

平成 21 年 12 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19790218

研究課題名(和文) インスリンレセプターのホルモン応答性分子変換機構の解明

研究課題名(英文) Control of alternative splicing of insulin receptor by glucocorticoid hormone

研究代表者

坂下 英司(自治医科大学・医学部・講師)

研究者番号：00337320

研究成果の概要(和文)：

マウス脂肪前駆細胞の脂肪分化誘導時に、インスリンレセプター(IR)の選択的スプライシングはエキソン除外型(IR-A)からエキソン含有型(IR-B)へ変化する。このとき、IR-A誘導活性を持つ選択的スプライシング調節因子CUGBP1の細胞内局在が核型から細胞質型へ変化する。しかしながら、CUGBP1の細胞内局在変化はIRの選択的スプライシング変化の主要因ではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

When mouse preadipocyte 3T3-L1 cells are differentiated into adipocytes, the alternative splicing (AS) of insulin receptor (IR) is altered from exon-skipped isoform (IR-A) to exon-included type (IR-B). During the differentiation, CUGBP1, as known an alternative splicing regulator, redistributes from nucleus to cytoplasm. Our results suggest that the redistribution of CUGBP1 is not the primary cause of alternation of AS of IR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,100,000	0	1,100,000
平成 20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 21 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：選択的スプライシング、ホルモン

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病創薬を開発する上で、インスリン感受性を持つ臓器におけるインスリンレセプター(IR)の活性に関してその調節機構の分子的理解は重要である。IRの活性は一部で選択的スプライシングによる分子種変換という調節を受ける。すなわち、エクソン 11

の挿入と除外によって、グルコースの取り込みとインスリン結合能の高い挿入型 IR-B と、IGF-II に高い親和性のある除外型 IR-A が作り分けられている<sup>(1,2)</sup>。

近年、筋強直性筋ジストロフィー(DM1)の研究から、骨格筋における IR の選択的スプライシングは、CELF と MBNL と呼ばれる 2 種

類の RNA 結合タンパク質ファミリーによって拮抗的調節を受けていることが指摘されている<sup>(3,4)</sup>。このうち、CELF ファミリーは IR-A 産生に働く。

一方で、インスリン応答性の細胞を副腎皮質ステロイドの一種であるデキサメタゾンで処理すると IR のスプライシング様式が挿入型 IR-B 優性に変化し、糖の取り込みも良くなるとされる<sup>(5)</sup>。ここで、予備的な解析において、デキサメタゾンを必要とするマウス脂肪前駆細胞の脂肪分化誘導時、細胞内では CELF の一種である CUGBP1 が核から細胞質へ移行することを見いだした。この CUGBP1 のトランスロケーションの結果、核内の CUGBP1 濃度が減少し、IR-B 優性となったと予想されるが、その関係性について詳しい解析はされていない。

## 2. 研究の目的

副腎皮質ステロイドの一種であるデキサメタゾンによるインスリンレセプターの分子変換機構について、スプライシング調節因子の細胞内局在変化との相関性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) デキサメタゾン処理と IR 選択的スプライシング解析

ヒト肝ガン細胞株 HepG2 細胞とヒト胎児腎細胞株 HEK は、それぞれ MEM-Earle' s/10% fetal bovine serum (FBS) 中、DMEM /10% FBS 中で維持された。デキサメタゾン(Dex) 刺激は、血清不含液+0.1% BSA 液中で 18 時間培養後、終濃度 0, 0.01, 0.1, 1.0, 5.0  $\mu$ M を含む MEM-Earle' s/0.1% BSA 液中(HepG2) または、DMEM /0.1% BSA 中(HEK)で 24 時間行われた。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 脂肪細胞は、DMEM/10% donor bovine serum 中で維持され、脂肪分化誘導は、DMEM / 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu$ M dex, 5  $\mu$ g/ml insulin (Ins) 中で 2 日、DMEM /10  $\mu$ g/ml Ins 中で 2 日間処理した。その後、DMEM /10% FBS 中で最長 4 日間維持された。成熟脂肪細胞に対するホルモンの効果は、細胞回収 2 日前に、Ins(10  $\mu$ g/ml) または Dex(1  $\mu$ M) を含む培養液中で維持された。マウス(B57BL/6J、6~8 週齢、標準固形飼料・水自由摂食)に Dex(4 mg/kg) を腹腔内投与した。24 時間後に再投与し、合計 3 回 Dex 投与を行った。最終投与から 12 時間絶食後、各臓器を摘出した。トータル RNA を回収し、半定量 RT-PCR または定量 RT-PCR により、IR 選択的スプライシングを検出した。

