

論 文 内 容 要 旨

題目 Nucleolin facilitates nuclear retention of an ultraconserved region containing *TRA2 β 4* and accelerates colon cancer cell growth

(ヌクレオリンは、超保存領域を含む *TRA2 β 4* を核内に保持し、大腸がん細胞の増殖を促進する)

著者 Yuzuru Satake, Yuki Kuwano, Tatsuya Nishikawa, Kinuyo Fujita, Saki Saijo, Miki Itai, Hiroki Tanaka, Kensei Nishida, Kazuhito Rokutan

平成30年6月1日発行 Oncotarget 第9巻42号
26817頁から26833頁に発表済

内容要旨

ヒトゲノムには、進化の過程で齧歯類以降の高等動物に100%保存された超保存領域 (UCR: ultraconserved region) が481か所存在する。UCRの一部は転写され、T-UCR (transcribed-UCR) と呼ばれる機能性RNAのカテゴリーを形成する。スプライシング調節因子 transformer 2 β (Tra2 β) をコードする *TRA2B* 遺伝子はエクソン2 (276bp) およびその隣接イントロンにUCR (uc.138) を含んでいる。*TRA2B* 遺伝子からは5つのスプライシングアイソフォーム (*TRA2 β 1-5*) が転写されるが、このうち、*TRA2 β 4* のみがエクソン2を含む。申請者らは、*TRA2 β 4* は大腸がん細胞の核内に過剰発現し、p21を介する細胞老化を阻害して異常増殖を引き起こすことを既に報告した。

本研究では、大腸がん細胞株 (HCT116) の核画分とビオチン化した *TRA2 β 4* を用いたRNAプルダウンアッセイ及び質量分析により、*TRA2 β 4* のエクソン2に結合するタンパク質の一つとしてヌクレオリンを新たに同定した。ヌクレオリンの各領域を欠損したタンパク質を作成し、*TRA2 β 4* エクソン2の断片との結合実験を行った結果、ヌクレオリンは、グリシン/アルギニンリッチ (GAR) ドメインを介して *TRA2 β 4* のエクソン2 (485-GGGG-488) に結合することを明らかにした。さらに、ヌクレオリンをノックダウンすると、*TRA2 β 4* の核内での集積が阻害され、*TRA2 β 4* の安定性が低下した。逆に、ヌクレオリンを過剰発現させると、*TRA2 β 4* の核内局在が増加した。ヌクレオリンをノックダウンした細胞では、*TRA2 β 4* の発現低下に伴って細胞増殖能と抗がん剤エトポシドに対

様式(8)

する耐性が低下していた。GAR を欠損したヌクレオリンでは *TRA2β4* の発現低下はレスキューされず、*TRA2β4* の発現調節には GAR が必須であることを見出した。さらに、RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、ヌクレオリンと *TRA2β4* は核内で部分的に共局在することを確認した。また、ヒト大腸がん組織は正常大腸組織より *TRA2β4* を過剰発現しているが、この発現増加と相関し、ヌクレオリンも有意に発現が増加していた。ヌクレオリンと *TRA2β4* の相互作用を介した増殖促進作用は、肺がん細胞株と正常気道上皮細胞株を用いた実験においても確認することが出来た。

以上の結果から、ヌクレオリンは GAR ドメインを介して *TRA2β4* の超保存領域と相互作用し、大腸がん細胞の増殖や抗癌剤耐性に関与することを初めて見出した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

報告番号	甲医第 1376 号	氏 名	佐竹 譲
審査委員	主査	高山 哲治	
	副査	片桐 豊雅	
	副査	常山 幸一	

題目 Nucleolin facilitates nuclear retention of an ultraconserved region containing *TRA2β4* and accelerates colon cancer cell growth

(ヌクレオリンは、超保存領域を含む *TRA2β4* を核内に保持し、大腸がん細胞の増殖を促進する)

著者 Yuzuru Satake, Yuki Kuwano, Tatsuya Nishikawa, Kinuyo Fujita, Saki Saijo, Miki Itai, Hiroki Tanaka, Kensei Nishida, Kazuhito Rokutan

平成30年6月1日発行 Oncotarget 第9巻42号
26817頁から26833頁に発表済
(主任教授 六反 一仁)

要旨 スプライシング調節因子 transformer 2β をコードする *TRA2B* 遺伝子は、エクソン2とその隣接イントロンに超保存領域を含んでいる。*TRA2B* 遺伝子からは5つのスプライスアイソフォーム (*TRA2β1-5*) が転写されるが、このうち、*TRA2β4* のみがエクソン2を含んでいる。このエクソン2には複数のストップコドンがあるためタンパク質に翻訳されない。申請者らは、大腸がん細胞の核内に過剰発現する *TRA2β4* は、p21 を介する細胞老化を制御する機能性 RNA であることを既に報告した。本研究では、大腸がん細胞に発現する *TRA2β4* と相互作用するタンパク質を同定し、発がん

における意義を検討した。得られた結果は以下のごとくである。

1. 大腸がん細胞株 (HCT116) の核画分とビオチン化した *TRA2β4* を用いた RNA プルダウンアッセイ及び質量分析により、*TRA2β4* のエクソン 2 に結合するタンパク質の一つとしてヌクレオリンを新たに同定した。

2. ヌクレオリンは、グリシン/アルギニンリッチ (GAR) ドメインを介して *TRA2β4* のエクソン 2 (485-GGGG-488) に結合することを明らかにした。

3. ヌクレオリンをノックダウンすると、核内での *TRA2β4* の保持が阻害され、細胞質の RNA サーベイランス系で速やかに分解された。逆に、ヌクレオリンを過剰発現させると、*TRA2β4* は核内に蓄積した。

4. ヌクレオリンをノックダウンした細胞では、*TRA2β4* の発現低下に伴い細胞増殖と抗がん剤耐性が低下した。GAR を欠損したヌクレオリンは *TRA2β4* の発現低下をレスキュー出来なかった。

5. RNA 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、ヌクレオリンと *TRA2β4* は核内で共局在することを確認した。

6. ヒト大腸がん組織は正常大腸組織より *TRA2β4* を過剰発現しており、この発現増加と相関し、ヌクレオリンも有意に発現が増加していた。ヌクレオリンと *TRA2β4* の相互作用を介した増殖促進作用は、肺がん細胞株と正常気道上皮細胞株を用いた実験においても確認した。

以上の結果より、ヌクレオリンは GAR ドメインを介して *TRA2β4* の超保存領域と相互作用し、大腸がん細胞の増殖や抗がん剤耐性に関与することを初めて明らかにした。

本研究は、ヌクレオリン/*TRA2β4* を介した新たな発がん経路の可能性を示したものであり、臨床的にも重要な発見であることから学位授与に値すると判定した。