

mRNAスプライシング異常による発がん機構の解析

富山大学 先端ライフサイエンス拠点

甲斐田 大輔

1. はじめに

最近の研究から、mRNAスプライシングを担うスプライソソームの構成タンパク質や、他のスプライシング関連因子の異常ががんをはじめとした様々な疾患を引き起こすことが明らかとなってきた。その中でも特に、スプライソソーム内でスプライシング反応の中心的役割を果たすタンパクの一つであるSF3B1の変異が、骨髄異形成症候群や、慢性リンパ性白血病などを引き起こすことが明らかとなった。しかしながら、SF3B1の変異がこれらの疾患を引き起こすメカニズムはわかっていない。したがって、これらの疾患の原因究明、治療法の開発のためには、SF3B1変異がトランスクリプトームに与える影響を解析することが重要であるが、患者の細胞を実験サンプルとして使用するには様々な制限がある。そこで、申請者らが発見したSF3B1に結合し、その機能を阻害する低分子化合物スプライソスタチンA(SSA)で細胞を処理することにより、患者の細胞中で起こる現象を再現し、細胞内で起こる現象を観察することで、これらの疾患の分子メカニズムを理解し、治療法の開発に貢献することを目的として研究を開始した。

それまでの我々の研究から、SSA処理細胞中では多くの遺伝子において5'末端と比較して3'末端の発現量が低下することが明らかになっており、また、その際にRNAポリメラーゼII (Po1 II)のリン酸化レベルが低下することがわかっていた。しかしながら、これらの二つの現象に関連性があるのかどうか？また、これらの現象を引き起こす分子メカニズムはどのようなものであるのか？と言ったような疑問が残されていた。そこで、これらの疑問に答えるべく更なる研究を行った。

2. 方法

1) ChIP法を用いた、SSA処理によるPo1 IIの挙動やリン酸化の変化に関する解析

HeLa細胞を30 ng/mlのSSAで2時間処理し、ホルマリンによる固定後、Po1 II抗体(N20)、リン酸化Ser2抗体(3E10)を用い、Po1 IIもしくはSer2がリン酸化されたPo1 IIを免疫沈降し、結合しているDNA量を定量PCRにより解析することにより、SSA処理時のPo1 IIの挙動やSer2のリン酸化レベルの変化を観察した。

2) *in vitro* kinase assay

HeLa細胞から精製したP-TEFbと、大腸菌内で作らせたリコンビナントPo1 IIのC末端ドメイン(CTD)を用いて*in vitro* kinase assayを行った。反応液中に、P-TEFbの特異的阻害剤であるDRB、もしくはSSAを加え反応を行い、ウェスタンブロッティングによりCTDのリン酸化レベルを観察した。

3) アンチセンスオリゴを用いたスプライシング阻害

スプライソソームはU1, U2, U4, U5, U6という5つのsnRNPとよばれる構成因子からなっており、それぞれのsnRNPはsnRNAとよばれるRNA分子にいくつかのタンパク質が結合した構造をしている。snRNAとpre-mRNAがRNA-RNA結合を形成することがスプライシング反応において必須であることが知られており、このRNA-RNA結合の形成を阻害するようなアンチセンスオリゴを導入することでスプライシング反応が阻害できる。そこで、エレクトロポレーション法により、HeLa細胞にこれらのアンチセンスオリゴを導入し、その際のスプライシング活性、また、Po1 IIのリン酸化レベルを観察した。

3. 結果

1) SSA処理によるPo1 IIの挙動変化

SSA処理により、遺伝子3'末端の発現が低下したことから、SSA処理が転写活性に影響を与えている可能性が考えられた。その可能性を検証するため、SSA処理時のPo1 IIの挙動をChIP法により観察した。その結果、3'末端の発現が低下する多くの遺伝子において、Po1 IIが遺伝子の5'末端に蓄積していることが明らかとなり、この結果から、転写の伸長が抑制されていることが示唆された。また、3'末端の発現が低下しない遺伝子上においては、SSA処理による顕著なPo1 IIの蓄積は観察されなかった。(図1)

