

「ミスプライシング産物の時空間的運命の決定と白血病新規治療標的の同定」

国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究分野・分野長
吉見 昭秀

要旨

本研究では、白血病細胞株 K562 を用いて SRSF2 が野生型の細胞、P95H 変異をノックインした細胞を準備した。次に long-read RNA-seq を行い、それを元に高深度 DIA プロテオーム解析を実施し、long-read RNA-seq データに基づくプロテオゲノミクス解析に成功した。次に各種 APEX2 融合蛋白質を細胞に発現させ proximity labeling を試みたが、約 960 通りの条件検討を行った結果、十分な濃縮は得られなかった。そこで、近接 RNA よりむしろ SF が直接結合する RNA を同定する手法に切り替えることとした。今回標的にしている SRSF2 を含む SR 蛋白質群によるスプライシング制御機構は、特異的抗体がないため驚くほど理解が進んでいない。この限界を打破するために、我々は hareCLIP-seq 法を開発した。hareCLIP-seq は Landmark study である ENCODE project で取得された CLIP データと比較して網羅性・正確性・再現性ともに圧倒的な優位性を持ち、精密なスプライシング標的の同定が可能になった。さらに RNA 修飾解析との Omics により、SRSF2 がある RNA 修飾 X の reader であることを突き止めた。白血病に見られる SRSF2^{P95H} 変異体は修飾 X の reader 機能が減弱し、BRD4 などの白血病関連遺伝子への結合が減少することがわかった。以上の結果から、スプライシングと RNA 修飾の観点から見た変異型 SRSF2 による白血病発症機構の理解を大きく進めることができた。

背景・目的

スプライシング産物の細胞内時空間的運命

真核生物において mRNA の翻訳・蛋白質合成は細胞内高次構造体により精緻に管理されており、その機構が破綻した際には異常蛋白質の凝集による神経変性疾患など¹⁻³、様々な疾患の発症につながることを示されてきた。ところが、ミスプライシング産物(MSP)などの異常を有する mRNA、あるいは正常スプライシング産物(NSP)の細胞内における時空間的局在や品質管理はほとんど理解されておらず、またこれまでの short-read sequence をベースにした次世代シーケンズによる網羅的解析は、スプライシングによる isoform を厳密に区別できないことから、不十分なデータをもとに解析・検討されていたと考えられる。また、MSP が翻訳されているのかどうかについても網羅的な解析が阻まれていた。本研究では、上記の問題を解決すべく、最新技術を 3 つ組み合わせる野心的・挑戦的プラットフォームの構築を目指し、それらの解析結果の相互活用により、MSP の時空間的トラッキングおよび細胞内高次構造による MSP 処理についての理解を深めることを目指す。

この際に問題となるのは以下の 3 点である：

- (1) MSP の profiling に必要なスプライシング因子の RNA への結合 profiling が得られていない。
- (2) Short-read ベースの次世代シーケンズでは isoform ごとの定量的把握が不可能である点。
- (3) MSP 由来の蛋白質は一般的に質量分析で使用されるアミノ酸データベースには登録されていないため、質量分析を行っても検出できない点。

スプライシング変異がんの病態とミスプライシング産物

一方、スプライシング因子の遺伝子変異(SF 変異)は様々ながんで高頻度に見つかることが 2011 年に報告された(例;骨髄異形成症候群:50-80%、慢性骨髄単球性白血病:60-70%、ブドウ膜悪性黒色腫:20%など)⁴⁻⁵。SF 変異は主に SRSF2、SF3B1、U2AF1 の 3 つのメジャーなスプライシング因子の特定のアミノ酸配列に影響を与える部位に集中し(例:SRSF2 P95、SF3B1 K700 など)、片アレルにのみ見られる。この観察結果から、上記の SF 変異は機能獲得型(change-of-function)変異と考えられる。実際に例えば SRSF2 は P95 に hotspot を持ち、P95H 変異体は Exonic Splicing Enhancer 上の配列認識が変わるため、結果として配列特異的に約 500-1,500 の遺伝子においてグローバルに mis-splicing event (MSE)を生じる⁶⁻⁷。

SF 変異は様々ながんを高頻度に認められることから、がん細胞における MSP は様々ながんの病態に深くかかわっていると考えられる。例えば私達は *SRSF2* 遺伝子変異を有する白血病において *INTS3* 遺伝子に生じる複数の MSE が INTS3 蛋白質の発現を低下させ、Integrator 複合体の機能を喪失させることで骨髄性白血病細胞の分化を阻害して白血病をドライブすること⁶、*SF3B1* 遺伝子変異を有するがんの横断的スプライシング解析により、変異型 SF3B1 が *PPP2R5A* 遺伝子の MSE を誘導して MYC 蛋白質を安定化させ、慢性リンパ性白血病の病態を悪化させること⁷などを最近解明した。また、申請者らは新規臨床グレードスプライシング阻害剤の開発に携わったが⁸、臨床試験においては毒性が強く出てしまい、SF 変異がんに対する治療法開発は世界的に停滞しているのが現状である。従って、SF 変異がんにおける MSP の動態と MSP 由来の蛋白質発現の変化を体系的に理解して、新たな治療標的を同定することが当該分野で求められている。