### (2) CUG-BP1 免疫蛍光染色

培養細胞の Dex 処理前後(上記参照)において、4% paraformaldehyde で 20 分間固定し、0.2% Triton X-100 で 10 分間浸透化した。500 倍希釈抗 CUG-BP1 抗体(Sigma)で 4 $^{\circ}$ C・12 時間処理し、洗浄後、500 倍希釈 Alexa Fluor488

標識抗マウス IgG 抗体で処理した。蛍光像は、In Cell Analyzer (GE Healthcare)または、共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad または、Leica) で撮影し、解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) デキサメタゾンが IR 選択的スプライシングに及ぼす影響

① 培養細胞株(マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1、ヒト肝ガン細胞株 HepG2 細胞、ヒト胎児腎細胞株 HEK)をデキサメタゾンで刺激し、インスリンレセプター(IR)のスプライシングアイソフォーム(IR-A; short form, IR-B; long form)存在比を比較した。

マウス 3T3-L1 細胞では、未分化状態で IR-A が大部分を占めるが、脂肪分化誘導に伴って IR-B の増加が認められた(図 1)。この結果は、マウス個体の脂肪組織で IR-B 存在比が多いことと一致する(図 3)。デキサメタゾン不含分化誘導では、IR-B の産生はほとんど見られず、成熟脂肪細胞のマーカーである脂肪油滴の形成も見られなかった。この結果は、Kosaki<sup>(5)</sup>らの解析結果と一致している。別グループによる解析でも、マウス褐色脂肪細胞<sup>(6)</sup>やラット白色脂肪細胞<sup>(7)</sup>への分化誘導時に、IR-A から IR-B への分子置換が見られる。これらのことは、脂肪分化誘導時に、IR の選択的スプライシングが制御されていることを示している。ここで、デキサメタゾンは、3T3-L1 の分化誘導初期のみに使用されている。分化誘導時にデキサメタゾンを除くと脂肪分化も IR-B の増加も見られない(図 1B, レーン 2 と 4) が、脂肪細胞分化後も IR-B の発現は維持されている。従って、3T3-L1 前駆細胞の脂肪分化誘導時においては、デキサメタゾンはインスリンと共に脂肪分化誘導因子として作用し、IR-B の増加は脂肪分化の結

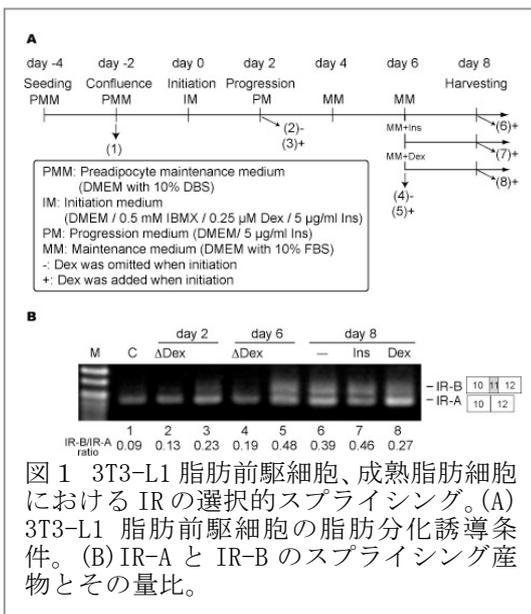
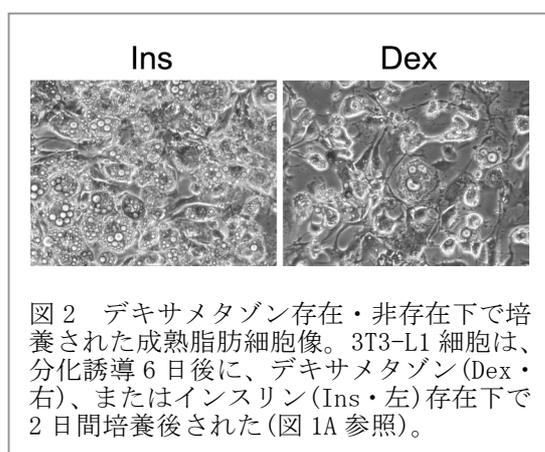


