イソフラボン中に存在する微量フラボン類によるmRNA成熟阻害を介した抗ガン活性の発現に必要な構造と標的たん白質の同定

増田誠司*

京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学研究室

Structure of Anti-cancer Compound which Inhibits the mRNA Maturation Process from Soyaflavone and Identification of its Intercellular Target Proteins

Seiji MASUDA*

Laboratory of Molecular Biology of Bioresponse, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

The inhibitory activity of mRNA maturation process was observed from soyaflavone fraction using the screening system which monitored the mRNA processing steps. Several flavonoids showed the inhibition of mRNA processing step. To examine the localization of mRNA when mRNA processing was inhibited by these flavonoids, co-immunostaining was performed with SC35, a speckle marker. mRNA was co-localized with SC35 when mRNA processing was inhibited by these flavonoids, suggesting that flavonoids inhibited the mRNA splicing. Then, to identify the intercellular target protein(s) of these flavonoids, flavonoid fixed beads and nuclear extract were used. The components of SF3a and SF3b, U2AF and SF1 were identified by mass-spec analysis. SF3a and SF3b are the components of U2 snRNP and U2AF recruits U2 snRNP to the 3′ splice site. And SF1 is recruited to blanch site. These results indicates that flavonoid interacts with U2 snRNP and its associated factors. Together with the above result, flavonoids inhibit the mRNA splicing process. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 113-117, 2015.

Key words : mRNA, flavonoid, speckle U2 snRNP

超高齢社会を迎えた日本において，悪性新生物（ガン）が心疾患や肺炎，脳疾患等の死因を引き離して死亡原因の1位を占めている．ガンの治療法の1つとして抗ガン剤があるが，その多くは正常な細胞にも作用するため，副作用が問題となっている．このためガンを抑制する機能性化合物を多く含む積極的な摂取が必要となっている．最近mRNA成熟過程の阻害因子が，抗ガン剤としての機能を期待されており，mRNA成熟過程は抗ガン剤探索の有力な標的とされている[1～3]．

*〒606-8502　京都市左京区北白川追分町

そこでmRNA成熟過程の阻害という新しい指向性を持つ抗ガン機能性化合物を効率的に検出する探索系を開発した[4,5]．この系を用いて食品中より活性画分を探索し，大豆イソフラボン画分は，mRNAスプライシング阻害剤のGex1A[6]と同等のmRNA成熟阻害活性があることを見いだした．この効果がmRNAの成熟過程に阻害にあるかを解析した結果，イソフラボン添加濃度依存的に核内mRNAの蓄積を観察した．そこで，イソフラボン画分中の活性成分の単離を試みたところ，特定の構造を持つ複数のフラボノイドに活性を確認した．

本研究は，これらフラボノイドによるmRNA成熟過程の阻害の作用機構の解明を行う．

方　　法

細胞の培養

ヒト骨肉腫由来U2OS細胞をDulbecco's Modified Eagle Medium（D-MEM）（Wako）に，10%ウシ胎児血清（FBS）（HyClone）を添加した培地を用いて，37℃，CO_2 5%，湿度100%条件下で培養した．

6 cm-dish（Nunc）でコンフルエントな状態まで培養した細胞の培地を除去した後，トリプシン処理をおこなって細胞をはがした．培地を加えて全量1 mLとし，細胞を懸濁した．これをセルカウンターで細胞数をカウントし，あらかじめカバーガラスを入れておいた12 well プレートにスプリットし，カバーガラス上で24時間培養した．

サンプルの添加

約40%コンフルエントの状態になったwellに，サンプルをアッセイに適した濃度で添加し，24時間培養した．なお，添加するフラボノイドサンプルは，すべてDimethyl sulfoxide（DMSO）に溶かしたものを用いた．

RNA Fluorescence in situ hybridization（RNA-FISH）

細胞培養とサンプル添加を行った12 wellプレートの各wellを，PBSで洗浄し，10%ホルムアルデヒド/PBSによって20分間固定した．次に，0.1% Triton/PBSによって10分間室温処理して細胞膜を透過化した．これをPBSで3回洗浄後，2×standard sodium cirate（SSC）によって5分洗浄を3回行った．次に，42℃チャンバーでoligo hybridization buffer（Ambion）と1時間プレハイブリダイゼーションし，その後20 pM Cy3-labeled oligo（dT）45 mer probeとともに一晩インキュベートした．翌日，カバーガラス上の細胞を42℃の条件下で，2×SSCで20分間，0.5×SSCで10分間，0.1×SSCで10分間洗浄した．その後，PBSで洗浄し，0.01% 4' 6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）/PBS を用いて5分間核を対比染色した後，PBSで3回洗浄した．退色防止のため，Slow Fade Antifade Kit（Invitrogen）を処理し，カバーガラスをエナメルで封入した．そして，mRNAの局在を蛍光顕微鏡で観察した．

