[P4]。類似の異常スプライシングのパターンが、まったく異なる MDM2 mRNA 前駆体においても観察されたことから、遺伝子特異的ではなく、一般性のある現象と予想できた。その後、RNPS1 は、構造が明らかにされてはいるが機能が未解明だった

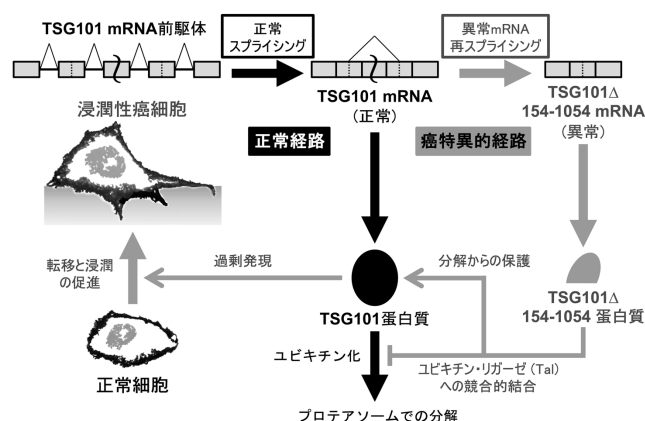


図1 TSG101 遺伝子産物の癌特異的異常スプライシングは、癌の転移と浸潤を促進することがわかった[P5]。以前に、この遺伝子をモデルとして、癌特異的異常スプライシングが、mRNA 再スプライシングを経由していることを前田研究室で証明した[P1]。

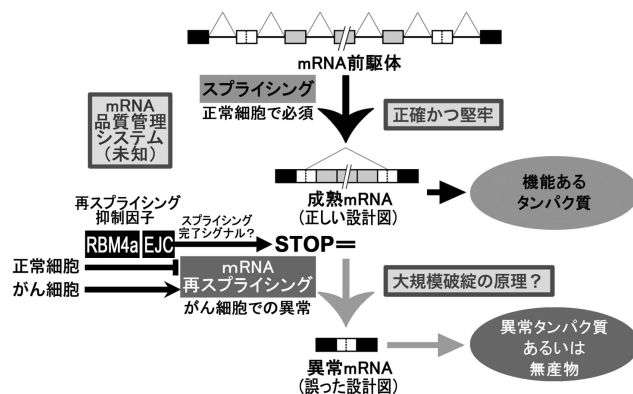


図2 癌特異的な mRNA 再スプライシング現象と、その抑制因子を介したシステムは、mRNA 品質管理に重要な役割を果たしているに違いない。

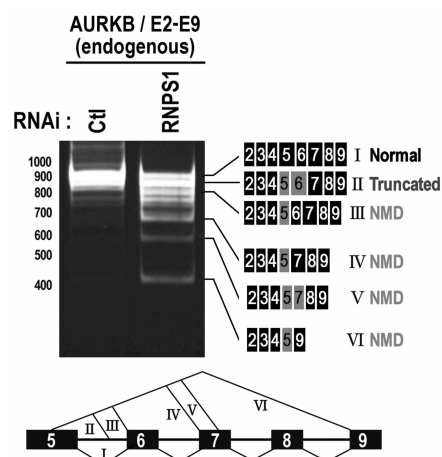


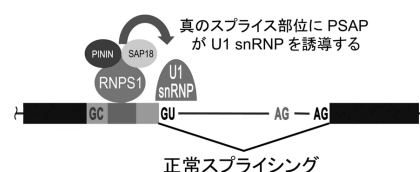
図3 RNPS1 発現をノックダウンすると、AURKB mRNA 前駆体の偽の 5'スプライス部位の使用を起点として、複数の異常スプライシング(II-VI)が誘導される。AURKB は細胞分裂に必須の遺伝子で、RNPS1 ノックダウンにより AURKB ノックダウンと同様に、細胞の多核化が起こる[P4]。

PSAP 複合体(RNPS1、PININ、SAP18)[5]の構成因子として、正しいスプライシングを誘導していることがわかった(図4)[M4, M8, 投稿準備中]。

4. 考察

以上の研究結果を総合的に検討すると、スプライシング依存的に mRNA に結合する EJC が、スプライシング精度の向上に関与していること、EJC の表層因子 RNPS1 が(PSAP 複合体として)、真の5'スプライス部位の近傍に結合し、正しい U1 snRNP の配置に決定的な役割を果たしていることが想定できる。一方、成熟 mRNA 再スプライシングという癌特異的な異常スプライシングの抑制因子の探索から、癌抑制因子 RBM4a と EJC が同定された。EJC 因子を介して、mRNA 品質管理と癌抑制の接点が見えてきた！ 貴財団の助成は3年で終了したが、ありがたいことに遺伝子発現制御の基礎から、癌抑制を理解する重要な研究課題に発展させることができた。今後は、上記の因子群が、どのようなメカニズムで異常な mRNA 前駆体スプライシングを是正して正確なスプライシングを導いているのか、この未知の問題を解明するのが最終目標である。