図 1 3T3-L1 脂肪前駆細胞、成熟脂肪細胞における IR の選択的スプライシング。(A) 3T3-L1 脂肪前駆細胞の脂肪分化誘導条件。(B) IR-A と IR-B のスプライシング産物とその量比。

果としてもたらされたと考えられる。

次に、デキサメタゾンが成熟脂肪細胞に及ぼす影響を調べた。興味深いことに、油滴の観察される成熟脂肪細胞分化後に、デキサメタゾン存在下で 48 時間培養すると、油滴縮小(図 2)に加えて、IR-B 産物の減少が観察された(図 1B, レーン 8)。一方、インスリン存在下で培養を続けても、IR-B 産物の減少は見られず、油滴の肥大化が観察された。インスリンもデキサメタゾンも含まない維持培地にて培養を続けると、緩やかな油滴肥大が見られた。これは、維持培地に含有する FBS にインスリンまたは、インスリン様成分が微量混入しているためかもしれない。これらの結果は、成熟脂肪細胞に対するデキサメタゾンの効果は、インスリンによる作用と異なっていることを示している。さらに、IR-B が減少する作用機序は不明であるが、3T3-L1 の分化誘導初期と成熟期ではデキサメタゾンが IR の選択的スプライシングに及ぼす効果が異

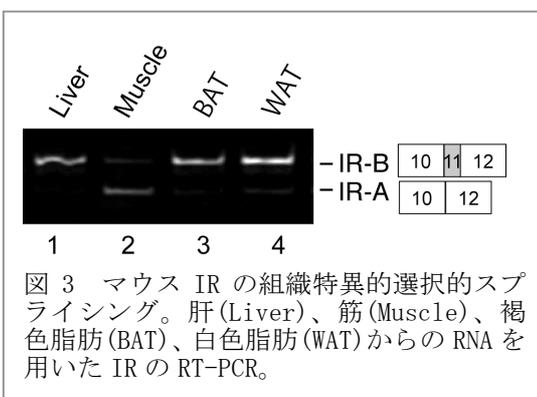


なっていることを示唆している。

② HepG2 細胞では、デキサメタゾン未処理の細胞に比べて、処理後 IR-B が増加した。HEK 細胞においても、デキサメタゾン処理による IR-B 増加が検出された。以上の結果は、デキサメタゾン 刺激によってスプライシング段階で IR-B 存在比を増加させる作用があることを示している。しかしながら、本実験系では、Kosaki<sup>(6)</sup>らの解析結果に比べて、その変化は微増であった。HepG2 細胞においては、培養条件等の再検討が必要であると考えられた。

③ マウス個体の各組織におけるインスリンレセプターのアイズフォーム(IR-A と IR-B)を調べた。コントロール群において、肝臓と脂肪(褐色脂肪、白色脂肪)ではエキソン含有型(IR-B)が主に観察された(図 3)。

筋肉では、IR-A が主に観察された。この結果は、ラット組織における発現様式とほぼ一致している<sup>(7)</sup>。ヒトを含め、IR-A と IR-B の発現は組織特異性があり、肝臓や脂肪のようなインスリンの影響を受ける組織では、IR-B の発現が主であると考えられている<sup>(8)</sup>。しかし、インスリンの標的組織である筋肉においてなぜ IR-B の存在比が低いのかは不明である。一方で、デキサメタゾン投与群において、そのスプライシング様式はコントロール群と比べて変化がみられなかった。このことは、我々のデキサメタゾン短期投与法では、マウス個体の IR 選択的スプライシングに影響を与えない可能性が示された。しかしながら、デキサメタゾン 投与直後や、長期デキサメタゾン投与において選択的スプライシング変化が生じる可能性がある。今後、これらの条件においても検討が必要であると考えられた。



