

荒武弘一朗論文内容の要旨

主 論 文

A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at posttranscriptional level: Alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells

RNA スプライシングとシグナル伝達経路のクロストークが転写後のレベルでの Fas 遺伝子の発現を変化させる：U937 細胞における Fas mRNA の選択的スプライシング

荒武弘一朗 蒲池誠 岩永希 川崎英二 和泉泰衛 井田弘明 田中史子
玉井慎美 有馬和彦 中村英樹 折口智樹 川上純 江口勝美

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 143 巻 3 号 184-191 2005

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻
(指導教授：江口勝美教授)

緒 言

遺伝子の約 75%は選択的スプライシングを受ける。その制御機序の解明やスプライスヴァリアントの機能解析はポストゲノム研究の重要課題だが、適切なレポーターアッセイ系が組めないなど転写研究に比して実験上の制約が多く RNA スプライシング研究は遅れている。選択的スプライシングは Fas 遺伝子についても多くの報告があるが、いずれも DNA の点突然変異によるものであった。近年 Cutaneous T-cell lymphoma 患者リンパ球で点突然変異によらない Fas 遺伝子の新規スプライスヴァリアントが報告された(Cancer Res, 2002)。これは 152bp の intron5 を保持しておりドミナントネガティブとして機能すると推察されている。スプライシング因子である SR 蛋白質のリン酸化状態変化は RNA スプライシングを修飾する。アポトーシス過程では SR 蛋白質のリン酸化や脱リン酸化が行われるが、この過程に着目すれば SR 蛋白質のリン酸化状態変化にターゲットを絞った選択的スプライシングの制御機序の解析が可能となる。

本研究では各種アポトーシス誘導下で活性化する細胞内シグナル伝達経路のいずれが上記の新規スプライスヴァリアントの誘導に関与するかを検討した。

対象と方法

1. U937 細胞株をエトポシド、パクリタキセル、スタウロスポリン、シクロヘキサミドで刺激し、RNA を抽出した。上記の Fas の新規スプライスヴァリアントに特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い選択的スプライシングの誘導の有無を検討した。
2. アポトーシスの誘導はフローサイトメーターで評価した。
3. 誘導されたスプライスヴァリアントに 152bp の intron5 の挿入があるかどうかを両方向のシーケンシングにより検討した。

4. 選択的スプライシングの kinetic study をエトポシドを用いて1~4時間の時間経過で行った。
5. MAP kinase 阻害剤、phosphatase 阻害剤を用いた chemical inhibition によりエトポシドで誘導される選択的スプライシングに関与する細胞内シグナル伝達経路の検討を行った。
6. セラミド合成経路が選択的スプライシングの誘導に関与するかどうかを C-6 セラミド及びセラミド合成阻害剤を用いて検討した。

結 果

1. 上記の pro-apoptotic な刺激はいずれも Fas 遺伝子の選択的スプライシングを誘導し、これは新規スプライスヴァリエントと同一のシークエンスであった。
2. エトポシド刺激の 1 時間後から Fas 遺伝子の選択的スプライシングが時間依存性に誘導された。
3. Serine/threonine phosphatase 阻害剤である calyculinA はエトポシド刺激で誘導される Fas 遺伝子の選択的スプライシングの誘導を容量依存性に抑制したが、MAP kinase 阻害剤 (SB202190:p38 と JNK 阻害剤、SB203580:p38 特異的阻害剤) はいずれも抑制しなかった。
4. C-6 セラミドは Fas 遺伝子の選択的スプライシングを容量依存性に誘導したが、これはセラミド合成阻害剤 (Fumonisin B1) で抑制された。

考 察

アポトーシス過程での caspase などのプロテアーゼの活性化は良く知られた現象だが、同時に様々な kinase や phosphatase の活性化が生ずる。特にエトポシドなどの抗癌剤はセラミドの生合成を誘導し、その下流で serine/threonine phosphatase が活性化することが知られている。

本研究は複数の pro-apoptotic な刺激はアポトーシスを誘導し、serine/threonine phosphatase を活性化して Fas 遺伝子の選択的スプライシングを誘導することを明らかにした。ヒトの RNA スプライシングに関与する SR 蛋白質は 11 種類が報告されている。SR 蛋白質の選択的スプライシングへの関与が比較的分かっているのは caspase-2 遺伝子の実験系で、私たちはこれまでに caspase-2 の選択的スプライシングが本実験と同様に serine/threonine phosphatase の活性化により誘導されることを報告してきた。これら serine/threonine phosphatase は SR 蛋白質のリン酸化状態を変化、SR 蛋白質の表面電荷の変化により SR 蛋白質同士の相互作用を変化させて選択的スプライシングを誘導していると推察される。本論文では RNA レベルでの解析結果であるが、蛋白質レベルでの遺伝子発現変化を解析するためには本報告とは異なる実験系を選択する必要がある。本実験結果は caspase-8 の選択的スプライシングの誘導機序の解析にフィードバックされた。Caspase-8 には Fas と同様に intron を保持したスプライスヴァリエント(caspase-8L)が存在し、ヒトリンパ球は caspase-8L を強発現している。Caspase-8L の post-transcriptional な遺伝子発現変化が蛋白質レベルで起こることを報告した (2005 年度日本免疫学会 oral presentation)。