

主論文の要旨

**Inhibition of SNW1 association with spliceosomal proteins promotes apoptosis in breast cancer cells**

〔 SNW1 とスプライソソームの結合阻害が乳癌細胞に  
アポトーシスを誘導する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻  
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

佐藤 直紀

## 【緒言】

転写産物RNAからイントロンを取り除くRNAスプライシングは、真核生物のタンパク生成において重要なプロセスである。このスプライシングを行うのがスプライソソームで、5種類の核内低分子RNAと300種類にも及ぶスプライシングファクターと呼ばれるタンパク質から構成されている。近年このスプライシングの阻害が癌細胞に障害をきたすことが報告されており、注目を集めている。small interfering RNA (siRNA) による網羅的な解析により、様々なスプライシングファクターのノックダウンが細胞増殖を阻害することが報告されている。この中のスプライシングファクターで我々が注目したのがSNW1というタンパクで、子宮癌のセルラインであるHela細胞でノックダウンするとM期において細胞周期が停止することが観察されている。SNW1はスプライソソームの1つであるU5 snRNPと関連して機能することが示唆されているが、その詳細な機能については明らかでない。本研究における我々の目的はSNW1の機能阻害が乳癌細胞株に与える影響を調査することと、SNW1の結合タンパクおよびその結合様式を明らかにすることである。

## 【方法】

タンパク間の直接的な結合を評価するため、リコンビナントタンパクを使用した。N末端にHAタグをつけたEFTUD2の結合領域をpcDNA3.1 vectorにインサートし、TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Madison WI) を用いてin vitro translationを行った。GSTタグの付いたSNW1のSKIP領域をグルタチオンビーズに結合させ、in vitro-translationで作成したEFTUD2の結合領域と混合してpull down assayし、抗HA抗体でタンパクを検出することにより結合を評価した。ウエスタンブロッティング、MTT assay、TUNEL assay、免疫沈降法、pull down assayは常法に従って行った。

## 【結果】

まず初めに、正常乳管上皮細胞と7種類の乳癌細胞株においてSNW1が発現していることをウエスタンブロットにて確認した (Fig. 1A)。このうち乳癌細胞株であるMCF7とMDA-MB-231に対して2種類のsiRNAを使用してSNW1の発現をノックダウンし (Fig. 1B)、癌細胞へ与える影響を調べた。MTT assayにより増殖能を評価したところ、両方の細胞株においてSNW1のノックダウンで増殖が阻害された (Fig. 1C)。増殖阻害のメカニズムを明らかにするためsiRNAトランスフェクションの24時間後から48時間後にかけて細胞をタイムラプス顕微鏡で観察したところ、アポトーシスの特徴である細胞膜のブレッキングを伴って死んでいく細胞が多数観察された (Fig. 2A)。そしてこの細胞死がアポトーシスによるものであることを、TUNEL assay (Fig. 2B) およびウエスタンブロッティングにてcleaved PARPを検出 (Fig. 2C) することで確認した。さらに我々はrescue実験として、Flag-SNW1を導入したMDA-MB-231細胞株を樹立し、この細胞株にコントロールsiRNAもしくはmRNAの非翻訳領域をターゲットにするSNW1 siRNA2をトランスフェクションした。TUNEL assayによりアポトーシスを評価

したところ、SNW1 siRNA2はFlag-SNW1を導入したMDA-MB-231細胞株に有意なアポトーシス増加を誘導しなかった (Fig. 2D)。これにより、観察されたアポトーシスがSNW1のノックダウンに特異的であることが明らかになった。

SNW1のノックダウンがどのようなメカニズムで乳癌細胞にアポトーシスをおこすのかを明らかにするため、SNW1の結合タンパクを調べた。FLAG-SNW1を過剰発現させた293T細胞のライセートをFLAGビーズで免疫沈降し、結合タンパクをmass spectrometryにて解析したところ、U5 snRNPのconstitutiveな構成タンパクであるSNRNP200、EFTUD2、PRPF8の3つのタンパクが高いスコアで検出された。さらにこれらのタンパクは、それぞれ抗SNRNP200、EFTUD2、PRPF8抗体で検出することができた (Fig. 3A)。次にFLAG-SNW1の強制発現に加えこれら3つの結合タンパクをそれぞれGFPタグとともに強制発現させ、それぞれの結合を評価した。GFP-SNRNP200、GFP-EFTUD2はFLAG-SNW1で免疫沈降されたが、GFP-PRPF8はされなかった (Fig. 3B)。この結果よりSNW1がダイレクトに結合するのはSNRNP200、EFTUD2であることが推測された。