以上の背景を踏まえ、本研究では上記に挙げた 3 つの問題点について、それぞれ以下のようにアプローチすることで解決を図る：

- (1) 多くの MSP を有する SF 変異を有する細胞(および SF 野生型細胞)を使用して解析する。
- (2) Long-read RNA-seq を実施することによって isoform を厳密に区別し、定量する。
- (3) 仮想 proteomic database を構築した上で、MSP 由来のアミノ酸翻訳産物のプロテオゲノミクス解析を実施する。

本研究では、このような技術的問題解決を介して、異分野融合による最新技術を統合したプラットフォームを開発し、「細胞内のどのような性質を持った MSP/NSP が、どのような細胞内局在で、いずれの細胞内高次構造あるいは蛋白質複合体において処理されるのか、あるいは処理されず翻訳されるのか？」という問いに対して、細胞内高次構造との時空間的關係において MSP/NSP の時空間的運命をトラックすることにより、新しい細胞基本原理の発見や SF 変異がんの病態解明を目指す。

方法

本研究では上記の問いに対して、異分野最新技術を融合した革新的プラットフォームを開発することにより、その答えに迫る。具体的に以下の目的の達成を目指す。

- (1) APEX2 による proximity labeling 技術を活用するために、後述の 8 種類の細胞内高次構造物に局限して APEX2 を発現させる基盤を形成する。
- (2) SF 変異細胞・SF 野生型細胞において(1)で完成した基盤技術を用いて proximity labeling を行った上で RNA-seq を実施する。
- (3) RNA スプライシング解析により isoform を厳密に区別し、各局在における isoform 存在量を定量した上で詳細な解析を行う。
- (4) SF 変異細胞において仮想 proteomic database を構築した上で、SF 変異細胞・SF 野生型細胞両者の NSP・MSP 由来のアミノ酸翻訳産物のプロテオゲノミクス解析を実施する。
- (5) Nanopore direct long-read RNA-seq データを元に複数種類の RNA 修飾を同時解析し、上記で得られたすべてのデータを統合的に解析する。

結果

1. Construction

本研究では、SF 変異を有する 2 種類の細胞株を作成した。いずれも、慢性骨髄性白血病患者由来の浮遊細胞株で、スプライシング異常の研究で頻繁に用いられる K562 を用いた。本研究で標識する対象として、各種の細胞内小器官および RNA 分解経路に関係するタンパク質群を、文献情報をもとに選択した。前者としては、核小体、核、核膜、小胞体、ミトコンドリア、細胞質を選び、それぞれに特異的なシグナルペプチド、構造タンパク質または機能性タンパク質の配列を APEX2 に付加した。後者としては、早期に終始コドンが出現した場合に駆動される Non-sense mediated decay (SMG6)、終始コドンの機能不全に対応する No-go/Non-stop decay (PELO, SKIV2L)、ヘアピン RNA の代謝に関連する STAU-mediated decay (STAU1)、ヒストン RNA の迅速な分解に対応する経路 (SLBP)、核内の RNA 全般の分解を担う核内 RNA exosome (MTR4)、P-bodies (PAT1B)、およびオートファゴソーム (LC3B) を選び、それぞれの経路で中心的な役割を担う括弧

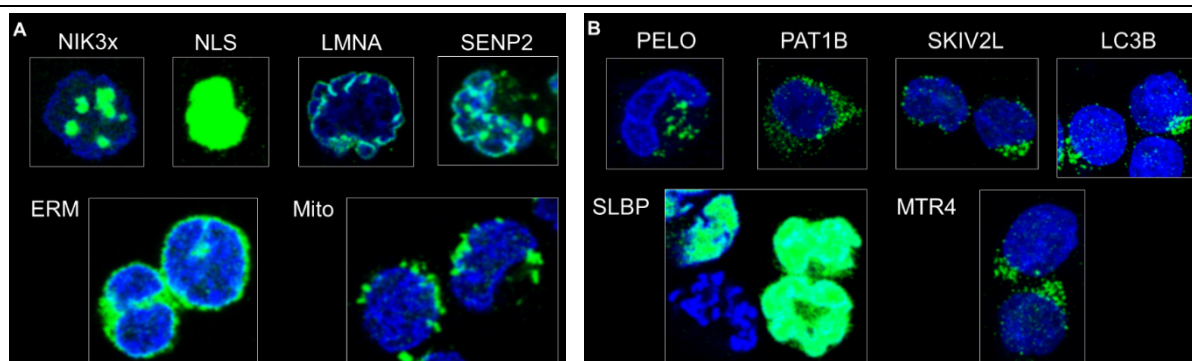


Figure 1. Demonstration of APEX2 fusion constructs in stably expressing K562 cell lines. Immunofluorescence analysis with anti-V5 antibody. Constructs oriented to the organelles (A) and RNA decay pathways (B).