免疫蛍光染色

カバーガラス上に培養した細胞を10%ホルムアルデヒド/PBSを添加し20分間，室温で固定した．次に0.1% Triton/PBSを添加し10分間室温処理して細胞膜を透過化した．その後PBSで洗浄し，6% BSA/PBSでブロッキングを行った．続いてCan Get Signal immunostain SolutionA（TOYOBO）で希釈した一次抗体（核スペックルに対する抗体SC35）を室温で60分間反応させ，PBSで3回洗浄後，Can Get Signal immunostain SolutionA（TOYOBO）で希釈したAlexa488標識二次抗体を60分間反応させ染色を行った．DNAはDAPIを用いて染色した．最後にSlow Fade Antifade Kit（Invitrogen）を使用して封入した．そして，mRNAの局在を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した．

ヒト培養細胞からのたん白質抽出

ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293 Flp-In™ T-REx™細胞（invitroven）を回収し，4倍量のhypotonic buffer（10 mM Hepes/1.5 mM $MgCl_2$/10 mM KCl/0.2 mM PMSF/0.5 mM DTT）で洗浄し，氷上で10分間おいた．次にホモジナイザー（WHEATON）を用いてホモジナイズして遠心し，上清を細胞質抽出物として回収した．沈殿物を半量のlow salt buffer（20 mM Hepes/115 mM $MgCl_2$/20 mM KCl/0.2 mM EDTA/25% Glycerol/0.2 mM PMSF/0.5 mM DTT）を加え懸濁し，撹拌しながら沈殿物の2/5量のhigh salt buffer（20 mM Hepes/1.5 mM $MgCl_2$/1.4 M KCl/0.2 mM EDTA/25% Glycerol/0.2 mM PMSF/0.5 mM DTT）をゆっくりと添加し，更に4℃で30分撹拌した．この溶液において15,000 rpmで10分間の遠心を行い，得られた上清を核抽出物として回収した．得られた核抽出物は，dialysis buffer（20 mM Hepes/100 mM KCl/0.2 mM EDTA/20% Glycerol/0.2 mM PMSF/0.5 mM DTT）を用いて90分×2回透析を行った．以上の操作は全て氷上または4℃で行った．

ビーズへのリガンドの固定化とスクリーニング

1.5 mLチューブへエポキシビーズ（Tamagawa seiki）を500 μgずつとり，遠心分離（15,000 rpm, 5分）を行い，上清を廃棄した．DMF（dimethylformamide）500 μLを添加した後，ビーズを分散させ，遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）し，ビーズの洗浄を行った．エポキシビーズにDMFおよび調製しておいたリガンド溶液を加え，ビーズを分散させた．別の1.5 mLチューブに炭酸カリウムをはかりとり，ここにDMFとリガンド溶液を加えて分散させたビーズを全量移動した．ローテーターを使用し，37℃で一晩，反応させた．この後，遠心分離 15,000 rpm, 4℃，5分）を行い，上清を廃棄した．50%DMF/MilliQ 500 μLを添加してビーズを分散させ，遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）した．MilliQ500 μLを添加してビーズを分散させ，遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）後に上清を廃棄した．50%MeOH/MilliQ 500 μLを添加してビーズを分散させ，遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）後に上清を廃棄した．この操作をさらに2回繰り返し（合計3回）し，ビーズの洗浄を行った．ビーズを50%MeOH/MilliQ 100 μLを添加して分散させ，4℃で保存した．

