

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670068

研究課題名(和文)環境化学物質の毒性に関わる選択的スプライシングの解析

研究課題名(英文)Alternative splicing involved in toxicity by environmental chemicals

研究代表者

角 大悟 (SUMI, Daigo)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：30400683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、化学物質や酸化ストレスにより選択的スプライシングが惹起されるのではないかと考え検討を行った。ヒ素メチル基転移酵素(AS3MT)mRNAについて検討したところ、過酸化水素曝露により、新しいAS3MTのスプライスフォームを検出した。その後、スプライシング調節因子SRp40の発現減少の関与が示唆され、また、検出されたAS3MT選択的スプライシングフォームにはヒ素に対するメチル化反応が欠損していることを見出した。網羅的解析により、環境化学物質の亜ヒ酸や農薬のパラコートに曝露された細胞において選択的スプライシングが惹起されることを見出した。現在、詳細について検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether environmental chemicals and oxidative stress trigger the alternative splicing. Firstly, we measured reactive oxygen species trigger the alternative splicing of AS3MT gene. After exposure of HepG2 cells to hydrogen peroxide (H2O2), we detected a novel splice form of AS3MT mRNA, which are exon 3 to 9 skipping (3-9). Although several factors such as serine-arginine rich (SR) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) are found as candidate splice factors that can bind to the exons of AS3MT gene, we detected that the levels of SRp40 protein was decreased on H2O2 exposure through ubiquitin-proteasome pathway. In addition, we detected the deletion of arsenic methyltransferase activity on this splicing form.

We found that alternative splicing is induced in cells exposed to arsenite and paraquat, which is bipyridinium herbicide as environmental chemicals. Currently, we are examining for more information.

研究分野：環境分子毒性学

キーワード：スプライシング 環境化学物質 mRNA

### 1. 研究開始当初の背景

DNA から転写された未成熟な mRNA はスプライシングによりエキソンが集結し成熟した mRNA となるが、すべてのエキソンで構成される場合もあれば、選択的スプライシングにより一部分のエキソンが欠損した mRNA 産物を生み出すことがある。この選択的スプライシングは、mRNA の多様性と関連するが、意図しない選択的スプライシングが行われることで機能的なタンパク質の産生が抑制されることもあり、そのことが重篤な疾患の誘発に関連する場合も少なくない。

一方、当研究室では環境化学物質であるヒ素化合物のメチル化代謝に関わるヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) の性状解析を進めている過程において、AS3MT の選択的スプライシングを見出し、この選択的スプライシングが、AS3MT の活性を欠損させていることを見出した。さらに検討を進めたところ、酸化物質の曝露により AS3MT の新規選択的スプライシングが誘発され、この選択的スプライシングも AS3MT の活性を欠損させている可能性を検出した。このように産生されるタンパク質の機能に障害を与える選択的スプライシングが化学物質の曝露により誘発される場合、その化学物質による毒性発現に強く関与することが示唆された。

そこで、本研究では環境化学物質や酸化物質に対する toxico-transcriptome を展開し、その環境化学物質曝露により惹起される選択的スプライシングを同定し、毒性発現との関連について細胞レベルおよび生体サンプルを用いて明らかにすることを目的とした。申請期間の 2 年の間に、下記 3 点について検討することとした。

1. 培養細胞に環境化学物質を曝露後の総 RNA サンプルを回収し、Transcriptome Array を用い、化学物質曝露による惹起される選択的スプライシングを同定する。
2. 培養細胞に酸化物質を曝露後のスプライシング異常における機構の解明をする。
3. 同定された遺伝子の選択的スプライシングが毒性発現と関係するかについて検討する。

### 2. 研究の目的

本研究では、環境化学物質および酸化物質に対する toxico-transcriptome を展開し、その環境化学物質曝露により惹起される選択的スプライシングを同定し、毒性発現との関連について細胞レベルおよび生体サンプルを用いて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