内のタンパク質を APEX2 に融合した。レンチウイルス感染により、これらのベクターを K562 細胞株に発現させ、共焦点顕微鏡でその分布を確認した。細胞内小器官を標的とするベクターでは、予測通りの分布を得た (Fig. 1)。

2. Proximity labeling の実施

APEX2 タンパク質によるビオチン化反応を発生させるためには、基質となるビオチン化合物および過酸化水素を同時に投与する必要がある。できるだけ標的の周囲に局限した修飾を達成するため、過酸化水素の接触時間は 1 分未満とすることが推奨される一方で、そのような短時間の反応では、基質濃度が十分でないと、適量の修飾が起きないと考えられた。そこで、APEX 反応の条件検討を行った。第一に、基質濃度を変化させた。ビオチンフェノール (BP) および過酸化水素の濃度を 14 通りの組合せで試行したところ、BP の最小必要濃度は 1 mM と判明した。また、過酸化水素は最小量 (0.5 mM) で十分であり、高濃度では反応を阻害する傾向にあった。複数のコンストラクトで検討し、最適な条件は、BP 2 mM, H₂O₂ 0.5 mM と決定した (Fig. 2A)。第二に、H₂O₂ 反応時間を変化させた。1 分で十分なビオチン化修飾が得られ、延長によってシグナルは増大しないことが判明したことから、反応時間は 1 分を採用した (Fig. 2B)。

次に、APEX 反応で産生されたビオチン化 RNA を精製する手順を検討した。最初に、原著論文⁹の手法を用いたが、再現が困難であり、新規のプロトコルを構築した。条件をのべ約 960 通り検討したが、簡潔に述べると、ビオチン化産物の精製で頻繁に用いられるストレプトタビジン結合磁性ビーズを用意し、ビオチン化 RNA と 9 時間接触させた後、念入りの洗浄を行い、最後に、ホルムアミドおよび EDTA で RNA を溶出させて、エタノール沈殿で精製するのが最適条件と判明した。ビオチン化標識されたプライマーを用いた PCR で得たビオチン化 DNA を使って、適切にビオチン化核酸が回収されることが示された (data not shown)。

以上の方法で精製された RNA を用いて、網羅的発現解析を行った。ミトコンドリアおよび核膜孔を標的とした APEX 反応を行い、RNA を精製した後、微量 RNA に対応可能な発現解析 (SMART-seq) に提出した。得られたデータを fastp (0.23.2), STAR (2.7.10a), samtools (1.16.1), stringtie (2.2.1) を用いて解析した。ミトコンドリアおよび核内に特徴的な RNA が濃縮されることを期待していたが、結果的に、濃縮は明らかでなかった。原因としては、ビーズ周囲に非特異的に残存する未標識の RNA に対して、ビオチン化標識を受けた RNA が少なすぎるという可能性が最も疑われた。ビオチン化修飾を受けた RNA の量を増大すべく、APEX タンパク質の発現そのものを高める必要があると考え、ウイルス感染による安定発現株は用いず、一過性発現による強力な発現誘導を試みることにした。

一過性発現を行うため、ベクターを再度構築した。レンチウイルスベクターから、CMV プロモーター下で強力な発現誘導が可能な pcDNA3 にバックボーンを変更した。次に、これらのベクターを HEK293T に対して transfection し、同様に APEX 反応を行った。qPCR で、ビオチン化 RNA の精製前後の各遺伝子の発現量の比を算出し、さらに、コンストラクト間で正規化を行い、相対的な濃縮率の比を算出した。ミトコンドリア標的では 50 倍程度、核標的では 30 倍程度の濃縮が、特異的に生じることが示された。細胞内小器官を標的とする

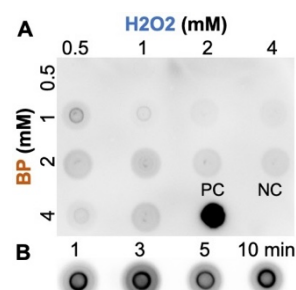


Figure 2. Optimization of the APEX reaction via dot-blotting assay of biotinylated RNA. (A) An optimal concentration of the substrates. Reaction time, 1 min. (B) Sufficient reaction time with H₂O₂. BP 2 mM, H₂O₂ 0.5 mM.

