

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659129

研究課題名(和文)mRNAスプライシングの異常が組織特異的疾患を引き起こすメカニズムの解析

研究課題名(英文)Study on the mechanism of tissue specific diseases caused by mRNA splicing defect

研究代表者

甲斐田 大輔(KAIDA, DAISUKE)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：60415122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類培養細胞において、スプライソソームの構成因子をアンチセンスオリゴを用いることにより個別に阻害したところ、全てのケースにおいてアンチセンスオリゴの濃度依存的にスプライシングを阻害することができた。また、阻害の結果、細胞の生存率が減少したが、その影響は細胞株によって異なることが明らかとなった。

また、スプライシング阻害剤処理によって、マウス3T3-L1細胞の脂肪分化が抑制された。この阻害は、スプライシング阻害剤を加えるタイミングによって影響を受けることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We treated mammalian cells with antisense oligo for each component of spliceosome and found that all antisense oligo could inhibit splicing activity in a dose-dependent manner. Splicing inhibition by the antisense oligos decreased cell survival rate and interestingly the magnitude of the effect was different among cell lines.

We also treated mouse 3T3-L1 cells with a splicing inhibitor and found that adipogenesis was defective after splicing inhibitor treatment. This inhibition was also affected the timing of addition of splicing inhibitor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 医科学一般

キーワード：mRNAスプライシング 組織特異的疾患

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、転写直後の mRNA は未成熟な状態(pre-mRNA)であり、スプライシングによって、遺伝情報を持たないイントロンが切り出され、遺伝情報を持つエキソンどうしが繋ぎ合わされることで成熟型 mRNA が作り出される。すなわち、スプライシングは全ての細胞において、正確な遺伝子発現のために必要なステップである。したがって、スプライシングを司るスプライソソームのコンポーネントの変異や生合成異常は、全ての細胞に同様の影響を及ぼすと考えられるが、実際は網膜色素変性症や、脊髄性筋萎縮症などの組織特異的な疾患を引き起こす。しかしながら、その詳細な発症メカニズムはわかっていなかった。

2. 研究の目的

上記のように、mRNA スプライシングは、真核生物の全ての細胞において正確な遺伝子発現のために必須なメカニズムであり、スプライシング反応を司るスプライソソームの構成因子の変異が、組織特異的な疾患を引き起こすことも知られている。このことは、スプライシングの異常が、全細胞に対し均一の影響を与えるのではなく、それぞれの組織に対し異なった影響を与えると解釈出来る。そこで本研究では、様々な組織由来の細胞において、スプライシング阻害によるトランスクリプトームの変化や細胞生存率を比較することにより、スプライシング異常が、細胞特異的な変化を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とする。このことは、スプライシング異常が組織特異的な疾患を引き起こす原因の解明につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) アンチセンスオリゴを用いた snRNP の機能阻害ならびに細胞増殖に対する影響の観察

スプライソソームは 5 つの snRNP (U1, U2, U4, U5, U6) からなっており、それぞれの snRNP は snRNA という RNA 分子にいくつかのタンパク質が結合したものであり、snRNA と pre-mRNA との RNA-RNA 結合がスプライシング反応に重要である。したがって、この RNA-RNA 結合を阻害するように設計したアンチセンスモルフォリノオリゴ(AMO)を用いることにより、snRNP の機能を特異的に阻害することができる。

これらの AMO を、様々な哺乳類培養細胞に導入し、その後の生存率を測定することにより、それぞれの細胞において 5 つの snRNP のいずれが生存に重要なのかを知ることができる。

(2) snRNP 機能阻害が細胞分化に与える影響の解析

マウス 3T3-L1 細胞は、適切な条件下で培養することにより脂肪細胞へと分化することが知られている。そこで、細胞分化の過程で U2 snRNP の特異的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、脂肪細胞分化に与える影響を調べる。脂肪細胞分化への影響は、脂肪を染色するオイルレッド染色法により確かめる。

4. 研究成果

(1) AMO を用いた snRNP の機能阻害ならびに細胞増殖に対する影響の観察

まずは U1, U2, U4, U6 に対する AMO を用い、HeLa 細胞においてスプライシングの阻害レベルを調べたところ、図 1-4 に示すように、AMO の量依存的にスプライシングが阻害されることが明らかとなった。

