

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（継続）

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を取り除かれ、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しう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。ここに提案する基礎研究課題で、これらの因子が、どのようなメカニズムで一般的にスプライシングの精度を上げているかを明らかにしたい。

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* 遺伝子の転写物を、部位特異的な DNA 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・ブロットイングと RT-PCR で、蛋白質の発現はウェスタン・ブロットイングで確認した。実験方法の詳細は論文に記載されている [A, C, D]。

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

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

[A, B]。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興味深い [E]。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1)。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 [F, G, H, J]、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 の中核因子であった (図1) [K]。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 [C]、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年近く前に応募者(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、私たちは *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 [2, 3]。

近年、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 [C]、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2) [D]。*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3) [D]。類似の異常スプライシ

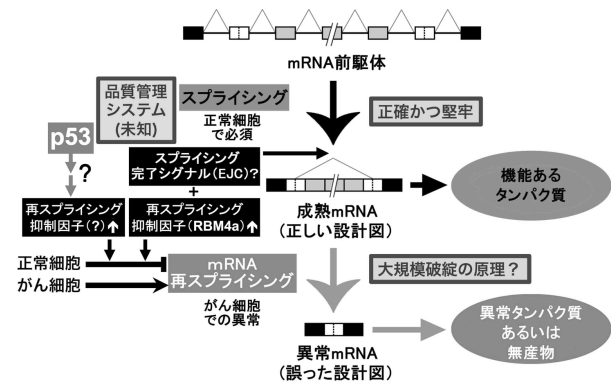


図1 癌特異的な mRNA 再スプライシング現象と、その抑制因子を介した一般性のある mRNA 品質管理システム。

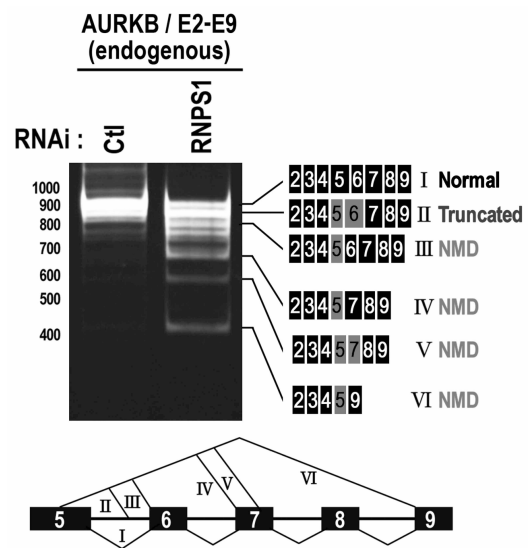


図2 *RNPS1* 発現をノックダウンすると、*AURKB* mRNA 前駆体の偽の 5' スプライス部位の使用を起点として、複数の異常スプライシング (II-VI) が誘導される。*AURKB* は細胞分裂に必須の遺伝子で、*RNPS1* ノックダウンにより *AURKB* ノックダウンと同様に、細胞の多核化が起こる。

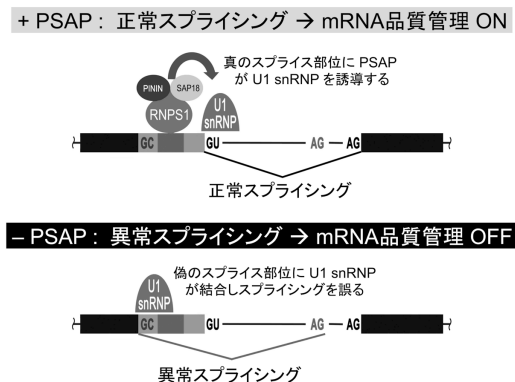


図3 *RNPS1* を構成因子とする三量体 PSAP が、真の 5' スプライス部位の選択を通じて、正しいスプライシングを誘導するモデル。

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 PSAP 複合体 (RNPS1、PININ、SAP18) [4] 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3) [I]。

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 の中核因子が同定された。EJC を共通の因子として、mRNA 品質管理と癌抑制の接点が見えてきた！ 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となるに違いない。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本研究課題の最終目標である。

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). (*Corresponding author)
2. 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).
3. 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).
4. 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

- 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. 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).
- C. 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).

- D. 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).
- E. 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

- 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 / International Symposium on the Hallmarks of Cancer: Focus on RNA, Prague, Czech Republic (2017).
- G. 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).
- H. 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).
- I. 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, Jordan Hotel at Sunday River, Newry, Maine, U.S.A. (2018).
- J. 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).
- K. 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).