APEX 反応が、HEK293T において、一過性発現の場合に成立することが示された。

そこで K562 においても、APEX2 融合タンパク質の一過性発現を評価した。浮遊細胞である K562 への transfection は、electroporation で実施した。Neon transfection system で electroporation の条件検討を行い、再現性をもって、約 30% の導入効率が得られるようにパラメーターを設定した。GFP 陽性細胞をソーティング後、蛍光免疫染色を行うと、例えばミトコンドリアを標的にした Mito-APEX は細胞質には局在するが、強力な過剰発現によりミトコンドリアの局在がはっきりしなくなる現象が観察された (Fig. 3)。ソーティングで得た GFP 陽性細胞に対して、APEX 反応、ビオチン化 RNA の精製、qPCR を行ったところ、ミトコンドリア標的では 10 倍程度、核標的では 4~10 倍程度の濃縮が、特異的に生じることが示された (Table 1)。細胞内小器官を標的とする APEX 反応が、K562 においても、一過性発現の場合に成立することが示された。HEK293T と比較して濃縮効率が落ちるものの、SMART-seq を実施して評価したが、残念ながらミトコンドリアおよび核内に特徴的な RNA の濃縮が見られなかった。

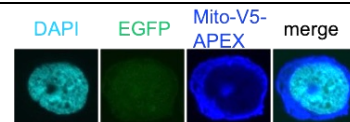


Figure 3. Immunofluorescence analysis with anti-V5 antibody.

	Mito	NLS	NES
GAPDH	1.0	1.0	1.0
XIST	3.2	10.5	1.0
NEAT1	4.2	1.9	1.0
MALAT1	2.1	4.1	1.0
IARS2	1.2	0.6	1.0
MT-ND5	11.2	2.4	1.0
MT-CYB	8.6	1.2	1.0
MT-ATP6	8.9	2.1	1.0
MT-CO2	12.0	2.3	1.0
MT-ND1	8.8	1.3	1.0
SSR2	1.6	1.1	1.0
RPS14	2.3	1.7	1.0
BIRC5	1.0	0.8	1.0

Table 1. Relative enrichment ratios in transfected K562 cells.

3. プロテオゲノミクス解析

白血病細胞株 K562 に hotspot mutation である SRSF2 P95H 変異を CRISPR Cas9 技術を用いてノックインした細胞株および synonymous mutation をノックインした SRSF2 Wildtype (WT) 細胞を準備し、PacBio 社の Iso-seq により ultra-deep RNA-seq を実施した。その結果、WT 細胞では 1,148,799 個、P95H 細胞では 1,306,018 個の isoform が検出された。これらの isoforms は、乳がんにおける long-read RNA-seq の先行研究¹⁰を参考にして、それらのスプライスジャンクションがリファレンストランスクリプトーム (GENCODE v.30) と一致するかどうかに基づいて、SQANTI を使用して既知または新規の isoforms に分類した。その際、既知の isoforms は、完全スプライス一致 (full-splice match: FSM) として分類した (Fig. 4)。一方、新規の isoforms は、従来のカタログに載っていない既知のスプライスドナーまたはアクセプターの組み合わせを含むトランスクリプト (Novel in catalog: NIC)、および GENCODE v.30 に存在しない少なくとも 1 つのスプライスサイトを有するトランスクリプト (Novel not in catalog: NNC) を含む。その結果、SRSF2 P95H 変異細胞では、Novel in catalog の比率が WT と比較して高いことがわかった (Fig. 5)。それぞれの structural classification ごとの取得 transcript の長さはおおよそ当初想定したものと一致していた (Fig. 6)。

これらのデータを元に、予測される蛋白質配列のデータベースを構築した。また proteome 解析については、SRSF2 WT/P95H の 2 種類の細胞 x 5 種類の酵素処理 (アスパラギン酸エンドペプチダーゼ AspN、キモトリプシン Chy、グルタミン酸エンドペプチダーゼ Glu-C、リジルエンドペプチダーゼ Lys-C、トリプシン Tryp) の計 10 サンプルの高深度 DIA プロテオーム解析を実施した。その結果、頻用される 5 種類の Multiprotease 処理により計 9,622 種類のタンパク質の検出に成功した。また 5 種類の Multiprotease 処理のうち、SRSF2 P95H 変異細胞において酵素特異的に検出されるタンパク質は Tryp 処理が最も多かった。さらに、SRSF2 WT 細胞では検出されず、SRSF2 P95H 変異細胞においてのみ特異的に検出されたタンパク質は 328 種類に上った。

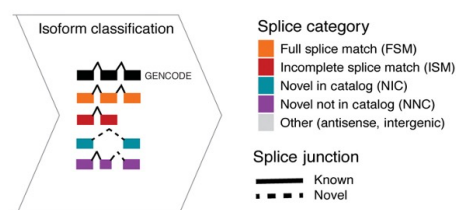


Figure 4. Classification of RNA splicing products based on Iso-seq data.