**細胞**：ヒト肝癌 HepG2 細胞、ヒト表皮角化 HaCaT 細胞、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を使用した。

**総 RNA の採取**：準備した細胞に ISOGEN を加えて、常法に従って総 RNA を採取した。採取した総 RNA の濃度は、NanoDrop を使用して測定した。

**One-Step RT-PCR**：invitrogen 社の One-Step RT-PCR Kit を使用した。実際に、2×Reaction Mix 12.5 μL, sense-primer (10 μM) 0.5 μL, anti-sense primer (10 μM) 0.5 μL, RT/Platinum Taq Mix 0.5 μL, total RNA 500 ng を総量 Nucleotide Free Water で 25 μL にして反応を行った。

使用したプライマーの配列

AS3MT WT-f:

5'-GACGCTGAGATACAGAAGGACGTGC-3'

AS3MT WT-r:

5'-TCCAGCAGCATCAGGGACACATCTG-3'

上記 AS3MT WT プライマーは、エキソン 2 および 11 番目のエキソン内で作製した。

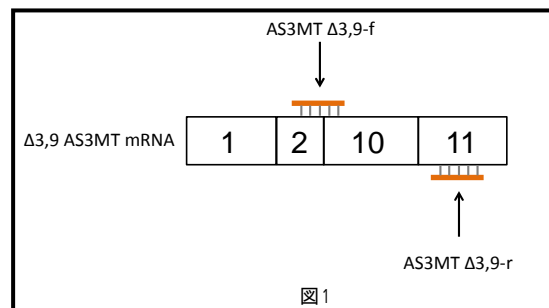
AS3MT 3,9-f:

5'-GACGTGCAGGAAGGTGAAA-3'

AS3MT 3,9-r:

5'-TCCAGCAGCATCAGGGACACA-3'

上記 AS3MT 3,9-f プライマーは、Δ3,9 AS3MT mRNA を特異的に検出するためにエキソンの 2 と 10 番目が結合した部分でプライマーを作製した。AS3MT 3,9-r プライマーは、エキソン 11 番目の部分で作製した(図 1)。



RT-PCR の反応条件は、50 30 分、94 2 分で RT を行い、94 15 秒、55 30 秒、72 30 秒を 40 回繰り返した。

**SRp40 タンパク質発現量**：曝露した細胞を用い、Pierce 社の Nuclear extraction kit を使用して核画分を回収した。BCA 法にてタンパク質濃度を測定度 5 μG 量のタンパク質を SDS-PAGE にて分離し、western blot 法にて SRp40 タンパク質量を測定した。

**メチル化ヒ素化合物の定量**：HPLC-ICP-MS を使用した。細胞を Tris-HNO<sub>3</sub> で回収し、超音波後、70 °C で 30 分処理した。過酸化水素を添加し、Amicon Ultra で濃縮後、HPLC-ICP-MS に供した。HPLC system: Agilent 1260 HPLC BIO inert Instruments, ICP-MS: Agilent ICP-MS 7700x, Column : Siseido MG-ODS (250 mm x 4.6 mm id) Mobile phase : 10 mM Sodium Butansulfonate, 4 mM Tetramethylammonium Hydroxide, 4 mM

Malonic acid pH 3 (adjusted with HNO<sub>3</sub>)  
 化学物質による選択的スプライシングの網羅的検出: total RNA を調整し, Affymetrix 社の GeneChip Human Transcriptome Array2.0 に供し, Transcriptome Analysis Console で解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 過酸化水素曝露による新規 AS3MT スプライシングの検出

過酸化水素曝露後の HepG2 細胞から RNA を回収し, AS3MT WT-f および AS3MT WT-r のプライマーで RT-PCR を行ったところ, WT AS3MT が 1,000 bp に検出されるのに対し, 過酸化水素濃度依存的に 240 bp の mRNA 量が上昇した。この mRNA の塩基配列を決定したところ, Ex3 から Ex9 が欠損した AS3MT mRNA ( $\Delta$ 3-9) であることが明らかとなった (図 2)。

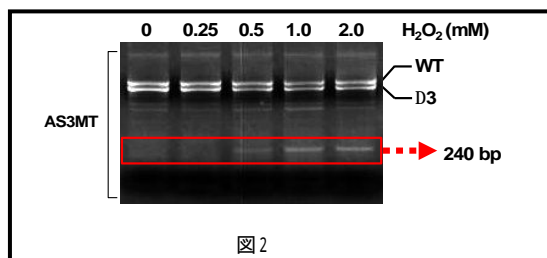


図 2

さらに, この新規スプライスフォームの誘発が過酸化水素曝露に特異的であるか検討するために, 他の酸化ストレス曝露後の  $\Delta$ 3-9 発現を検討したところ, *tert*-ブチルヒドロペルオキシド, クメンヒドロペルオキシドに曝露された HepG2 細胞では  $\Delta$ 3-9 は検出されなかった (図 3)。