リガンド固定化ビーズを使用した細胞内たん白質のスクリーニング

氷上にて，ヒト培養細胞から抽出したたん白質溶液を100 mM KCl buffer（2.5 M KCl 20 mL/glycerol 63 g/1 M Hepes-NaOH（pH7.9）10 mL/1 M $MgCl_2$ 500 μL/1 M $CaCl_2$ 100 μL/0.5M EDTA（pH8.0）200 μL/10%NP-40 5 mL/MilliQで500 mLまでメスアップし，0.5M DTT 100 μLと0.2M PMSF 50 μL添加）で1.5 mg/mLに調製した．これを1.5 mLチューブに分注し，遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）を行い，不溶物を除いた．たん白質溶液にprotein inhibitor 4 μLとRNase 40 μgを加え，30℃で20分間RNase処理した．その後遠心分離（15,000 rpm, 4℃，5分）を行い，上清を回収し，後の操作で加えるたん白質溶液とした．リガンド固定化ビーズを分散後，50 μLずつ1.5 mLチューブへとった．100 mM KCl buffer 200 μLを加え，分散させた．上清を廃棄したビーズの入っている1.5 mLチューブへたん白質溶液を各200 μL添加し，分散させた．その後，4℃でローテーターにて撹拌しながら一晩結合反応を行った．

一晩反応させた後スピンダウンし，磁気分離（4℃）を行った．この操作をさらに2回繰り返した．リガンド結合ビーズに1×dye溶液35 μL加えて分散させ，3分間ボイルした．スピンダウン後，磁気分離（室温）を行い，新しい1.5 mLチューブに上清を回収した．加熱溶出サンプルのうち，各5 μLにおいて電気泳動を行った．

銀染色

SuperSep™ Ace, 5-20%（Wako）グラディエントゲルを用いて電気泳動後，ゲルをFix solution（40% EtOH/10% AcOH）で30分間固定した．固定後，Sensitizing solution（30% EtOH/0.125% Gluteraldehyde/0.2% Sodium thiosulphate/0.07% Sodium acetate）で30分間反応させた．MilliQで5分×4回洗浄後，Silver solution（0.25% silver nitrate/0.015% ホルムアルデヒド）で20分間反応させ，さらにMilliQで1分×2回洗浄後，Develop solution（0.025% Sodium carbonate/0.007% Formaldehyde）で発色させた．十分に発色が確認された時点で，Stop solution（1.5% EDTA·$2H_2O$）を添加して反応を止め，MilliQで5分×3回洗浄後，LAS-1000（FUJIFILM）を用いて撮影した．

結　　果

フラボン類からのmRNA成熟阻害活性成分の探索

フラボノイドの中で，アピゲニン，クリシン，ルテオリンに活性を確認した．そこで，これらのフラボノイドによりmRNAが核内に蓄積するかについて観察すると，いずれも添加濃度依存的にmRNAは核に蓄積した．これらの活性の強さは，Fig. 1のとおりであった．一方，他のフラボノイドはmRNA成熟阻害活性を持たなかった．

フラボノイド添加によるmRNA蓄積部位の解析

アピゲニン等のフラボノイドがmRNA成熟過程のどの過程を阻害しているかについて解析するためにmRNA蓄積場所の同定を行った．SC35は，スプライシングに必須の因子として知られているが，同時に核スペックルと呼ばれる核内構造体に局在する．そこでSC35抗体を用いて共染色を行いmRNA蓄積部位との比較を行った（Fig. 2）．その結果，ポジティブコント

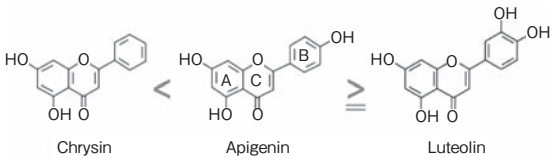

Fig. 1. The structure of flavonoids and its activity.

ロールとして使用したGex1Aを添加するとmRNAは核内に局在し，しかもSC35の局在と一致した．クリシンやルテオリンでも同様の結果を得た．

免疫沈降法による標的たん白質の同定

質量分析装置で解析した結果，共通してmRNAスプライシングに必須とされるSF3a，SF3b，U2AFなどのU2SnRNP構成因子が多数同定された．これらの結果から，フラボノイドによるmRNA成熟過程の阻害は，mRNAスプライシング過程である事が強く示唆された．

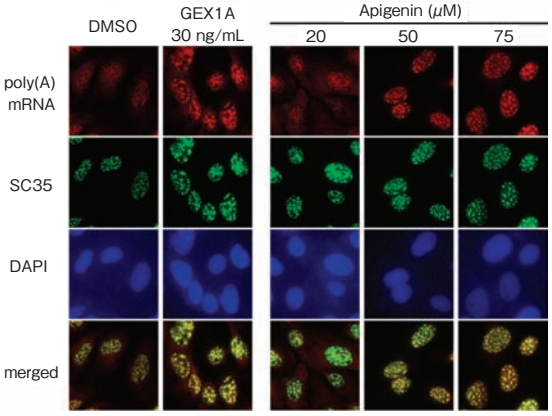

Fig. 2. Localization of mRNA in the nucleus.