(2) デキサメタゾンが CUGBP1 の細胞内局在に及ぼす影響

① 3T3-L1 脂肪前駆細胞では、CUGBP1 は主に核質局在を示す(図 4A、(-))。デキサメタゾンとインスリンで分化誘導して 2 日後、CUGBP1 の核質から細胞質への局在変化が見られる。また、この時期のいくつかの細胞では、CUGBP1 の排他的な細胞質局在化を示した(図 4A、(Dex/Ins))。しかし、この排他的な細胞質局在は一時的であり、分化維持培地に交換後、CUGBP1 細胞質局在とともに核局在を示す細胞が増加することがわかった。分化誘導時に、インスリン、またはデキサメタゾンのどちらかを分化培地から除くと、弱い核移行を示すが、排他性は失われる(図 4A、(Ins)、(Dex))。また、この CUGBP1 の核から細胞質への移行作用は、デキサメタゾンに比べてインスリンのほうが効果的であった。同様の結果は、別の CELF ファミリー遺伝子である ETR-3 でも得られた。

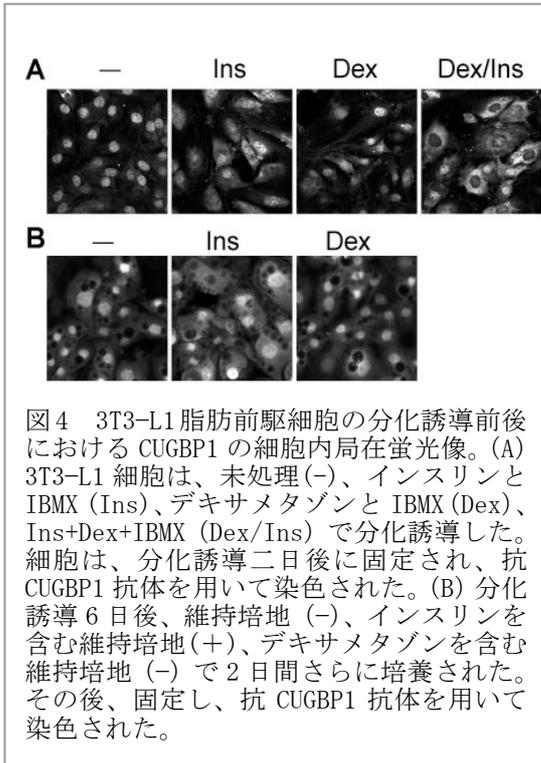


図4 3T3-L1脂肪前駆細胞の分化誘導前後におけるCUGBP1の細胞内局在蛍光像。(A) 3T3-L1細胞は、未処理(-)、インスリンとIBMX(Ins)、デキサメタゾンとIBMX(Dex)、Ins+Dex+IBMX(Dex/Ins)で分化誘導した。細胞は、分化誘導二日後に固定され、抗CUGBP1抗体を用いて染色された。(B) 分化誘導6日後、維持培地(-)、インスリンを含む維持培地(+)、デキサメタゾンを含む維持培地(-)で2日間さらに培養された。その後、固定し、抗CUGBP1抗体を用いて染色された。

成熟脂肪細胞に分化後、インスリンを単独で添加し、さらに培養を継続すると、脂肪油滴の肥大化がみられる。このとき、CUGBP1は細胞質に強い染色が観察される(図4B、(Ins))。一方で、脂肪細胞分化後にデキサメタゾンを単独で添加すると、先述のIR-A微増(図1B)に加え、CUGBP1の細胞質染色減少(図4B、(Dex))、脂肪滴数減少がみられた。次に、CUGBP1の細胞質分布減少を確かめるために、In Cell Analyzerを用いて、脂肪細胞内における細胞質分布と核質分布の統計的解析を行った。その結果、細胞染色像で観察されたように、デキサメタゾン処理細胞では、インスリン処理細胞に比べて細胞質局在を示す細胞数の減少がみられた(図5)。しかしながら、核質/細胞質比の増加は認められなかった。このことは、成熟脂肪細胞においてデキサメタゾンによりCUGBP1が細胞質から核質に移行したのではなく、細胞全体のCUGBP1発現量が減少したためかもしれないと考えられた。デキサメタゾン非存在下で分化誘導を行うと、インスリン作用によりCUGBP1の細胞質局在を示すが、脂肪滴形成やIRのIR-B増加は示さなかった。これらのことは、3T3-L1細胞の脂肪分化時において、CUGBP1の細胞質移行はIR-B増加の直接の原因となっていないことを示す。