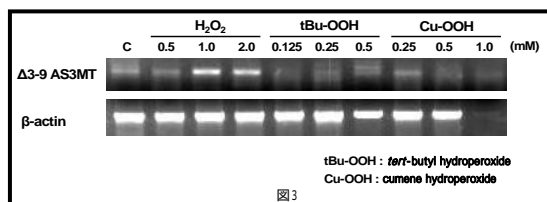


図 3

次に, 過酸化水素による  $\Delta$ 3-9 の産生に関わる因子を同定するために, AS3MT mRNA の Ex2, 3, 9, 10 に注目し, スプライシングに関与するタンパク質群あるいはそれらが結合する配列をデータベースで探索したところ, エキシソンの認識に関わる serine-arginine rich (SR) protein のなかでも SRp40 が AS3MT mRNA の 4 つのエキシソに共通して結合する可能性が高いことが推測された。そこで過酸化水素に曝露された HepG2 細胞から核画分を抽出し, 抗 SR 抗体で Western blot を行ったところ, 過酸化水素曝露により SRp40 タンパク質量が減少した (図 4)。

次に過酸化水素により SRp40 発現量が減少するメカニズムについて検討を進めた。プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いて, SRp40 の分解が抑制されるかについて検討を

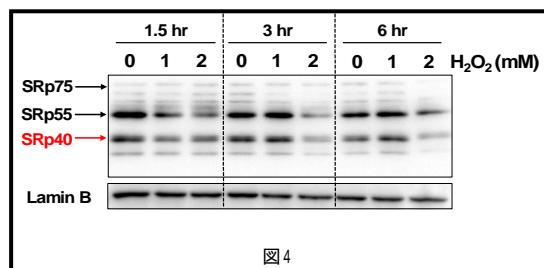


図 4

進めたところ, 1  $\mu$ M の MG132 処理により過酸化水素による SRp40 の発現減少が抑制されていた。この結果から, 過酸化水素による SRp40 の発現減少はユビキチンプロテアソーム系を介した分解であると示唆された (図 5)。

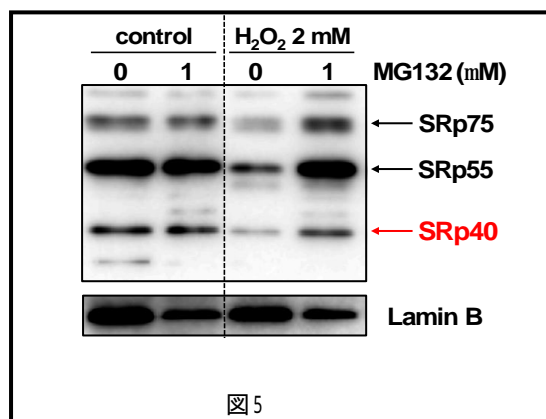


図 5

一方, 当研究室では AS3MT のメチル化酵素活性には, 4 番と 5 番のエキシソンが重要であることが明らかとなっている (BBRC Sumi et al. 2011)。このことから  $\Delta$ 3-9 も AS3MT の酵素活性が無いと推測される。そこで, 過酸化水素による  $\Delta$ 3-9 の産生が細胞レベルでのヒ素メチル化能にどう影響するか検討を進めた。HepG2 細胞を過酸化水素に曝露し選択的スプライシングを惹起させた後, 亜ヒ酸を添加し, HPLC ICP-MS でヒ素の化学形態を測定した。その結果, 過酸化水素濃度曝露によりモノメチル (MMA) 及びジメチル化体 (DMA) の濃度が減少していることから, 過酸化水素曝露により HepG2 細胞のヒ素メチル化能が低下することが明らかとなった (図 6)。