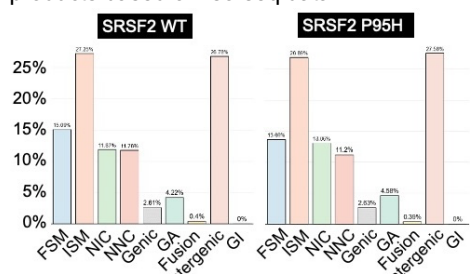


Figure 5. Isoform distribution across structural categories.

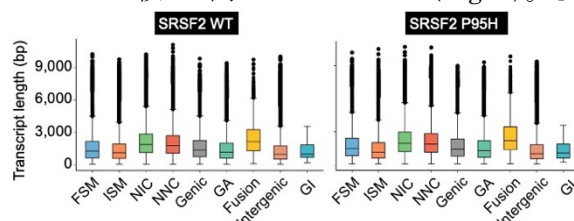


Figure 6. Transcript lengths by structural categories.

4. 新規「結合」プロファイリング技術

RNA の Proximity labeling については、既報通りに実施しても、それを改変してのべ 1,000 以上の条件で検討しても、上記のように技術的に非常に難しいことが判明した。Proximity labeling 技術は、注目する RNA binding protein (RBP) 等に「近接」する RNA を検出する手法であるが、RBP に直接「結合」する RNA を検出する methodology に修正することとした。

新たに用いる「結合」プロファイリング技術について: RBP が結合する RNA の標的探索についてはこれまでも CLIP (cross-linking and immunoprecipitation)-seq などの手法が開発されているが、いずれも注目する RBP に対する抗体に依存した手法である。そこで私達は抗体の特異度あるいは入手性に依存しない seCLIP (single-end enhanced CLIP)-seq 法の開発に成功した (Highly accurate & reproducible CLIP-seq: “HareCLIP-seq”と命名; 学会発表のみ)。HareCLIP-seq は内因性 RBP の結合データを取得可能であり、ENCODE project¹¹ で取得された CLIP データと比較して網羅性・正確性・再現性ともに圧倒的な優位性を持つ(*後述)ことから、これまでの CLIP-seq では見えなかった RNA processing の機構が見えつつある。なお、HareCLIP-seq に用いる細胞は、同様に抗体入手性非依存的に蛍光免疫染色 (IF) が可能であることから、注目する RBP の局在についても正確な評価があわせて可能である。さらに、高精度で局在評価が可能のため、RNA 一分子の超解像度顕微鏡による局在解析への応用が可能となる。

「近接」から「結合」への方向転換で想定される Pros: Proximity labeling は注目する RBP の近くに存在する RNA が検出されることから直接的な標的かどうかの判定ができないのに対し、HareCLIP-seq は標的 RNA の正確な同定が可能であり、偽陽性を確実に減らすことができる。また、Proximity labeling は注目する RBP に APEX2 を融合させた過剰発現を要する(後述のようにビオチン化を強く誘導するためにはかなりの高発現が必要)が、HareCLIP-seq は「内因性の RBP」の標的 RNA を評価可能であり、生理的条件下で profiling が可能である。この点は細胞内局在の観点からも重要であり、例えばミトコンドリアを標的にする Mito-APEX の局在は強力な過剰発現によりはっきりしなくなる (Fig. 1A と Fig. 3 を比較) 現象が観察された。後述のように Proximity labeling におけるビオチン化には強力な過剰発現が必要だが、Fig.3 の条件ではミトコンドリアというよりむしろ細胞質に局在する RNA が labeling され、ミトコンドリア遺伝子由来 RNA の濃縮が得られなかった可能性が高い。この点は Proximity labeling の限界と考えられる。また、RNA 分解に寄与する RBP の過剰発現は、標的 RNA の分解促進に働く可能性が高く、その観点からも HareCLIP-seq が生理的条件下で profiling 可能な点は重要である。

「近接」から「結合」への方向転換で想定される Cons: HareCLIP-seq においては、Proximity labeling で得られる細胞内の位置情報が失われる可能性があるが、上記のように過剰発現が RBP の細胞内局在に与える悪影響を考慮すると、むしろ HareCLIP-seq に用いる細胞における IF で内因性 RBP の局在を評価した方が、正確に把握できる可能性が高い。HareCLIP-seq は RBP にしか適用できないため、承認済み計画書内に記載のあるオートファゴソームに関する LC3B や細胞内オルガネラとの関係において RNA の濃縮はできなくなるが、精密な IF による評価で代替可能である。