② デキサメタゾン未処理のHepG2細胞では、CUGBP1の局在は主に核局在を示した。ここで、デキサメタゾン処理を行っても、CUGBP1の局在性の変化は認められなかった。インスリンレセプターの選択的スプライシングでは

IR-B増加が見られることから、HepG2細胞ではCUGBP1の核外移行とIR-B増加の関連性はみられなかった。

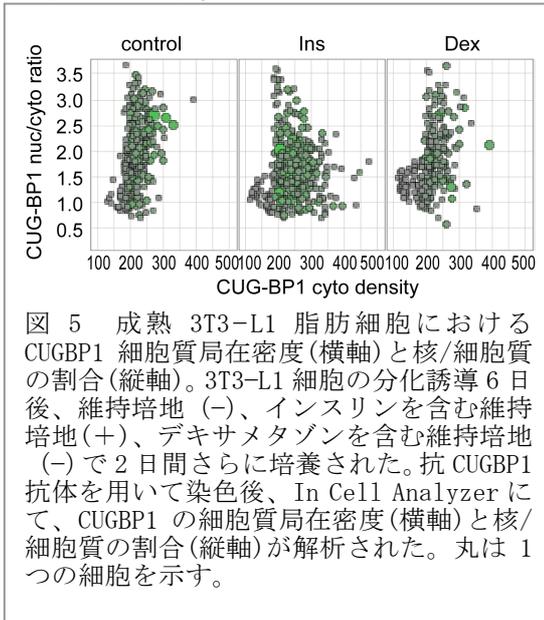


図5 成熟3T3-L1脂肪細胞におけるCUGBP1細胞質局在密度(横軸)と核/細胞質の割合(縦軸)。3T3-L1細胞の分化誘導6日後、維持培地(-)、インスリンを含む維持培地(+)、デキサメタゾンを含む維持培地(-)で2日間さらに培養された。抗CUGBP1抗体を用いて染色後、In Cell Analyzerにて、CUGBP1の細胞質局在密度(横軸)と核/細胞質の割合(縦軸)が解析された。丸は1つの細胞を示す。

### (3) CUGBP1のリン酸化部位と細胞内局在

CUGBP1は、もともと1型筋強直性ジストロフィー患者の心臓においてリン酸化状態が変動するリン酸化蛋白質として見いだされた<sup>(9)</sup>。この論文では、1型強直性ジストロフィー患者組織において、低リン酸化型が核に蓄積するとされている。しかし、その後、1型筋強直性ジストロフィー患者では、protein kinase c (PKC)経路の活性化により高リン酸化型のCUGBP1が核に蓄積しているという結果が得られた<sup>(10)</sup>。我々のin vitro解析において、HeLa細胞核抽出液中でCUGBP1のリン酸化を示唆する結果を得ている。ここで、CUGBP1の核蓄積に重要なリン酸化アミノ酸が存在すると考え、それを脱リン酸化すれば細胞質移行するのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、予測リン酸化アミノ酸をアラニン(Ala)に置換することによって核蓄積への影響を調べた。CUGBP1には予測されるリン酸化部位が複数存在する。変異を導入する部位として、同じCELFファミリーであるETR3にも保存され、かつリン酸化予測スコアの高いSer28、Ser99、Ser116、Thr188を選択しAlaのコードに置換した。また、CUGBP1のRNA結合ドメイン2と3のリンカー領域に存在するSer/Thrに富んだ領域(Thr273-Ser304)の欠変異体も作製した。これらの変異体をGFPのC末に融合蛋白質として発現するコンストラクトを作製しHeLa細胞に導入した。しかしながら、変異型CUGBP1の顕著な細胞質蓄積はみられず、全て野生型と同じ核蓄積を示した。この結果は、変異したアミノ酸の脱