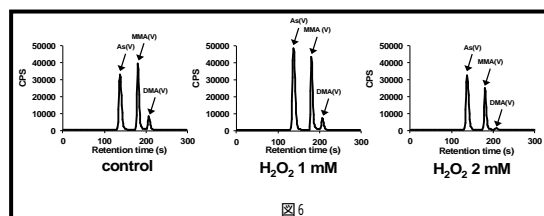


図 6

以上の結果をまとめると, まず, 過酸化水素に曝露された HepG2 細胞において AS3MT の新規選択的スプライスフォーム ( $\Delta$ 3-9) を見出した。この  $\Delta$ 3-9 の産生にユビキチンプロテアソーム系を介した SR タンパク質の発

現減少が関与することが示唆された。また、過酸化水素に曝露された HepG2 細胞においてヒ素メチル化能が低下するというところを見出した。

(2) 化学物質曝露による選択的スプライシングの検出

亜ヒ酸 (1 μM) に 2 週間曝露された HaCaT 細胞あるいはピピリジニウム系除草剤であるパラコート (1 mM) に 24 時間曝露された SH-SY5Y 細胞を準備し、total RNA を回収後、Human Transcriptome Array 2.0 に供した。その結果、多くの遺伝子のスプライシングに異常が認められることが明らかとなった。(亜ヒ酸およびパラコートによりスプライシングが起こり得る可能性として Score 値が 0.4 あるいは 0.7 以上の遺伝子群を表 1 (亜ヒ酸曝露) 表 2 (パラコート曝露) に示す。本表にある Splicing Event Estimate は、起こり得るスプライシングの種類が記載されている。

Gene	Splicing Event Estimate	Score
A	Intron Retention	0.69
B	Cassette Exon	0.55
C	Alternative 3' Acceptor Site	0.52
D	Intron Retention	0.49
E	Alternative 5' Donor Site	0.47
F	Alternative 5' Donor Site	0.46
G	Alternative 3' Acceptor Site	0.46
H	Cassette Exon	0.45
I	Alternative 5' Donor Site	0.44
J	Alternative 3' Acceptor Site	0.44
K	Intron Retention	0.43
L	Alternative 3' Acceptor Site	0.42
M	Alternative 3' Acceptor Site	0.41
N	Cassette Exon	0.41
O	Cassette Exon	0.41
P	Cassette Exon	0.41
Q	Alternative 3' Acceptor Site	0.4

表 1

以上の結果から、化学物質に曝露された細胞ではスプライシング異常が起こりやすくなることが明らかとなった。今後、これらのスプライシングが化学物質による毒性発現に関与するののかについて検討を進めたい。

Gene	Splicing Event Estimate	Score
a	Intron Retention	0.75
b	Intron Retention	0.75
c	Intron Retention	0.75
d	Intron Retention	0.75
e	Intron Retention	0.75
f	Intron Retention	0.75
g	Intron Retention	0.75
h	Intron Retention	0.75
i	Intron Retention	0.75
j	Intron Retention	0.75
k	Intron Retention	0.75
l	Intron Retention	0.75
m	Intron Retention	0.75
n	Intron Retention	0.75
o	Intron Retention	0.75
p	Intron Retention	0.75
q	Intron Retention	0.75
r	Intron Retention	0.74
s	Intron Retention	0.74
t	Intron Retention	0.74
u	Intron Retention	0.73
v	Intron Retention	0.73
w	Intron Retention	0.73
x	Intron Retention	0.73
y	Intron Retention	0.72
z	Intron Retention	0.72
aa	Intron Retention	0.71
bb	Intron Retention	0.71
cc	Intron Retention	0.71
dd	Intron Retention	0.71
ee	Intron Retention	0.7
gg	Intron Retention	0.7

表 2

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 3 件)

1. Sumi D., Suzukawa K., Himeno S. Arsenic trioxide augments all-trans retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells. *Life Sci.* 149:42-50. 2016
2. Sumi D., Asao M., Okada H., Yogi K.,