考　　察

mRNA成熟阻害活性を持つフラボノイド（アピゲニン，ルテオリン，クリシン）を添加した細胞において，免疫蛍光染色でmRNAの局在を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて観察した．共焦点顕微鏡を用いたことでmRNAの局在を明確に観察することが出来た．観察結果より，アピゲニン，ルテオリン，クリシンを添加した細胞のmRNAは，核スペックルと呼ばれる核内構造体に局在していることがわかった．核スペックルとは核質のクロマチン間に存在し，前駆体mRNAに対するスプライシング因子を多く含むだけでなく，mRNA核外輸送複合体の形成も行う核内構造体である．このことと，RNAスプライシング阻害剤であるGEX1Aを添加した時と同様の結果が得られたことから，アピゲニン，ルテオリン，クリシンのmRNA成熟阻害はRNAスプライシング阻害である可能性が示唆された．

フラボノイドを固定化したビーズを用いて細胞内標的たん白質の同定を行った．質量分析の結果より，アピゲニンとルテオリンの標的たん白質として，SF3a，SF3b，U2AFなどのU2SnRNP構成因子やその相互作用因子が多数同定された．このことから，アピゲニンやルテオリンはmRNAスプライシングに関する因子と相互作用することが判明した．この結果とフラボノイド添加時のmRNA蓄積部位がスペックルである事，mRNAスプライシングを阻害するGex1A添加においてもスペックルにmRNAの蓄積が観察されること，さらにGex1Aは，スプライシング因子SF3bのサブユニットSAP155に結合することによりSF3bの機能を特異的に障害すること[6]から，これらフラボノイドによるmRNA成熟過程の阻害はmRNAスプライシング過程にあることが強く示唆された．

要　　約

mRNAのプロセシング過程をモニタリングするシステムを用いて探索した結果，大豆イソフラボン画分にmRNA成熟阻害活性を見いだした．活性化合物の単離を試みることに加えて，フラボン類の活性を個別に探索した．その結果，特定の構造を持ついくつかのフラボノイドに同様の活性を見いだした．これらフラボノイドによるmRNA成熟過程の阻害の作用機構を解析するために，mRNAの局在を観察したところ，mRNAはスペックルに局在した．さらに，細胞内の標的たん白質の同定を行ったところ，U2 snRNPの構成因子やその相互作用因子を同定した．これらの結果から，フラボノイドはmRNAスプライシングを阻害していることが示唆された．

文　　献

1）Kotake Y, Sagane K, Owa T, Mimori-Kiyosue Y, Shimizu H, Uesugi M, Ishihama Y, Iwata M and Mizui Y (2007): Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol,* **3**, 570-575.

2）Kaida D, Motoyoshi H, Tashiro E, Nojima T, Hagiwara M, Ishigami K, Watanabe H, Kitahara T, Yoshida T, Nakajima H, Tani T, Horinouchi S and Yoshida M (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol,* **3**, 576-583.

3）小竹良彦，水井佳治（2010）：スプライシング因子を標的とする抗癌剤研究．細胞工学，**29**, 168-174.

4）Fujita K, Okamura M, Nishimoto S, Kurihara T, Momma K, Miyamae Y, Kambe T, Nagao M, Narita H and Masuda S (2012): Establishment of a monitoring system to detect inhibition of mRNA processing. *Biosci Biotechnol Biochem,* **76**, 1248-1251.

5）Fujiwara N, Yoshikawa M, Yamazaki T, Kambe T, Nagao M and Masuda S (2010): A screening method tuned for mRNA processing factors in human cells by evaluation of the luciferase reporter activity and the subcellular distribution of bulk poly (A) + RNA. *Biosci Biotechnol Biochem,* **74**, 1512-1516.

6）Hasegawa M, Miura T, Kuzuya K, Inoue A, Won Ki S, Horinouchi S, Yoshida T, Kunoh T, Koseki K, Mino K, Sasaki R, Yoshida M and Mizukami T (2011): Identification of SAP155 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product. *ACS Chem Biol,* **6**, 229-233.