SNW1のどの領域がこれらのタンパクとの結合に関わるのかを決定するため、SNW1のdeletion mutantを作成し (Fig. 3C)、SNRNP200、EFTUD2との結合を調べた。免疫沈降の結果、SKIPドメインを含む中央の領域がそれぞれEFTUD2、SNRNP200との結合に必要であることがわかった (Fig. 3D)。続いて、EFTUD2のdeletion mutantを作成して結合領域を同定したところ、N末端領域が結合領域であることがわかった (Fig. 4A)。SNW1とEFTUD2のN末端領域の結合がSNRNP200を介している可能性を除外するため、SNRNP200がEFTUD2のN末端領域と結合するかを調べた。SNRNP200とfull length-EFTUD2との結合は確認できたが、EFTUD2のN末端領域との結合は確認できず (Fig. 4B)、SNW1とEFTUD2のN末端領域の結合がSNRNP200を介している可能性は否定された。そこで、SNW1とEFTUD2それぞれの結合領域のリコンビナントタンパクを作成してpull down assayをしたところ、この2つの結合領域が他のタンパクを介さず直接結合することが判明した (Fig. 4C)。さらにSNRNP200についても4つの領域に分けて同様の解析をしたところ、C末端の2つの領域がそれぞれSNW1のSKIP領域とダイレクトに結合することがわかった (Fig. 4D, E)。

最後にこのSNW1とEFTUD2の結合を阻害することで乳癌細胞にアポトーシスを起こすかどうかをMDA-MB231細胞を使って評価した。まずEFTUD2がSNW1と同様、乳癌細胞の生存に不可欠であることを確認した。siRNAにてEFTUD2をノックダウンしたところ (Fig. 5A)、SNW1のノックダウンと同程度のアポトーシスを認めた (Fig. 5B, C)。そこで、内在性のSNW1とEFTUD2の結合を阻害するため、GFPタグのついたSNW1のSKIP領域およびEFTUD2のN末端領域をそれぞれ細胞にトランスフェクションし、24時間後から48時間後にかけて細胞をタイムラプス顕微鏡にて観察した。SNW1のSKIP領域およびEFTUD2のN末端領域の過剰発現は、コントロールに比較して有意に多くのアポトーシスを誘導した (Fig. 5D)。

### 【考察】

我々は、SNW1 のノックダウンが乳癌細胞株にアポトーシスをきたすことを示した。加えて SNW1 および EFTUD2 の deletion mutant を過剰発現させることで、内在性の SNW1 と EFTUD2 の結合を阻害しアポトーシスを誘導することも示した。この結果は、SNW1 がスプライシングの機能さらには細胞の生存に不可欠であることを示している。そして SNW1 およびその関連タンパクの阻害が、癌治療のターゲットとなりうる可能性を示唆している。

SNRNP200、EFTUD2、PRPF8 はいずれも U5 snRNP の constitutive な構成タンパクである。SNRNP200 は RNA ヘリカーゼであり、スプライソソームが活性化する時の U4/U6 snRNA の解離に関与している。SNW1 が SNRNP200 と直接結合することは、SNW1 が SNRNP200 の活性を制御し、U4/U6 snRNA の解離によるスプライソソームの活性化に寄与している可能性が考えられる。また EFTUD2 は GTP と結合すると SNRNP200 の活性を亢進させるが、SNW1 は EFTUD2 と GTP との結合を制御することで SNRNP200 の活性化に影響を与えることも考えられる。今後さらに SNW1 による SNRNP200 の活性制御を明らかにすることは、RNA スプライシングの分子メカニズムを解明するために重要である。

### 【結語】

以上より SNW1 はスプライシングにおいて重要な役割を果たしていること、およびこの機能阻害により乳癌細胞がアポトーシスを誘導することが明らかにされた。