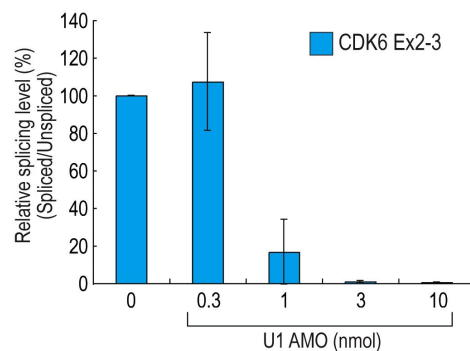


図 1 U1 AMO 処理によるスプライシング阻害レベル

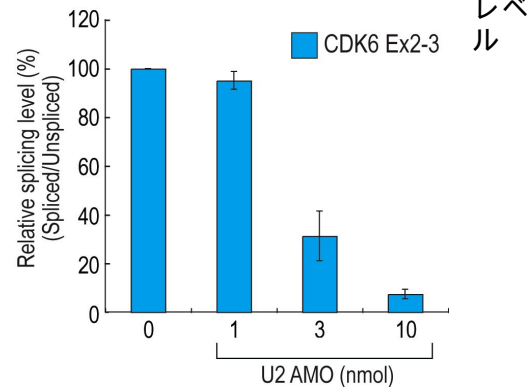


図 2 U2 AMO 処理によるスプライシング阻害レベル

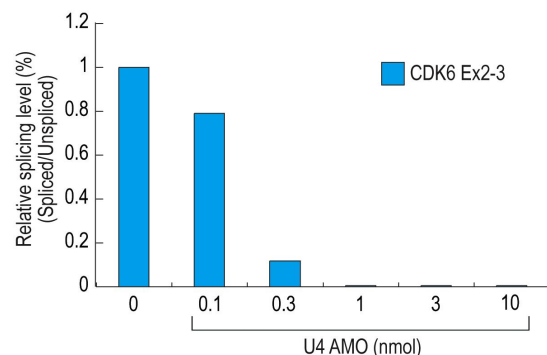


図 3 U4 AMO 処理によるスプライシング阻害レベル

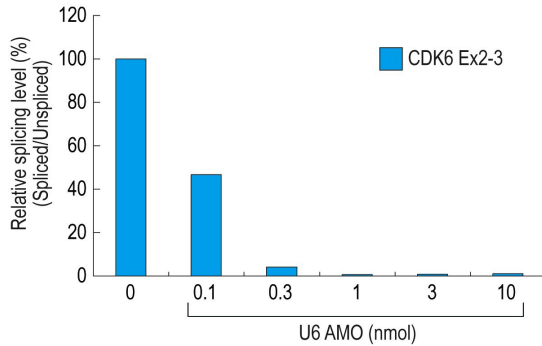


図4 U6 AMO 処理によるスプライシング阻害レベル

また、それぞれの阻害レベルを同じ量の AMO を導入した場合で比較すると、U2 の阻害が最も弱く、U6 の阻害が最も強いことが明らかとなった。

HeLa 細胞においては、これらの snRNP の機能阻害における細胞増殖阻害レベルに際立った差はなかった。しかしながら、マウス 3T3-L1 細胞に対しては、U2 snRNP に対する阻害の感受性が非常に高いことも明らかとなった。

このように、細胞種によって、それぞれの snRNP の機能阻害に対する感受性が異なっていることが明らかとなった。

(2) snRNP 機能阻害が細胞分化に与える影響の解析

マウス 3T3-L1 細胞をコンフルエントまで培養後、2 日間分化培地で培養し、その後 4 日間維持培地で培養した。その際、分化培地のみ、維持培地のみ、双方の培地に様々な濃度の SSA を加え、脂肪細胞への分化レベルをオイルレッド染色で確認した。全期間培地に SSA を加えることにより、脂肪細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。このことから、脂肪細胞分化にはスプライシング活性が必要であることが示唆された。

