

平成21年 9月30日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790497
 研究課題名 (和文) *tra2 beta* 遺伝子の選択的スプライシング mRNA アイソフォームの機能解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of function of *tra2 beta* alternative splicing mRNA isoform
 研究代表者
 河合 智子 (KAWAI TOMOKO)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
 研究者番号：40423404

研究成果の概要 (和文)：本研究では、選択的スプライシング調節因子である RNA 結合タンパク質 Tra2b に注目した。はじめに、Tra2b 自身がストレス曝露により一過性に *tra2b4* 選択的スプライシング mRNA アイソフォームを誘導することを認めた。この誘導は、これまで示唆されている自己による遺伝子発現調節機構は関与しない、別の誘導機構であることが認められた。また、Tra2b は、酸化ストレス負荷時に、癌細胞表面マーカーであり腫瘍進行や転移との関与が示唆される CD44 の選択的スプライシング調節へ関与することを認め、科学雑誌にて誌面発表した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we focused on a RNA-binding protein, Tra2b, that regulates alternative splicing. We observed that *tra2b* itself transiently induced its alternative splicing isoform, *tra2b4*, by stress stimuli. This induction was not involved in the self-regulation of expression level of *tra2b*. Different mechanisms seem to exist. Furthermore, we confirmed that Tra2b were involved in the alternative splicing regulation of *CD44* by oxidative stress. CD44 is known to be a cancer cell surface marker and have been suggested to participate in tumor progression and metastasis. We published these results on a scientific journal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学(食道、胃、十二指腸)

1. 研究開始当初の背景

スプライシング調節因子 Tra2b 自身に、選択的スプライシングアイソフォームが存在することは報告されていたが、組織特異的あ

るいは、発生段階特異的であるという、報告のみであった。我々は、ラットの急性潰瘍形成ストレスモデルにおいて、ストレス応答時に、アイソフォームの一つ *tra2b4* がラット

胃粘膜に誘導されることを認めた。そこで、培養細胞を用いてその誘導機構ならびに、意義について検討することを目的とした。

2. 研究の目的

- (1) ストレス負荷時に誘導される *tra2b4* アイソフォームの誘導機構を細胞レベルで明らかにする。
- (2) ストレス負荷時の Tra2b の役割を明らかにするため、その標的に注目する。

3. 研究の方法

- (1) 細胞レベルで検討するため、ヒト胃細胞 AGS を用いた。潰瘍形成ストレス時に認められる、虚血再還流を再現するため、酸化ストレスをストレスモデルとして用いた。
- (2) 誘導機構を明らかにするため、これまでに報告されている、自己調節機構の関与を検討した。まず、外来的に Tra2b タンパク質の発現量を上昇させ、*tra2b4* アイソフォームの誘導量に変化が認められるか、観察した。次に、このようなアイソフォームを特異的に分解することが示唆されている機構、non-sense mediated decay (NMD) が関与しているかどうか、その構成因子の一つ (UPF) を siRNA 法にて消失させ、*tra2b4* アイソフォームの誘導量の変化に注目した。
- (3) ストレス負荷時の Tra2b タンパク質自身の機能に注目するため、その標的遺伝子として CD44 の選択的スプライシングパターンの変化を検出した。11 種類のプライマーセットを準備し、リアルタイム定量的 PCR 法にて変化量を測定した。

4. 研究成果

- (1) ラットに、急性潰瘍形成ストレスである心理的ストレスの一つ、水浸拘束ストレスを負荷すると、胃粘膜において、*tra2b* 遺伝子の選択的スプライシングの変化による、*tra2b4* アイソフォームが誘導されることを認めた。(図 1 参照)

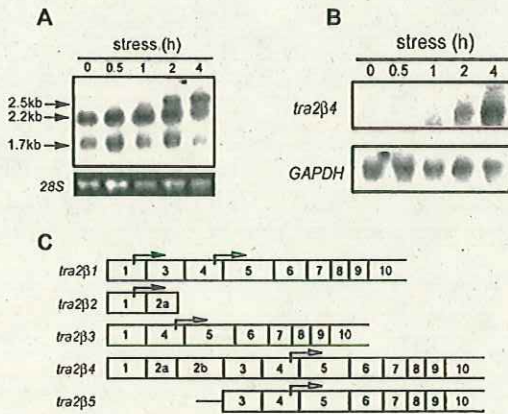


図1 急性心理的ストレス負荷時のラット胃粘膜における *tra2b* の発現について

- (2) AGS 細胞レベルにおいても、虚血再還流の再現を目的とした、酸化ストレス負荷によって、一過性の *tra2b4* アイソフォームの誘導とともに、Tra2b タンパク質の一過性の発現低下が認められた。(図 2 参照)

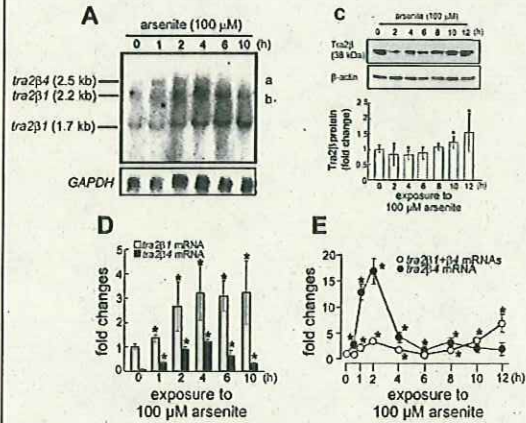


図2 酸化ストレス負荷時の Tra2b 発現量の変化

- (3) AGS 細胞において酸化ストレス負荷後、一過性に Tra2b の核から細胞質への移行が認められた。酸化ストレス負荷直後には、Tra2b によるスプライシング調節が欠失している可能性が示唆される。(図 3 参照)