*HareCLIP-seq の正確性・再現性・有用性

いわゆるスプライシング因子 (SF) によるスプライシング制御機構は、これまで驚くほどあいまいにしか解明されておらず、その原因の大部分は SF に対する特異的な抗体入手性に依存した標的遺伝子 (RNA) の profiling 法にある。私達が開発した HareCLIP-seq 法により、最大かつ主要な SF ファミリーでの一つである SR タンパク質 (SRSF1~SRSF11) について profiling した結果を Fig. 8 に示す。例えば SRSF2 について、結合シグナルの peak や結合領域のモチーフが明瞭に定義される (Fig. 7A-B)。重要な点として、356 種類もの RNA 結合蛋白質の網羅的プロファイリングを謳う業界最大規模の先行研究である ENCODE project と比較すると、そもそも ENCODE で CLIP-seq が実施された SR タンパク質は 3 種類しかない (Fig. 7C)。また、当該 SR タンパク質をノックダウンした際のスプライシング変化を生

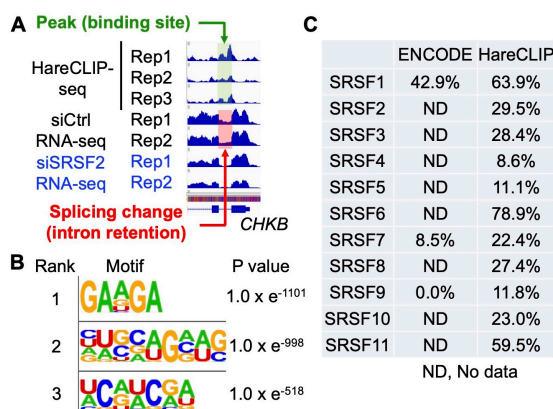


Figure 7. (A) SRSF2 の HareCLIP-seq で検出した CHKB 遺伝子上の結合 peak と SRSF2 をノックダウンした際のスプライシング変化 (例)。 (B) SRSF2 の結合モチーフ。 (C) ENCODE project および HareCLIP-seq の結果の比較。

じる領域と CLIP-seq で定義された結合領域のオーバーラップをみると、特に SRSF2~SRSF11 では HareCLIP-seq 法の精度が大幅に改善されていることがわかる。同様に、ENCODE で CLIP-seq が実施された 150 種類の RBP の中で、結合部位が再現性良く(D-score < 0.05)解析された RBP はわずかに 16 種類(11%)しかなかったが、SR タンパク質の HareCLIP-seq 法による解析ではいずれも再現性が桁違いに良好であった(100%; すべて D-score < 0.0001)。

以上のことから、HareCLIP-seq 法と IF による局在評価を組み合わせることで本研究に活用することによって、Proximity labeling と比較してより精度・再現性の高い profiling が可能であると考えられた。

5. Omics 解析の結果

Nanopore Direct RNA-seq (以下 Nanopore-seq) データを用いて RNA 転写後修飾を深層学習により解析するツールを用いることにより、網羅的プロファイルを得ることに成功した。そこで、HareCLIP-seq で得られたデータを元に Multi-Omics 解析を実施した。その結果、今回得られたある RNA 修飾(以降 RNA 修飾 X と表記)部位と、注目する SRSF2 タンパク質の RNA 結合部位が特徴的に一致することが示唆された。以上の観察結果から、SRSF2 は、RNA 修飾 X サイトを認識する可能性が示唆された。そこで、biotin 化した、RNA 修飾 X を含む RNA (および RNA 修飾 X を含まない RNA) による pulldown assay を行い、質量分析により RNA 修飾 X を含む RNA に結合する RNA 結合タンパク質を調査したところ、SRSF2 が 5.8 倍に enrich されていた (Fig. 8)。

続けて、RNA 修飾 X に関わる酵素である Y に注目した。Y をノックダウンすると、グローバルに RNA 修飾 X レベルが低下することが確認された。また、同細胞では RNA 修飾 X レベル低下部位に一致して SRSF2 の結合が減少していた。

このような SRSF2 結合部位に関連する遺伝子群の Gene ontology 解析を行うと、RNA スプライシングや mRNA processing に関わる遺伝子群が Y ノックダウンにより減少することがわかった。このことから、RNA 修飾 X と RNA スプライシングの密接な関わりが示唆された。実際に Y あるいは SRSF2 をノックダウンした細胞におけるスプライシング変化を解析すると、各スプライシングイベントの変化量(DPSI 値)は正に相関し($P = 6.0 \times 10^{-216}$) (Fig. 9)、また約 73% のスプライシングイベントが両細胞で overlap していた。

次に、骨髄系腫瘍で頻繁に観察される SRSF2 の Hotspot mutation である SRSF2 P95H 変異と上記の実験結果との関連について調査した。P95H とともに、passenger mutation と考えられる 4 つの variant を用いて、RNA oligo の pulldown assay を行ったところ、P95H においてのみ、RNA 修飾 X を含む RNA/含まない RNA の比が低下することがわかった (Fig. 10)。すなわち、SRSF2

P95H 変異体は RNA 修飾 X への affinity が減少していると考えられた。実際に Y のノックダウンで野生型 SRSF2 が結合しなくなる binding site と、SRSF2 P95H が野生型 SRSF2 と比較して結合しなくなる binding