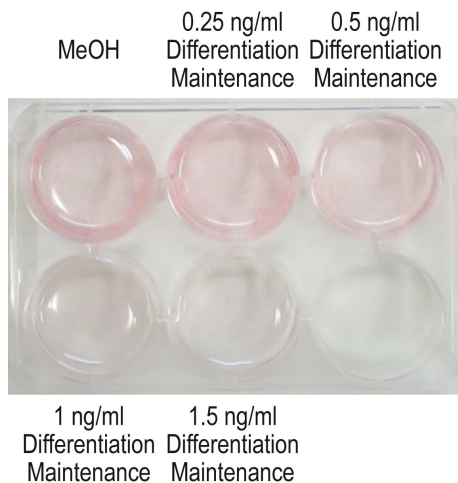


図5 全期間 SSA 処理による脂肪細胞分化効率の抑制

また、後半の 4 日間、維持培地のみに加えた場合では、全期間に加えた場合と比べて阻害の度合いが弱いことが明らかとなった。

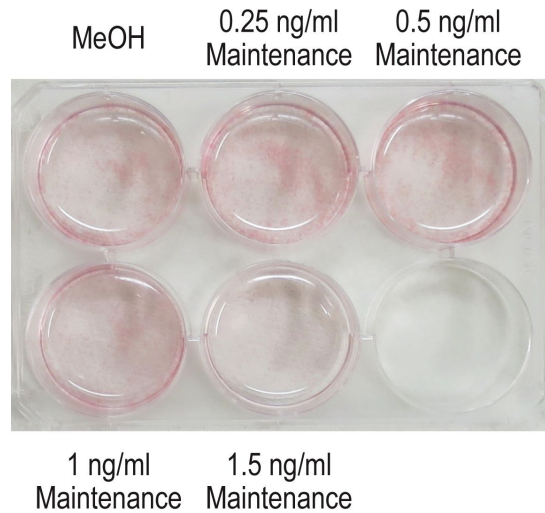


図6 維持段階における SSA 処理による脂肪細胞分化効率の抑制

興味深いことに、最初の 2 日間、分化培地のみ SSA を加えた場合においても、脂肪細胞への分化が抑制され、分化の方向性を決定づける段階で SSA を加えることが、脂肪細胞分化に大きな影響を与えると考えられる。このことは、脂肪細胞への分化の方向付けの段階において適切なスプライシングがさせることが必要であると考えられる。

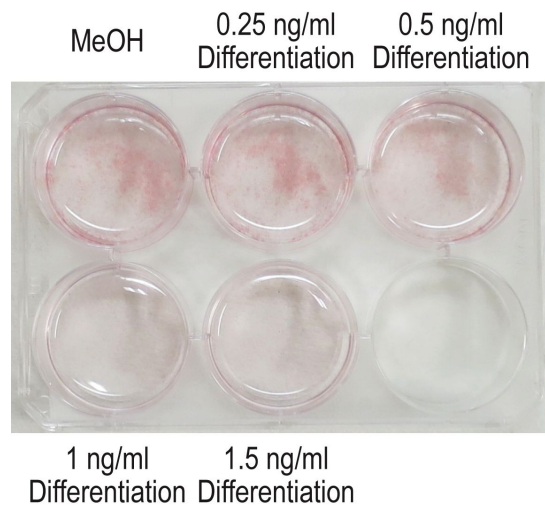


図7 分化段階における SSA 処理による脂肪細胞分化効率の抑制

また、SSA 処理により細胞が死滅しているため、オイルレッド染色では脂肪細胞が観察できないという可能性を排除するため、細胞数の計測や顕微鏡を用いた観察を行った。すると、濃度依存的に細胞数が減少することが明らかとなった。また、細胞は分化後の脂肪細胞様の形状ではなく、分化前の繊維芽細胞用様の形状を示していた。

今までの研究から、SSA 処理により細胞周期

が停止すること、また、分化刺激により、clonal expansion とよばれる細胞周期進行が起こり、この細胞周期の進行が脂肪細胞分化に必須であることから、分化段階で培地中に SSA が存在することにより、clonal expansion が阻害され、その結果脂肪細胞分化が阻害されると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

この研究に関する論文を投稿準備中である。

6．研究組織

(1)研究代表者

甲斐田 大輔 (KAIDA, Daisuke)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：60415122