

## 課題番号 6

## スプライシング因子によるゲノム安定性維持機構の解明

## [1] 組織

代表者：山内 基弘  
(九州大学)

対応者：宇井 彩子  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

## [2] 研究経過

スプライシング因子 (Splicing factor、以下 SF と略) の変異や発現量の異常は様々な悪性腫瘍で見られ、治療や創薬標的として最近注目されている。一方、ゲノム不安定性は古くから知られる悪性腫瘍の特徴であるが、近年、SF がゲノム安定性維持に関与することを示唆する報告が複数なされている。しかし、SF がどのようなメカニズムでゲノムの安定性維持に働いているのかはまだほとんどわかっていない。申請者は最近、がんで発現異常が見られる SF の 1 つ、SART1 タンパク質が転写活性化領域に発生した DNA 二本鎖切断 (DSB) の相同組換え修復を促進していることを明らかにし論文を発表したが、そのメカニズムまでは解明できていない (Yamauchi et al. BioRxiv 2023)。そこで本共同研究では、(1) SART1 が転写活性化領域に発生した DSB の相同組換え修復を促進するメカニズム、(2) SART1 以外の SF がゲノム安定性を維持するメカニズムを解明することを目的とする。メカニズム解明のためには、SF が転写活性化領域に発生した DSB に集積するかどうかを可視的に検討する実験、および DSB 依存的に転写活性化領域で SF と相互作用する因子を同定する実験が必要である。受入教員である宇井准教授は転写活性化領域における DSB を可視化する実験系をお持ちであり、また質量分析の経験も豊富である。そこで SF の転写活性化領域における DSB への集積の可視化実験および SF と相互作用する因子を同定する質量分析実験は宇井准教授にご担当いただく。

宇井准教授とは数か月に 1 度ほど、メールやオンラ

インで実験相談や打ち合わせを行った。

## [3] 成果

## (3-1) 研究成果

(1) SART1 が転写活性化領域に発生した DSB の相同組換え修復を促進するメカニズムについて

これまでの研究により、SART1 は BRCA1 を DSB 部位にリクルートすることにより、転写活性化領域に発生した DSB の相同組換え修復を促進することが分かっていた。そこで 2024 年度はそのメカニズムを解明する実験を行なった。先行研究から SART1 は細胞の DNA 損傷応答で中心的な役割を果たしている ATM タンパク質により、DSB 発生後にスレオニン 430 と 695 にリン酸化を受けることが分かっている。これらのリン酸化の役割を調べるため、スレオニン 430 と 695 をアラニン (A) あるいはグルタミン酸 (E) に置換した変異型 SART1 (以下アラニン変異体を 2A、グルタミン酸変異体を 2E と呼ぶ) の発現ベクターを作製し、コンディショナルに発現する細胞を樹立した。SART1 をノックダウンした細胞に野生型 SART1 あるいは 2A あるいは 2E を発現させて、 $\gamma$ 線照射後の BRCA1 の DSB へのリクルートをフォーカス形成を指標として調べたところ、SART1 ノックダウンによる BRCA1 の DSB へのリクルートは野生型 SART1 および 2E を発現した場合は相補されたものの、2A を発現した時には相補されなかった (図 1)。以上の結果は ATM によ