2) SSAがP-TEFb活性に与える影響

我々の先行研究から、SSA処理によるスプライシング阻害によってPo1 IIのリン酸化レベルが低下することが明らかとなっていた。しかしながら、SSAが直接P-TEFbを阻害するなど、スプライシング阻害がPo1 IIの脱リン酸化の直接の原因でない可能性も考えられる。そこで、HeLa細胞から精製したP-TEFbと、大腸菌に作らせたリコンビナントCTDを用い、*in vitro* kinase assayを行ったところ、P-TEFbの阻害剤であるDRB処理によりCTDのリン酸化が消失したものの、SSA処理はCTDのリン酸化レベルには影響を与えなかった(図2)。このことから、SSAが直接P-TEFbを阻害することはないと考えられる。

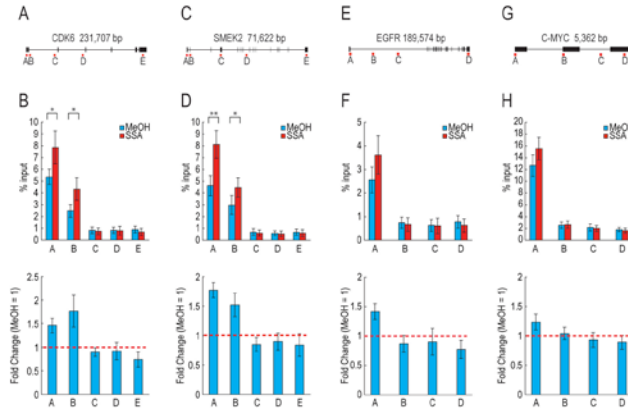


図1 SSA処理時のPo1 IIの挙動

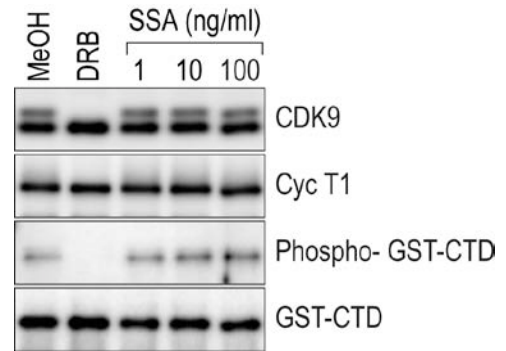


図2 SSAがPo1 IIのリン酸化に与える影響

3) アンチセンスオリゴによるスプライシング阻害時のPo1 IIリン酸化レベルの変化

上記の実験からSSAによるP-TEFbの阻害の可能性はないと考えられるが、他のタンパク質の機能を阻害することでPo1 IIの脱リン酸化を引き起こしている可能性は残されている。そこで、スプライソソームの構成因子であるsnRNAに対するアンチセンスオリゴを細胞に導入することでスプライシングを阻害し、その際のPo1 IIのリン酸化レベルの阻害を観察した。予想通り、これらのアンチセンスオリゴはスプライシングを非常に効率よく阻害し、さらに、Po1 IIのリン酸化レベルも減少させた(図3)。この結果から、スプライシングの阻害そのものがPo1 IIのリン酸化レベルの低下を引き起こすと考えられる。

