

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

(九州大学アイソトープ統合安全管理センター)

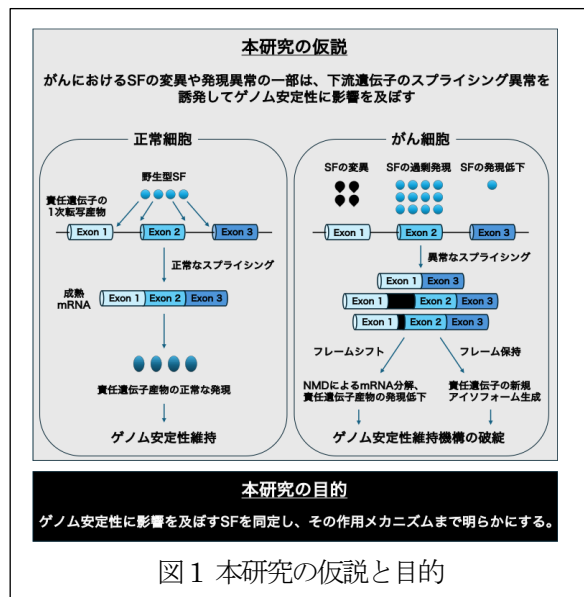
対応者：宇井 彩子

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

スプライシング異常は多くのがんで見られ、がんのホールマークの一つとされる (Bradley & Anczuków, Nat Rev Cancer 2023)。異常スプライシングの原因となる SF の遺伝子変異や発現異常も各種がんで認められる。一方、ゲノム不安定性は古くからがんのホールマークとして知られている。そのため申請者は「がんにおける SF の変異や発現異常の一部は、下流遺伝子のスプライシング異常を誘発してゲノム安定性に影響を及ぼす」という仮説を立て、以前より研究を進めてきた (図 1)。



2024 年には、種々のがんで過剰発現している SART1 という SF が、ヒト細胞において放射線照射後の DNA 二本鎖切断 (DSB) 修復を促進することを発見し、その促進機構を報告した (Ozaki & Yamauchi et al. Scientific Reports 2024)。本研究ではこの成果をさらに発展させ、ゲノム安定性に影響を及ぼす SF を同定し、その作用メカニズムまで明らかにすることを目的とする (図 1)。2024 年度には多数存在する 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。その結果、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。そこで 2025 年度はこの SF-X とゲノム安定性維持の関係を調べた。受入教員である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

SF-X による相同組換え修復の促進

SF-X の DSB 修復への影響、特にゲノム安定性維持に重要な相同組換え修復 (Homologous recombination、以下 HR) への影響を調べた。SF-X に対する siRNA を導入したヒト網膜色素上皮細胞 RPE-hTERT に 2 Gy の γ 線を照射し 2 時間後に細胞を固定後、HR マーカーである RAD51 タンパク質を蛍光免疫染色により可視化した。その結果 RAD51 の DSB への集積を意味する RAD51 フォーカスの数が SF-X ノックダウン細胞で有意に低下していた。さらに別の HR 活性を定量するアッセイ (DR-GFP アッセイ) でも SF-X ノックダウンにより HR の頻度が有意に低下することがわかった。以上の結果から、SF-X は HR を促進することが示唆された。

SF-X による DSB 末端のリセクションの促進

DSB の HR による修復はまず、DSB 末端の 5'→3' 方向の削り込み、いわゆるリセクションから始まる。リセクションの結果生じた一本鎖 DNA には RPA タンパク質が結合し、RPA はリン酸化される。そこでこのリン酸化 RPA をリセクションのマーカーとして、SF-X のリセクションへの影響を調べた。SF-X の siRNA を導入した RPE-hTERT 細胞に DSB を誘導する Etoposide を処理し、2 時間後にリン酸化 RPA のウェスタンブロッティングを行った。その結果、SF-X ノックダウンによりリン酸化 RPA のレベルはコントロールと比べて有意に低下することがわかった。以上の結果から、SF-X は HR の最初のステップであるリセクションを促進することが示唆された。

SF-Xによるリセクション促進因子の発現制御

次にリセクション促進因子の発現量に対するSF-Xの影響を調べた。SF-Xをノックダウンした細胞において様々なリセクション促進因子のタンパクレベルの発現量をウエスタンブロッティングで調べたところ、SF-Xノックダウンによりあるリセクション促進因子（リセクション促進因子Zとする）の発現量が顕著に低下することがわかった。リセクション促進因子Zの発現低下は、検討した3本のSF-X siRNAのいずれを用いた場合でも、また3種類の異なる細胞種いずれにおいても同様に見られた。またRT-qPCRでmRNAレベルを調べた結果、SF-Xノックダウンによりリセクション促進因子ZのmRNAレベルが有意に低下することがわかった。これらの結果からSF-Xはリセクション促進因子Zの発現制御を介してリセクションを促進していることが示唆された。

（3－2）波及効果と発展性など

本研究は、SFがDSB修復、特にHRを制御する分子機構の一端を示した点で重要である。SF-Xがリセクション促進因子Zの発現を制御することでDSB末端のリセクションを促進する可能性が示されたことから、RNAスプライシング制御とDNA修復経路の直接的な機能連関という新しい研究領域の拡大が期待される。今後は、SF-Xによるスプライシング制御の網羅的解析により、ゲノム安定性維持に関与する新規因子群の同定につながる可能性がある。また、SF異常がゲノム不安定性を誘導する分子基盤の理解が進めば、スプライシング異常を有するがんの新規治療標的の発見や、放射線・DNA損傷型抗がん剤の感受性予測マーカーの開発にも波及すると期待される。さらに、スプライシング制御を介したDNA修復調節という概念は、がんのみならず老化や遺伝性疾患におけるゲノム安定性研究にも新たな展開をもたらす可能性がある。

〔4〕成果資料

（1）Motohiro Yamauchi and Haruma Mitani. A Data-Driven Approach to Uncover DNA Repair Regulation by Splicing Factors.

日本放射線影響学会第68回大会／第6回アジア放射線研究会議(JRRS/ACRR2025)合同大会(国際会議)
2025年10月23日(木)～26日(日) 広島市

（2）山内基弘 データドリブンアプローチで探る
スプライシング因子のDSB修復制御機構

第62回放射線影響懇話会 2025年10月4日 鹿児島市