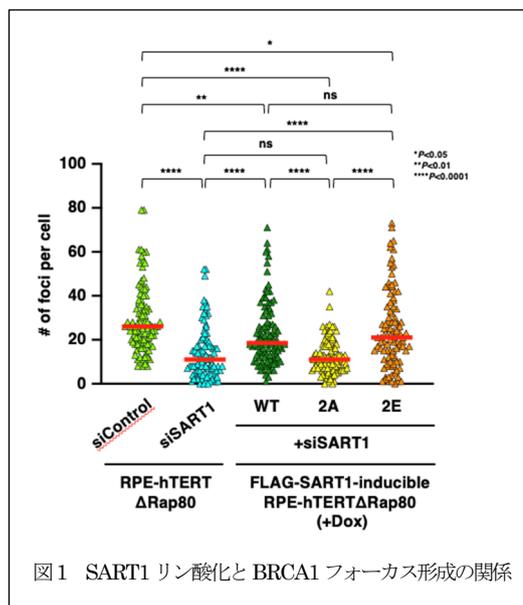


図1 SART1 リン酸化と BRCA1 フォーカス形成の関係

る SART1 のリン酸化が BRCA1 の DSB へのリクルートに重要であることを示唆している。

(2)SART1 以外の SF がゲノム安定性を維持するメカニズムについて

2024 年度は多数存在する SF の中から本研究の対象とする SF を決めるため、先行研究のスクリーニング結果を再解析した。再解析には、Durocher のグループによって行われた放射線・抗がん剤感受性制御因子のスクリーニング研究 (Olivieri et al. Cell 2020) のデータを用いた。上記の研究で用いられた放射線・抗がん剤の中から、悪性腫瘍の標準治療に用いられ、かつ DSB を生成する X 線、Bleomycin、Cisplatin、Camptothecin、Etoposide、Olaparib を選択し、これらの放射線・抗がん剤感受性制御因子の中から Gene Ontology Term “mRNA splicing” を含む遺伝子を抽出した。この再解析の結果、最も多種類 (X 線、Cisplatin、Etoposide) の放射線・抗がん剤の感受性に関わる SF (以下 SF-X とする) を同定した。次のがんデータベース TCGA のデータを解析することにより、主要ながんにおける SF-X 遺伝子の変化を調べた。その結果、肺扁平上皮がん、肺腺がん、食道がん、肝細胞がん、大腸がん、乳がんにおいて SF-X 遺伝子の最も高頻度な変化は mRNA レベルの過剰発現であった。次に SF-X によりスプライシングに影響を受ける DNA 修復因子を同定するため、TCGA SpliceSeq のデータを解析した。TCGA SpliceSeq は TCGA に記載されている様々ながん種の RNA-seq データを用いて行なったスプライシング解析の結果を収載しているデータベースである。上記のがんのサンプルを SF-X の発現量が高い群 (SF-X High) と低い群 (SF-X Low) に分け、SF-X High と SF-X Low で PSI (Percent Spliced-In) の値に有意な差がある DNA 修復遺伝子を調べた。PSI とは、ある遺伝子のある Exon が全転写産物のうち何%に含まれているかを示す値であり、Alternative splicing の定量に広く用いられている数値である。その結果、約 20 個の DNA 修復遺伝子の PSI 値が、5 種類のがん (肺扁平上皮がん、肺腺がん、肝細胞がん、大腸がん、乳がん) に共通して SF-X High と SF-X Low とで有意に差があることがわかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

<今後の計画>

3-1 のデータ解析で同定した約 20 個の DNA 修復遺伝子の中から、実際に SF-X によってスプライシングに影響を受けている DNA 修復遺伝子 (修復遺伝子 Z とする) をウェット実験により同定する。また修復遺伝子 Z が SF-X による DSB 修復促進機能のエフェクターであるかどうかを検証する。さらに SF-X と結合

しているタンパク質を宇井准教授のご協力のもと、質量分析で同定することで SF-X による修復遺伝子 Z のスプライシング制御メカニズムを解明する。

<波及効果と発展性>

SF-X のゲノム安定性維持機構が解明されれば、がんの放射線や抗がん剤耐性メカニズムの理解の一助となる可能性がある。理由は SF-X は主要ながん種で高頻度に過剰発現しており、またがんの標準治療で用いられる X 線、Cisplatin、Etoposide に対する感受性を制御しているためである。SF-X あるいはそのエフェクターである修復遺伝子 Z を標的として、放射線や抗がん剤耐性を抑える薬剤の開発につながる可能性もある。

[4] 成果資料

本研究は現在解析や実験が進行中の研究であり、未だ学会や論文で発表を行っていないが、今後は成果がまとまり次第、発表を行っていききたい。