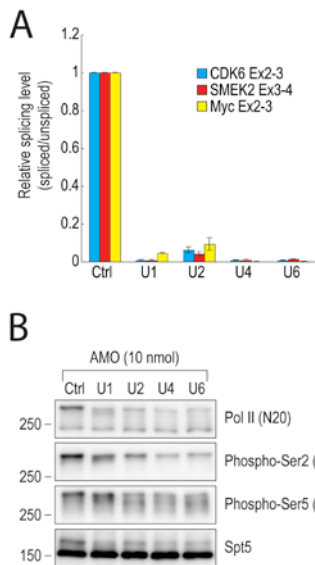


図3 アンチセンスオリゴによるスプライシング阻害とPo1 IIのリン酸化レベル

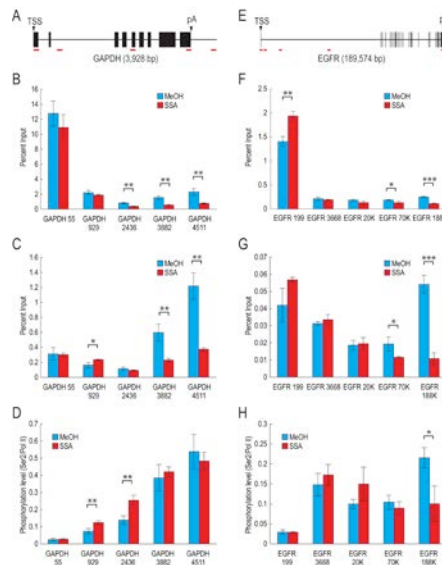


図4 スプライシング阻害時のPo1 IIリン酸化レベル

4) SSA処理によるPo1 IIリン酸化レベルの変化

Po1 IIのリン酸化レベルが低下する理由を明らかにするために、ChIP法により、Po1 IIの挙動と転写を行っているPo1 IIのリン酸化レベルを測定した。すると、いくつかの遺伝子においてSSA処理に

よりPol IIが転写を早期に終結していることが明らかとなった。転写を終結したPol IIは、次の転写を行うために脱リン酸化される。実際に、分画実験からSSA処理細胞では多くのPol IIがクロマチン領域から離れており、それらは脱リン酸化されていることが明らかとなった。また、多くの遺伝子において、遺伝子3'末端において転写中のPol IIのリン酸化も低下していることが明らかとなった(図4)。これらの結果から、SSA処理細胞中でおこるPol IIの脱リン酸化の原因は、Pol IIが鋳型となるDNAから早期に離れてしまい、その結果核質で脱リン酸化されてしまうことと、転写中のPol IIが脱リン酸化されてしまうことの2つであるということが明らかとなった。

4. 考察

我々の結果から、転写の早期終結と転写中のPol IIの脱リン酸化が、SSA処理によるPol IIの脱リン酸化の原因であることが明らかとなった。SSA処理による転写の早期終結は他のグループからも報告されており、その発見を裏付けることとなった(参考文献1)。しかしながら、その報告の中では、転写中のPol IIのリン酸化レベルには影響がないということであったが、我々の研究により、遺伝子特異的ではあるが転写中のPol IIの脱リン酸化が引き起こされることが明らかとなった。

また、転写中のPol IIの脱リン酸化のメカニズムとして考えられるのは、Pol IIに対するリン酸化酵素であるP-TEFbの活性低下、もしくはP-TEFbのリクルートの異常などが考えられる。P-TEFbのリクルートにはスプライシング関連因子のSC35/SRSF2が大きな役割を果たしていることが報告されているが(参考文献2、3)、このリクルートは遺伝子の5'末端で起こっており、遺伝子の3'末端における脱リン酸化とは関係が薄いように考えられる。現在のところ、この脱リン酸化を引き起こす分子メカニズムは明らかになっていないが、今後の研究により明らかにできると考えている。

以上のことから、スプライシング異常により、転写の早期終結、Pol IIの脱リン酸化が引き起こされることが明らかとなった。これらの変化が、スプライシング異常が引き起こすがんをはじめとした様々な疾患の原因となっている可能性がある。したがって、これらの研究をさらに進めることにより、スプライシング異常が引き起こす疾患の原因究明、治療法の開発につながると考えられる。

5. 発表論文

1) U2 snRNP is required for expression of the 3' end of genes

Mitsunori Koga, Takayuki Satoh, Ichiro Takasaki, Yumi Kawamura, Minoru Yoshida and Daisuke Kaida* (*: Corresponding Author)

PLOS ONE, 9(5), e98015 (2014)

2) Splicing inhibition causes dephosphorylation of CTD Ser2

Mitsunori Koga, Megumi Hayashi and Daisuke Kaida* (*: Corresponding Author)

Nucleic Acids Research, 43, 8258-8267 (2015)

参考文献

1) Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes.
Martins SB, Rino J, Carvalho T, Carvalho C, Yoshida M, Klose JM, de Almeida SF, Carmo-Fonseca M.

Nat Struct Mol Biol. 2011 Sep 4;18(10):1115-23

2) SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase.

Ji X, Zhou Y, Pandit S, Huang J, Li H, Lin CY, Xiao R, Burge CB, Fu XD.

Cell. 2013 May 9;153(4):855-68.

3) The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation.

Lin S, Coutinho-Mansfield G, Wang D, Pandit S, Fu XD.

Nat Struct Mol Biol. 2008 Aug;15(8):819-26.