+ PSAP : 正常スプライシング → mRNA品質管理 ON



- PSAP : 異常スプライシング → mRNA品質管理 OFF

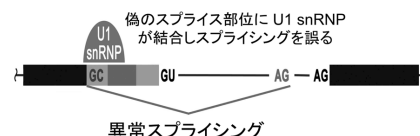


図4 RNPS1 を構成因子とする三量体 PSAP が、真の 5'スプライス部位の選択を通じて、正しいスプライシングを誘導するモデル。

5. 文献

1. A. Mayeda, J. Badolato, R. Kyobayashi, M.Q. Zhang, E.M. Gardiner, A.R. Krainer: Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **18**: 4560–4570 (1999).
2. H. Le Hir, E. Izaurralde, L.E. Maquat, M.J. Moore: The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon–exon junctions. *EMBO J.* **19**: 6860–6869 (2000).
3. E. Sakashita, S. Tatsumi, D. Werner, H. Endo, A. Mayeda: Human RNPS1 and its associated factors: a versatile alternative pre-mRNA splicing regulator in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 1174–1187 (2004).
4. J.H. Trembley, S. Tatsumi, E. Sakashita, P. Loyer, C.A. Slaughter, H. Suzuki, H. Endo, V. Kidd, A. Mayeda: Activation of pre-mRNA splicing by human RNPS1 is regulated by CK2 phosphorylation, *Mol. Cell. Biol.* **25**: 1446–1457 (2005).
5. A. Murachelli, J. Ebert, C. Basquin, H. Le Hir, E. Conti: The structure of the ASAP core complex reveals the existence of a Pinin-containing PSAP complex. *Nat. Str. Mol. Biol.* **19**: 378–386 (2012).

6. 論文出版・学会発表（継続研究のため本助成年度以前の業績も含まれる）

(1) 論文発表（申請者に下線）

- P1. 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).

- P2. 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).
- P3. 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).
- P4. 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).
- P5. H.H. Chua, T. Kameyama, A. Mayeda, T.H. Yeh: Cancer-specifically re-spliced TSG101 mRNA promotes invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 773 (2019).

(2) 学会発表 (申請者に下線)

- M1. 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 / International Symposium on the Hallmarks of Cancer: Focus on RNA, Prague, Czech Republic (2017).
- M2. T. Kameyama: A repressor candidate of cancer specific mRNA re-splicing: A key factor for splicing fidelity or mRNA quality control? 第 76 回 日本癌学会学術総会, 横浜 (2017).
- M3. 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).
- M4. K. Fukumura, A. Mayeda: The PSAP complex is a global guardian of pre-mRNA splicing fidelity. Gordon Research Conference: Post-Transcriptional Gene Regulation—Integrating Technology and Mechanisms to Illuminate Function in RNA Biology, Newry, Maine, U.S.A. (2018).
- M5. T. Kameyama: Identification of tumor suppressor RBM4a as a repressor of cancer-specific mature mRNA re-splicing. 第 77 回 日本癌学会学術総会, 大阪 (2018).
- M6. K. Kameyama, M. Fukumura, Y. Nakatani, Y. Ohtani, K. Inoue, T. Hirose, A. Mayeda: Identification of tumor suppressor RBM4a as a repressor of cancer-specific mature mRNA re-splicing. Cold Spring Harbor Asia Conference: RNA Biology, Suzhou, China (2018).
- M7. 大谷 雄太, 亀山 俊樹, 前田 明: EJC ががん細胞特異的な成熟mRNA 再スプライシングを抑制する: スプライシング正常化に働く新たな EJC の役割. 第 41 回 日本分子生物学会年会, 横浜 (2018).
- M8. A. Mayeda: Repressors of cancer-specific mRNA re-splicing: Key factors for splicing fidelity or mRNA quality control? Annual Congress of Taiwan Society of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery / Taiwan Academy of Otology, Taichung, Taiwan (2019).

- M9. Y. Ohtani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna, A. Mayeda: EJC core represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: EJC as a signal to terminate splicing. Eukaryotic mRNA Processing Meeting, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A. (2019).
- M10. Y. Ohtani, T. Kameyama, P. Venhuizen, M. Kalyna, A. Mayeda: EJC represses cancer-specific mature mRNA re-splicing: EJC as a guardian to maintain the integrity of mRNA. 第42回 日本分子生物学会年会, 福岡 (2019).