リン酸化単独では、核外移行の主要因にはならないことを示している。最近、CUGBP1 は heat shock のような環境ストレスにตอบสนองして、核から細胞質の stress granules (SGs) に移行し、核と細胞質をシャトルするという結果が報告された<sup>(11)</sup>。このとき、CUGBP1 の 2 番目と 3 番目の RNA 結合ドメインに存在するリンカー領域 (Asp187-Asn398) が、SGs 局在に必要であり、蛋白質-蛋白質間相互作用ドメインとして機能しているとされる。さらに、リンカー領域内の Ser302 のグリシン置換体を筋芽細胞に強制発現させると SGs 様局在になることも報告された<sup>(12)</sup>。Ser302 は cdk4 によりリン酸化される<sup>(13)</sup>。我々の解析では、Ser302 を含むリンカー領域の欠失は核蓄積であった。これは、欠失により SGs 局在に必要な蛋白質相互作用ドメインを消失させてしまったせいかもしれない。また、筋芽細胞では、Akt によりリン酸化される Ser28 のアラニン置換体を強制発現させると、野生型よりも核蓄積の亢進が見られる<sup>(12)</sup>。我々の HeLa 細胞を用いた解析では、野生型も Ser28Ala 置換体も核蓄積となり区別できなかったが、Akt による 28 番目のセリンのリン酸化が核外移行へ鍵となる可能性を示しており、興味深い。我々は 3T3-L1 細胞への変異 CUGBP1 遺伝子導入に成功していないため、我々の作製したアミノ酸変異が 3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導時にみられる CUGBP1 の核外移行に重要かどうかを検証できていない。しかし、3T3-L1 の脂肪前駆細胞と成熟脂肪細胞の両方において、インスリンが CUGBP1 の細胞質移行の誘導と関連していた結果から考えると、インスリン刺激により、Akt が活性化され、核内 CUGBP1 の Ser28 をリン酸化し、細胞質へ移行させたのかもしれない。

#### (4) 紫外線照射によるスプライシング因子の核内再分配

CUGBP1 の培養細胞における局在場所は主に核質である。とくに、がん細胞においては、perinucleolar compartment (PNC) と呼ばれる核内構造に蓄積が見られる<sup>(14)</sup>。また、先述したように CUGBP1 は heat shock のような環境ストレスにตอบสนองして、核から細胞質の SGs に移行し、核と細胞質をシャトルする<sup>(11)</sup>。3T3-L1 細胞の分化誘導時に CUGBP1 の細胞質移行を示すが、SGs に見られる典型的な顆粒状の細胞質局在とは異なり、一様な細胞質局在様式を示す。CUGBP1 の細胞内局在について、他の外因性ストレスの影響を調べる目的で、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 を紫外線 (254 nm, 30 J/m<sup>2</sup>) 照射した。紫外線照射 5 時間後、いくつかの細胞で CUGBP1 の核局在の消失し、SGs 様局在も観察された。このことは、紫外線にตอบสนองして、SGs へ移行することを示している。

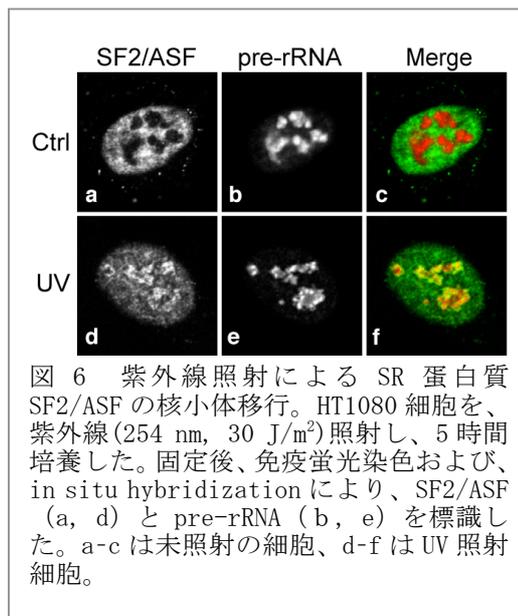


図 6 紫外線照射による SR 蛋白質 SF2/ASF の核小体移行。HT1080 細胞を、紫外線 (254 nm, 30 J/m<sup>2</sup>) 照射し、5 時間培養した。固定後、免疫蛍光染色および in situ hybridization により、SF2/ASF (a, d) と pre-rRNA (b, e) を標識した。a-c は未照射の細胞、d-f は UV 照射細胞。