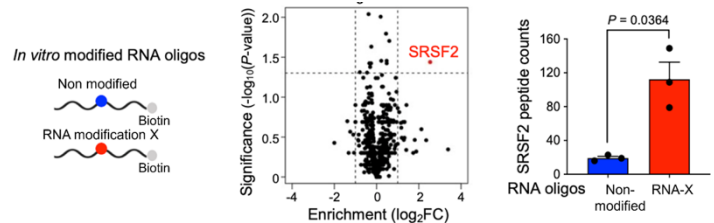


Figure 8. SRSF2 は、修飾されていない対照に比べて RNA-X に対して高い親和性で結合する。中央のボルケーノプロットは、HeLa 細胞においてオリゴ RNA-X とオリゴ非修飾 RNA に結合したタンパク質を示す。

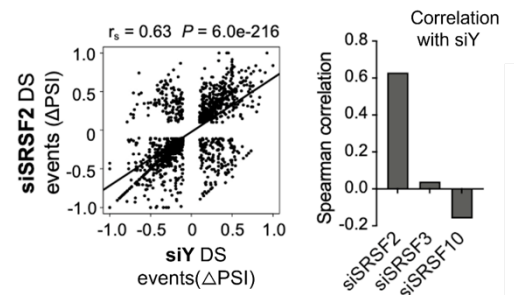


Figure 9. 散布図は、Y および SRSF2 のノックダウン後に同定されたスプライシング変動イベントにおけるスプライシング率変化 (ΔPSI) に強い正の相関があることを示している。siY と siSRSF3 または siSRSF10 間の相関はネガティブコントロールとして使用した。

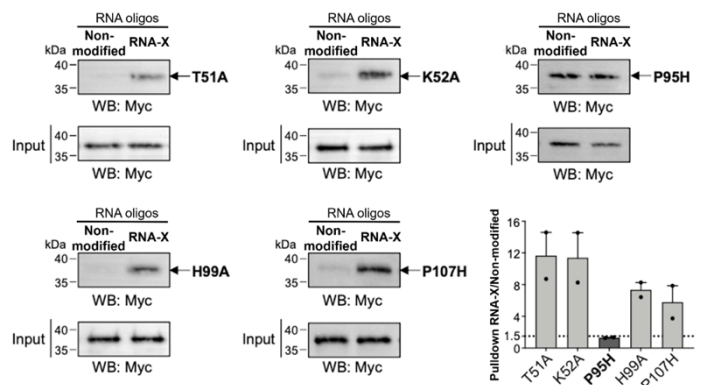


Figure 10. SRSF2^{P95H} 変異体のみが RNA-X への結合の親和性低下を示した。Biotin プルダウンとウェスタンブロット解析により、Myc タグ付き SRSF2 変異体の RNA 修飾 X の有無による RNA オリゴへの結合を調べた。

site は有意に overlap することから、Y の loss と SRSF2 P95H 変異は、SRSF2 の RNA 親和性に関して類似した働きがあることがわかった。

面白いことに、overlap する 1,203 binding site には、EZH2、BRD4、ABL1、MYB など 104 の白血病関連遺伝子が含まれ、SRSF2 P95H 変異体を介した RNA 修飾 X への affinity 減弱が白血病発症に関わる可能性が示唆された。さらに、Y ノックダウンおよび SRSF2 P95H 発現細胞のスプライシング変化を解析すると、両者の間には強力な正の相関関係 ($P = 7.0 \times 10^{-47}$) が観察され、Y の喪失は SRSF2 hotspot mutation と同様のグローバルなスプライシング変化を誘導することがわかった。それぞれのスプライシングイベントからの距離を計測すると、Y ノックダウンおよび SRSF2 P95H 発現細胞において、ともに SRSF2 の binding site の近傍に位置することが確認された。

以上の結果から、本研究開発によって下記のことが見出された。

- SRSF2 は RNA 修飾 X の reader である可能性がある。
- RNA-X 修飾酵素 Y を欠失すると SRSF2 の RNA 結合が減弱し、スプライシングのグローバルな変化を生じる。
- 変異型 SRSF2 は RNA-X 修飾の reader 機能を喪失し、RNA-X 修飾酵素 Y 欠失と同様のスプライシング異常を誘導し、発がんに寄与すると考えられる。