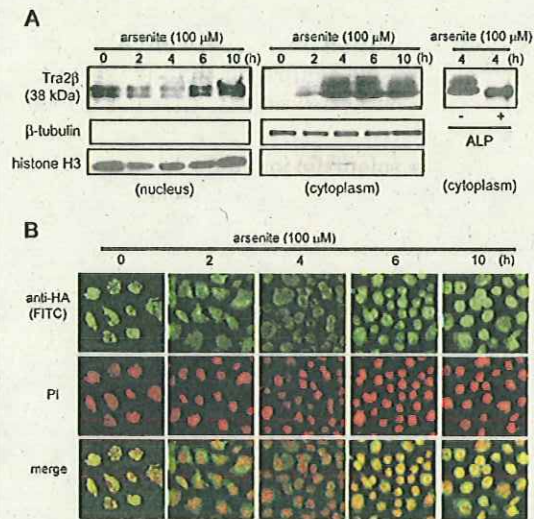


図3 酸化ストレス負荷時の Tra2b の細胞内局在の変化

- (4) 酸化ストレス負荷時の *tra2b4* アイソフォーム誘導には、これまで報告されている自己による遺伝子発現調節は関与しているとは考えられなかった。Tra2b の過剰発現系、NMD の構成因子である UPF のノックダウン、どちらも *tra2b4* 誘導に影響しなかった。ストレス負荷時とは異なるストレス負荷時特

有の誘導機構が存在する可能性が考えられる。(図4参照)

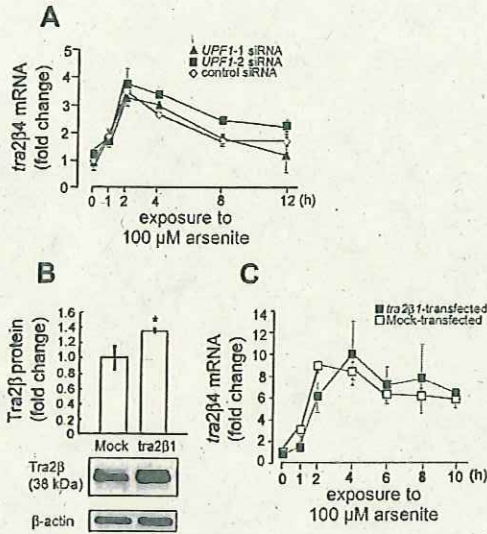


図4 *tra2b4*の誘導に及ぼすTra2Bの自己調節の可能性の検討

(5) Tra2bが*CD44*の選択的スプライシングパターンの変化を調節し、細胞増殖を調節していることが、Tra2bのノックダウン、ならびに過剰発現系を用いた実験より、明らかになった。(図5参照)

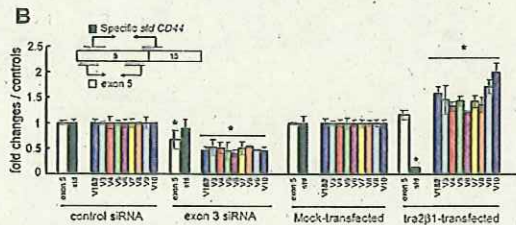


図5 Tra2b発現量の変化による*CD44*の選択的スプライシングの変化

(6) 酸化ストレス負荷時には、*tra2b*の選択

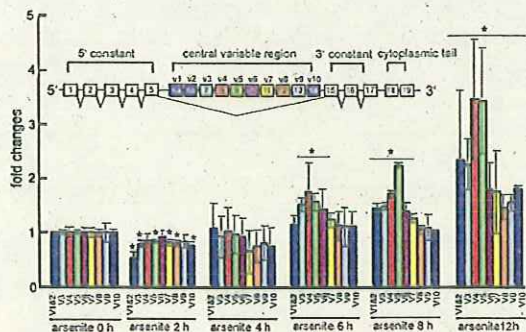


図6 酸化ストレスによる*CD44*の選択的スプライシングの変化

的スプライシング以外に、*CD44*の選択的スプライシングパターンも変化することを認めた。(図6参照)

(7) (1) (2) (6)の結果を考慮すると、この*CD44*の変化は、Tra2bの変化を介したものであることが示唆される。

(8) *CD44*の選択的スプライシングパターンの変化と腫瘍進行や転移との関与がこれまでに示唆されているが、(1)~(7)の結果をまとめると、ストレス負荷時には、Tra2bの発現が調節され、*CD44*の選択的スプライシングパターンが変化し、細胞増殖あるいは腫瘍進行に影響することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Takeo K, Kawai T, Nishida K, Masuda K, Teshima-Kondo S, Tanahashi T, Rokutan K. Oxidative stress-induced alternative splicing of transformer 2beta (SFRS10) and CD44 pre-mRNAs in gastric epithelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 査読有、Vol. 297, No. 2, 2009, pp. C330-338

[学会発表] (計3件)

① 嶽尾敬子、他、A stress-inducible splicing enhancer transformer 2β regulates cell cycle at G1/S checkpoint in gastric epithelial cells. 第4回臨床ストレス応答学会・The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine (合同国際会議)、2009年10月6日~9日、北海道・札幌

② 嶽尾敬子、他、transformer 2 beta 選択的スプライシングの発現パターンと*CD44*選択的スプライシング調節に与える影響、第3回臨床ストレス応答学会、2008年11月14~15日、秋田

③ 嶽尾敬子、他、Expression of stress-inducible transformer 2 beta4 mRNA isoform in gastric epithelial cells. 16th United European Gastroenterology Week、2008年10月18~22日、オーストリア・ウィーン

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 智子 (KAWAI TOMOKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・講師

研究者番号：40423404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：