興味深いことに、紫外線照射では、構成的スプライシングおよび選択的スプライシングに関わる SR 蛋白質ファミリーの一つ SF2/ASF が核スペckルと呼ばれるクロマチン間領域から核小体周辺部へ移行する現象を見つけた。この新規の現象は、他の SR 蛋白質 9G8 や SRp30c にもみられたが、CUGBP1 や hnRNP A1 などのスプライシング因子では観察されなかった。また、heat shock や酸化ストレス、ガンマ線照射では核小体周辺部への凝集は見られなかった。一方、DNA 架橋作用のあるシスプラチンとソラレン処理では、核小体局在を示した。このことは、特異的な DNA 障害によって SR 蛋白質は核小体近傍に移行することを示している。これら DNA 障害によって移行する場所は共通して fibrillar component (FC) と呼ばれる領域で、この部位を DNA damage-induced nucleolar organizing regions-associated patches (d-NAPs) と名付けた。核小体の FC 領域は、ribosomal DNA の転写部位と ribosomal RNA (rRNA) 前駆体を含む領域である。正常の核小体中の FC は、核小体の表層部を構成する granular component (GC) に存在する蛋白質によってとり囲まれ、他の核質領域とは遮断されている。紫外線照射後では、GC と FC の分離、すなわち『核小体分離』が生じ、GC 構成因子の核質移行と FC の核小体表層部移行が観察されることがわかった。このとき、SR 蛋白質は pre-rRNA 近傍に凝集していた。さらに、この核小体分離には RNA ポリメラーゼ II 活性の減弱が必要であった。これらのことから、紫外線照射後、RNA ポリメラーゼ II の転写が抑制され、核小体分離を生じ、露出した pre-rRNA を標的として SR 蛋白質が凝集するという核内再分配モデルが考えられた。紫外線照射はいくつかのアポトーシス関連遺伝

子の選択的スプライシングを変更することが知られている。実際、SR蛋白質のd-NAP移行時期に一致して、Bcl-xやPIG3のようなアポトーシス関連遺伝子の選択的スプライシング変換が生じていた。現在のところ、SR蛋白質のd-NAP局在が直接これらアポトーシス関連遺伝子の選択的スプライシング変換を引き起こす原因となっているかは不明である。我々の発見は、紫外線応答により多くのスプライシング因子の細胞内局在が変化していることを示しており、これらが紫外線照射後の細胞における遺伝子発現調節に関与する可能性を表すものである。

(5) 終わりに

① マウス 3T3-L1 細胞とヒト Hep2G 細胞において、選択的スプライシングによるインスリンレセプターのアイソフォーム変換は必ずしも CUGBP1 の核外移行と関連しているものではなかった。3T3-L1 細胞で、エキソン含有 IR-B 型の増加が見られるのは、細胞周期を止める分化誘導処理を行ったときであった。がん細胞や胎児の組織では、IR-B に比べて IR-A が主要な産物である<sup>(2)</sup>。それゆえ、IR-B 産物増加は、細胞周期の停止と関連があるかもしれない。インスリンレセプターの挿入には、MBNL1、SRp20 や SF2/ASF などの SR 蛋白質などのスプライシング因子の関与が報告されている<sup>(4,15)</sup>。一方で、exon 除外には、CELF ファミリーの CUGBP1 や hnRNP H が関与しているとされる<sup>(16)</sup>。これらの正と負の調節因子の核内濃度バランスにより、インスリンレセプター mRNA 前駆体の選択的スプライシングは決定されると考えられている。しかしながら、3T3-L1 細胞の分化誘導時や Hep2G デキサメタゾン処理時にどの調節因子が直接の原因となっているかは明らかにされていない。少なくとも本研究において、CUGBP1 の局在変化のみでインスリンレセプターの選択的スプライシングを説明することは不十分であることが判明した。今後、正の調節因子の発現解析などを含めた統合的な解析が必要であると考えている。

