

研究題目 RNA 結合タンパク質 PUM1 のリン酸化解析

研究組織

研究代表者：甲斐田大輔（富山大学医学部）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

RNA 結合タンパク質である PUM1 は、さまざまな mRNA に結合することにより、それらの mRNA の安定性を制御することが知られている。我々は、その中でも CDK インヒビターの 1 つであり、細胞周期進行のブレーキの役割をする p27 をコードする p27 mRNA の安定性について研究を進めている。PUM1 は、EGF 経路の下流においてリン酸化されることにより活性化され、p27 mRNA に結合できるようになる。その結果、p27 mRNA が不安定化し、p27 タンパク質が減少することにより、細胞周期が進行するようになる。すなわち、PUM1 は EGF による増殖刺激を細胞周期進行に繋げる非常に重要な役割を果たしていると言える。

我々の結果から、mRNA スプライシングの阻害剤であるスプライソスタチン A (SSA) で細胞を処理することにより、p27 mRNA と p27 タンパク質が増加し、その結果、細胞周期が停止することが明らかとなった。p27 mRNA が増加するメカニズムを解析したところ、p27 遺伝子の転写は活性化しておらず、p27 mRNA が安定化することが明らかとなった。また、その安定化には PUM1 が関わることを明らかになったものの、スプライシング阻害がどのように PUM1 を不活性化しているかは明らかではない。

上述のように、PUM1 の活性には PUM1 のリン酸化が関わっているものの、PUM1 のリン酸化部位は 10 箇所以上報告されており、いずれのリン酸化部位が SSA 処理による p27 mRNA の安定化に関わっているかは明らかではない。そこで、SSA および、EGF 経路に下流にある PI3K 経路や JAK-STAT 経路の阻害剤である Pictilisib や STAT3-IN で処理した細胞から PUM1 タンパク質

を抽出し、質量分析によりリン酸化レベルが変化するリン酸化サイトを特定することで、SSA 処理時に p27 mRNA が安定化するメカニズムを解明することを目的とした。

[1-2] 研究の方法・経過

Flag タグを付加した PUM1 を発現させた細胞株を SSA、Pictilisib、STAT3-IN 処理し、Flag-PUM1 タンパク質を抽出した。その後、質量分析により、リン酸化部位の特定と、薬剤処理によりリン酸化レベルが変化する部位の特定を行った。さらに、特定したリン酸化部位に変異を導入した PUM1 遺伝子を作成し、細胞に導入することで、p27 mRNA の安定性に与える影響を検証した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

本研究から、PUM1 の報告されているリン酸化サイトのうち、4 箇所が顕著にリン参加されていることが明らかになった。また、そのうちの 2 箇所は SSA 処理によりリン酸化レベルが低下していた。また、今回の解析では若干のリン酸化しか観察されなかったものの、PUM1 の RNA 結合活性に重要であることが報告されているリン酸化部位と、本研究で同定されたリン酸化部位に変異を導入し、p27 mRNA の安定性に与える影響を観察した。その結果、これらの変異体は p27 mRNA の安定性には大きな影響を与えないことが明らかとなった。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

従来 PUM1 のリン酸化が PUM1 の RNA 結合活性や p27 mRNA の安定性に関わると報告されてい

たが、本研究の結果から、それ以外の制御機構も存在することが強く示唆される。今後は、SSA 処理によってリン酸化レベルに変化があったリン酸化部位に関する研究を進めることにより、PUM1 タンパク質のリン酸化の生理的意義を明らかにしたいと考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

- 1) 甲斐田大輔. スプライシング阻害剤が抗がん活性を発揮するメカニズムの解析. 第 28 回日本がん分子標的治療学会, 東京, 6 月 21 日, 2024 年
- 2) 甲斐田大輔. スプライシング阻害が mRNA を安定化させるメカニズムの解明. 第 8 回北陸エピジェネティクス研究会, 富山, 12 月 4 日, 2024 年

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

本研究では、PUM1 タンパク質のリン酸化低下と、p27 mRNA の安定化の直接の関係性は見出すことができなかったものの、PUM1 そのものが p27 mRNA の安定化に関わることはわかっているため、他の RNA 結合タンパク質も含めた結合ネットワークなどを解析することで全体像を明らかにしたいと考えている。また、結果がまとまり次第、速やかに論文化したいと考えている。