

岩永希論文内容の要旨

主 論 文

Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli

アポトーシス誘導刺激における細胞内シグナル伝達経路を介した Caspase-2 の
選択的スプライシングの制御

岩永希 蒲池誠 荒武弘一朗 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 145 巻 3 号 105-110 2005

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：江口勝美教授)

緒 言

ヒトでは 75%以上もの遺伝子が選択的 splicing を受けることが明らかとなり、単一の遺伝子から複数の蛋白質を生み出し proteome の多様性を生み出す選択的 splicing の重要性に焦点が当てられつつある。しかしその分子機構はまだ未知の部分が多い。いくつかのアポトーシス関連遺伝子もまた normal transcripts と拮抗する splice variant (dominant-negative) を生み出す選択的 splicing を受ける。アポトーシス関連蛋白である Caspase-2 (Casp-2) はミトコンドリアの上流でチトクローム C の放出を制御する重要な Caspase である。通常の構成的 splicing では pro-apoptotic な Casp-2L が生み出されるが、exon-9 を include する選択的 splicing では anti-apoptotic な Casp-2S が生み出される。本研究では様々な pro-apoptotic な刺激を用いて U937 細胞株にポトーシスを誘導し、Casp-2S の RNA レベルでの発現を RT-PCR 法により解析して Casp-2 の pre-mRNA splicing の変化を検討した。さらに MAPK 阻害剤、フォスファターゼ阻害剤、セラミド合成酵素阻害剤を用いた chemical inhibition により、上記 pre-mRNA splicing にリンクする細胞内シグナル伝達経路の解明を行った。

対象と方法

1. 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 U937 細胞株を刺激し、RNA を抽出した。Casp-2 の exon inclusion の検出に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い選択的 splicing 誘導の有無を検討した。
2. アポトーシスの誘導は DiOC₆ を用いてミトコンドリア膜電位の変化をフローサイトメーターで評価した。

3. エトポシドで U937 細胞株を刺激し、1~4 時間の時間経過で選択的 splicing を検討した。
4. MAPK 阻害剤 (SB203580:p38 特異的阻害剤, SB202190:p38 と JNK 阻害剤)、セリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤 (Calyculin A) を用いて、エトポシドで誘導される Casp-2 の選択的 splicing に関与する細胞内シグナル伝達経路の検討を行った。
5. C-6 セラミド及びセラミド合成阻害剤 (Fumonisin B1) を用いて、セラミド合成経路がエトポシドで誘導される Casp-2 の選択的 splicing の誘導に関与するかどうかを検討した。

結 果

1. 上記のすべてのアポトーシス誘導刺激によりミトコンドリア膜電位の減少を認め、アポトーシスの誘導を確認した。
2. エトポシド刺激では、濃度依存性に Casp-2 の選択的 splicing が誘導された。
3. エトポシド刺激の 1 時間後より Casp-2 の選択的 splicing が時間依存性に誘導された。
4. エトポシド刺激で誘導される Casp-2 の選択的 splicing の誘導はセリン/スレオニンフォスファターゼ阻害剤では容量依存性に抑制されたが、MAPK 阻害剤では抑制されなかった。
5. Casp-2 の選択的 splicing は C-6 セラミドで容量依存性に誘導され、セラミド合成阻害剤で抑制された。

考 察

pre-mRNA の splicing は SR 蛋白とそれらに拮抗する hnRNP 蛋白を含む高分子複合体である spliceosome 内で行われる。RNA splicing ではこれら SR 蛋白質と pre-mRNA 上の splice site の特異的結合がその制御の中心的役割を担っている。U937 細胞株と様々なアポトーシス誘導刺激を用いた本研究では Casp-2 の選択的 splicing が短時間で誘導され、蛋白合成以外のメカニズムの関与が示された。これには①MAPK 活性化を介した hnRNP の再分布、②SR 蛋白の脱リン酸化のメカニズムが考えられた。Chemical inhibition により MAPK 経路ではなくセリン/スレオニンフォスファターゼ (PP1) の活性化による SR 蛋白質の脱リン酸化が Casp-2 選択的 splicing の誘導に関与していることが明らかとなった。PP1 の活性化にはアポトーシス過程でのセラミド合成が関与していると考えられた。一般に、pre-mRNA の splicing の制御には脱リン酸化のみならずリン酸化を含んだ SR 蛋白質のリン酸化レベルの変化が関与すると考えられている。本論文では遺伝子の選択的 splicing の制御が比較的解析されている Casp-2 と SR 蛋白質の脱リン酸化に的を絞った実験系での解析を行ったが、蛋白質レベルでの RNA splicing 制御の解析さらにはその生体内での機能解析を行うには異なる実験系を組む必要があると考えられた。これについては別研究 (ヒトリンパ球を用いた Casp-8 の RNA splicing の実験系) で現在解析を行っている。