考察

本研究はまた途上であり、特にヒトがん検体において変異型 SRSF2 と RNA 修飾-X との関係が validation されるか、因子 Y の発現量 (+SRSF2 変異の有無) で層別化した際に予後に違いがあるか、など細胞株レベルで確認された知見を臨床でどう活用することが可能かを検討する必要がある。また、Y 阻害剤が最近開発されている。臨床的に、SRSF2 や SF3B1、U2AF1 などのスプライシング因子の遺伝子変異 (SF 変異) は相互排他的であること、マウスの造血モデルにおいて 2 種類の遺伝子変異を発現させると重篤な低形成性骨髄となること、などから、SRSF2^{P95H} 変異を mimic する Y 阻害剤は、SF3B1 や U2AF1 変異がんにも有効な可能性がある。一般的にスプライシング因子に遺伝子変異を有するがんは、SF3B1 変異陽性環状鉄芽球を伴う MDS (骨髄異形成症候群) などの一部の例外を除き、高齢者に多く予後が不良であることから、SF 変異がんに対する特異的創薬は臨床的・社会的ニーズが非常に高く、本研究開発の成果は同課題に対する一つの解決策を提案する成果と考えられ、in vitro の検討で有望な場合には CDX モデル、PDX モデルを用いた前臨床試験以降への展開に期待がかかる。

共同研究者

本研究では下記の共同研究者の先生方にお世話になっている。

Dr. Fuks Francois (Université libre de Bruxelles (ULB)), Dr. Adrian Krainer (Cold Spring Harbor laboratory)、油谷浩幸先生 (東京大学)、上田宏生先生 (東京大学)、岩間厚志先生 (東京大学)、足達俊吾先生 (国立がん研究センター)

引用論文

1. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Vabulas RM. Cell. 2011 Jan 7;144(1):67-78.
2. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. Park SH, Kukushkin Y, Gupta R, Chen T, Konagai A, Hipp MS, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Cell. 2013 Jul 3;154(1):134-45.
3. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Trends Cell Biol. 2014 Sep;24(9):506-14.
4. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-

- Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. *Nature*. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
5. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey AL, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie LJ, Stephens PJ, McLaren S, Massie CE, Tarpey PS, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler AP, Teague JW, Baxter EJ, Score J, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi NC, Anderson KC, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren AJ, Cross NC, Green AR, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. *N Engl J Med*. 2011 Oct 13;365(15):1384-95.
 6. Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, Rahman MA, Pastore A, Wang B, Lee SC, Micol JB, Zhang XJ, de Botton S, Penard-Lacronique V, Stein EM, Cho H, Miles RE, Inoue D, Albrecht TR, Somervaille TCP, Batta K, Amaral F, Simeoni F, Wilks DP, Cargo C, Intlekofer AM, Levine RL, Dvinge H, Bradley RK, Wagner EJ, Krainer AR, Abdel-Wahab O. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature*. 2019;574(7777):273-277.
 7. Liu Z, Yoshimi A, Wang J, Cho H, Chun-Wei Lee S, Ki M, Bitner L, Chu T, Shah H, Liu B, Mato AR, Ruvolo P, Fabbri G, Pasqualucci L, Abdel-Wahab O, Rabadan R#. Mutations in the RNA Splicing Factor SF3B1 Promote Tumorigenesis through MYC Stabilization. *Cancer Discov*. 2020;10(6):806-821.
 8. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, Chan B, Keaney G, Thomas M, Agrawal AA, Caleb B, Csibi A, Sean E, Fekkes P, Karr C, Klimek V, Lai G, Lee L, Kumar P, Lee SC, Liu X, Mackenzie C, Meeske C, Mizui Y, Padron E, Park E, Pazolli E, Peng S, Prajapati S, Taylor J, Teng T, Wang J, Warmuth M, Yao H, Yu L, Zhu P, Abdel-Wahab O, Smith PG, Buonamici S. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. *Nat Med*. 2018;24(4):497-504.
 9. Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. Fazal FM, Han S, Parker KR, Kaewsapsak P, Xu J, Boettiger AN, Chang HY, Ting AY. *Cell*. 2019 Jul 11;178(2):473-490.e26.
 10. A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins. Van Nostrand EL, Freese P, Pratt GA, Wang X, Wei X, Xiao R, Blue SM, Chen JY, Cody NAL, Dominguez D, Olson S, Sundararaman B, Zhan L, Bazile C, Bouvrette LPB, Bergalet J, Duff MO, Garcia KE, Gelboin-Burkhart C, Hochman M, Lambert NJ, Li H, McGurk MP, Nguyen TB, Palden T, Rabano I, Sathe S, Stanton R, Su A, Wang R, Yee BA, Zhou B, Louie AL, Aigner S, Fu XD, Lécuyer E, Burge CB, Graveley BR, Yeo GW. *Nature*. 2020 Jul;583(7818):711-719.
 11. A comprehensive long-read isoform analysis platform and sequencing resource for breast cancer. Veiga DFT, Nesta A, Zhao Y, Deslattes Mays A, Huynh R, Rossi R, Wu TC, Palucka K, Anczukow O, Beck CR, Banchereau J. *Sci Adv*. 2022 Jan 21;8(3):eabg6711.

助成研究に関連した発表論文

なし(2026 年投稿予定)