- Miyataka H., and Himeno S. Synergistic augmentation of ATP-induced interleukin-6 production by arsenite in HaCaT cells. *Arch. Toxicol.* 2016 in press
3. **Sumi, D.**, Tsurumoto M., Yoshino Y., Inoue M., Yokobori, T., Kuwano, H., and Himeno, S. High accumulation of arsenic in the esophagus after exposure to arsenite. *Arch. Toxicol.* 89:1751-1758. 2015
- 〔学会発表〕(計 17 件)
1. **角大悟**, 鈴川和巳, 姫野誠一郎: レチノイン酸による HL-60 細胞の分化誘導作用に対する亜ヒ酸製剤の有用性. 第 21 回ヒ素シンポジウム, 2015 年 11 月, 徳島
  2. **Daigo Sumi**, Masatoshi Ogawa, Ryo Tamura, Yasuko Okamoto, Kazumi Suzukawa, Seiichiro Himeno : Arsenite-induced inhibition of transcription factor Evi-1 that is responsible for myelodysplastic syndromes, 衛生薬学・環境トキシコロジー2015(日韓共同シンポジウム), 2015 年 9 月, 神戸
  3. **角大悟**, 藤代瞳, 浅尾将史, 岡田秀太, 與儀邦子, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ATP による IL-6 産生に対する亜ヒ酸の増強作用の解析. 第 22 回日本免疫毒性学会学術年会, 2015 年 9 月, 京都
  4. **角大悟**, 竹田智瑛里, 姫野誠一郎: ヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. 第 42 回日本毒性学会学術年会, 2015 年 7 月, 金沢
  5. **Daigo Sumi**, Miyu Tsurumoto, Yuri Yoshino, Masahisa Inoue and Seiichiro Himeno : High accumulation of arsenic in the esophagus of mice after exposure to arsenite. ASIATOX2015, 2015 年 6 月, 韓国(濟州島)
  6. **Daigo Sumi**, Chieri Takeda, Daiki Yasuoka and Seiichiro Himeno : Hydrogen peroxide triggers a novel alternative splicing of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene. ASIATOX2015, 2015 年 6 月, 韓国(濟州島)
  7. **Daigo Sumi**, Yuri Yoshino, and Seiichiro Himeno : Arsenite enhances HB-EGF-induced migration of human esophageal Het1A cells. ASIATOX2015, 2015 年 6 月, 韓国(濟州島)
  8. 小川允利, **角大悟**, 田村嶺, 岡本育子, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸による転写因子 Evi-1 活性阻害機序の解析. 第 25 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2015 年 5 月, 長崎
  9. **角大悟**, 竹田智瑛里, 姫野誠一郎: 過酸化水素により惹起されるヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシング. 第 20 回ヒ素シンポジウム, 2014 年 12 月, 千葉
  10. **角大悟**, 小川智子, 原田久美, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の細胞障害性抑制機構の解明. 第 4 回メタロミクス研究フォーラム, 2014 年 11 月, 東京
  11. **角大悟**, 竹田智瑛里, 姫野誠一郎: 過酸化水素はヒ素メチル基転移酵素の選択的スプライシングを惹起する. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月, 茨城
  12. **角大悟**, 小川智子, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸は NK 細胞の細胞障害性を減弱させる. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島
  13. **角大悟**, 原田久美, 姫野誠一郎: IL-2 による NK 細胞活性化に対する亜ヒ酸の影響. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島
  14. **角大悟**, 山近杏奈, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸は Jurkat 細胞の IL-8 産生を亢進させる. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島
  15. **角大悟**, 吉野由里, 横堀武彦, 桑野博行, 姫野誠一郎: 食道由来不死化 Het1A 細胞の HB-EGF 依存性細胞遊走能に対する亜ヒ酸の影響. 第 41 回日本毒性学会年会, 2014 年 7 月, 神戸
  16. **角大悟**, 鶴本未有, 井上正久, 横堀武彦, 桑野博行, 姫野誠一郎: 食道組織への亜ヒ酸の蓄積性の検討. 第 41 回日本毒性学会年会, 2014 年 7 月, 神戸
  17. 竹田智瑛里, **角大悟**, 姫野誠一郎: Hydrogen peroxide triggers a novel alternative splicing of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase gene. 第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2014 年 6 月, 京都
- 〔その他〕
- <http://p.bunri-u.ac.jp/lab10/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 角大悟 (SUMI, Daigo)
- 徳島文理大学・薬学部・准教授
- 研究者番号: 30400683