② マウス 3T3-L1 細胞の分化誘導時に、CUGBP1 の核から細胞質への移行が観察された。この現象は、デキサメタゾンよりもインスリンシグナルの制御下にある可能性が示唆された。CUGBP1 は、細胞質では、C/EBPbeta や p21、MRG15 の翻訳調節や、GU-rich 配列を持つ mRNA 分解の調節に関与するとされる<sup>(12,17,18)</sup>。C/EBPbeta は、脂肪細胞への分化に必須な因子である。CUGBP1 の C/EBPbeta への結合は、野生型の開始コドン下流の同一読み枠に存在する開始コドンからの翻訳を促進する。この翻訳される短い蛋白質は LIP と呼ばれ、脂肪分化に対し抑制的に作用する。ま

た、加齢と LIP 増加との関わりも指摘されている<sup>(13,19)</sup>。しかしながら、脂肪分化誘導時、内在性 CUGBP1 の細胞質機能について詳しいところは明らかでない。環境ストレスにより CUGBP1 は細胞質の stress granules (SGs) に局在するが、3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導では、SGs 局在というよりも細胞質全体に存在する。それゆえ、CUGBP1 の環境ストレスによる機能と脂肪分化誘導による機能は、区別して考える必要があるかもしれない。

③ SGs 形成要因の一つである紫外線照射によっても CUGBP1 の SGs 移行が観察される。ここで、紫外線照射は SR 蛋白質の選択的な核内再分配を引き起こすことを見いだした。再分配先は露出した核小体の pre-rRNA 近傍であった。この再分配が生じる時期に、アポトーシス関連因子の選択的スプライシングの変更が見られた。この結果から、紫外線照射下におけるスプライシング因子の再分配と選択的スプライシング変換の関連性が示唆された。

(6) 引用文献

- ① Denley A *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 2004. **18**:2502-2512.
- ② Frasca F *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1999. **19**:3278-3288.
- ③ Suvkur RS *et al.*, *Nat. Genet.* 2001. **29**:40-47.
- ④ Ho TH *et al.*, *EMBO J.* 2004. **23**:3103-3112.
- ⑤ Kosaki A & Webster NJ, *J. Biol. Chem.* 1993. **268**:21990-21996.
- ⑥ Entingh AJ *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2003. **278**:33377-33383.
- ⑦ Serrano N *et al.*, *J. Mol. Endocrinol.* 2005. **34**:153-161.
- ⑧ Frasca F *et al.*, *Arch. Phys. Biochem.* 2008. **114**:23-37.
- ⑨ Roberts R *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. **94**:13221-13226.
- ⑩ Kuyumcu-Martinez NM *et al.*, *Mol. Cell.* 2007. **28**:68-78.
- ⑪ Fujimura K *et al.*, *Exp. Cell Res.* 2008. **314**:543-553.
- ⑫ Huichalaf C *et al.*, *FASEB J.* 2010. **24**:3706-3719.
- ⑬ Timchenko LT *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2006. **281**:32806-32819.
- ⑭ Huang S *et al.*, *J. Cell Biol.* 1998. **143**:35-47.
- ⑮ Sen S *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2009. **29**:871-880.
- ⑯ Paul S *et al.*, *EMBO J.* 2006. **25**:4271-4283.

- ⑰ Timchenko NA *et al.*, Nucleic Acids Res. 1999. **27**:4517-4525.
- ⑱ Vlasova IA *et al.*, Mol. Cell. 2008. **29**:263-270.
- ⑲ Karagiannides I *et al.*, J. Biol. Chem. 2006. **281**:23025-23033.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sakashita E and Endo H. SR and SR-related proteins redistribute to segregated fibrillar components of nucleoli in a response to DNA damage. *Nucleus*, 査読有 Vol.1, No.4 (2010) p367-380.

〔学会発表〕(計2件)

(1) Eiji Sakashita, UVC irradiation induces selective redistribution of splicing factors around segregated fibrillar components of nucleoli、EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics、平成21年9月30日-10月4日、リルシュラソルグ・仏国

(2) 坂下英司、紫外線照射によるスプライシング因子 SF2/ASF の核スペックル離脱機構の解析 第10回 RNA ミーティング 平成20年7月24日、北海道・札幌

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

坂下 英司 (自治医大・医学部・講師)

研究者番号：00337320