

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08773

研究課題名(和文) 表皮角化細胞の増殖分化を制御する核タンパク質Ahedの分子機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular function of Ahed, a nuclear protein that controls proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes.

研究代表者

高石 樹朗 (Takaishi, Mikiro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：10303223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではAhedの分子機能を明らかにするために、免疫沈降法と質量分析によりAhedと相互作用するタンパク質を単離した。結果として、スプライソソームタンパク質を含む複数の核タンパク質が単離された。In vitroタンパク質合成と免疫沈降法によりスプライソソームタンパク質がAhedと直接相互作用することが確認された。AhedがRNAスプライシングに関わることは、完全長cDNA-seqにより検討された。Ahed欠損角化細胞では、特有のスプライシングアイソフォームが見出された。本研究結果は、新規のスプライシング制御因子であるAhedは細胞の生存・増殖に欠くことのできない役割を担っていることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりAhedは新規のRNAスプライシング制御因子であることが明らかになった。Ahedは多様な臓器で発現していることが明らかになっているので、表皮、造血細胞のみならず様々な細胞系譜で重要な役割を担っていることが示唆される。近年がんをはじめとする様々な疾患にスプライシング関連因子の遺伝子変異が見つかる。データベースによれば、いくつかのがんでAhedの遺伝子変異が見つかる。更なる研究により、がんにおけるAhedの関わりが明らかとなれば社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify molecular function of the gene, interacting proteins with Ahed were identified with co-immunoprecipitation and mass-spectrometry. As the result, some nuclear proteins including spliceosomal proteins were identified. In vitro protein synthesis and immunoprecipitation confirmed that some spliceosomal proteins were directly interacted with Ahed. Involvement of Ahed in RNA splicing was investigated with full-length cDNA-seq and found unique splicing isoforms were produced in the Ahed KO keratinocytes. Our findings indicate a novel spliceosomal protein Ahed has indispensable roles in cell proliferation of epidermal cells as well as hematopoietic cells by regulating RNA splicing.

研究分野：皮膚科学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：皮膚 表皮 角化細胞 RNAスプライシング スプライソソーム

1. 研究開始当初の背景

Ahed (Attenuated hematopoietic development)は、血球の増殖・分化に異常を来すマウス胎児性幹細胞(ES 細胞)から、その原因遺伝子として元大阪大学医学系研究科竹田潤二教授らのグループにより同定された。我々は表皮における Ahed の役割を明らかにする目的で、表皮特異的 Ahed 欠損(Eck0、K5.CreAhed^{flox/flox})マウスを作製した。Eck0 マウス新生仔は外観上明らかな異常は認められなかったが、生後 2 日目では成長の遅滞と皮膚の乾燥化、菲薄化が生じ、全ての Eck0 マウスは生後 4 日目までに死亡した。生後 2 日目の皮膚組織では、コンパクトな hyperkeratosis、顆粒層の消失、角化細胞の膨化を伴った表皮肥厚、毛包の伸長障害、炎症性細胞浸潤などの異常所見が Eck0 マウスに観察された。顆粒層の消失に一致して、filaggrin、loricrin が減少していた。Eck0 マウスは出生後 4 日以内で死亡し、各種の解析に困難を生じたために、K5.CreERT2 マウスと Ahed flox マウスを交配して、タモキシフェン誘導性の Eck0 マウス(AhedIndEck0, K5CreERT2_Ahed^{flox/flox})を作出した。成長したマウスの背部皮膚に 1 mg/ml の 4-OH tamoxifen (4OHT)を隔日で 3 回塗布すると、表皮の萎縮が観察された。TUNEL 染色にて表皮細胞の細胞死を確認した。以上、表皮細胞においても Ahed がその増殖に深く関わっていることが示唆された。しかしながら、Ahed の分子機能は不明であり、その欠損がどのようにして、このような重篤な皮膚障害を生じさせるのか説明が出来なかった。

2. 研究の目的

本研究は Ahed の分子機能の解明を目的とする。Ahed の分子機能は不明であるが、機能未知タンパク質に対する網羅的な研究(<http://bioplex.hms.harvard.edu/index.php>)から、Ahed は様々な核タンパク質と相互作用することが示唆されていた。それには複数のスプライソソーム構成タンパク質が含まれる。Ahed がスプライソソームの構成要素であるのかは、我々自身であらためて確認する必要がある。Ahed が RNA スプライシングに関わる分子であるのか、もしそうだとすると、どのような遺伝子のスプライシングに関わるのか明らかにする必要がある。

3. 研究の方法

(1). Ahed 結合タンパク質の同定

緑色蛍光タンパク質(GFP)-Ahed 融合タンパク質安定発現 HeLa 細胞および GFP 安定発現 HeLa 細胞を樹立した。それぞれの細胞から核抽出液を調製し、磁性体ビーズを結合した抗 GFP 抗体で免疫沈降を行った。各試料は SDS-PAGE にて展開し、CBB 染色を行なった。GFP-Ahed 発現 HeLa 細胞由来試料に特異的なバンドを切り出した。切り出したゲルを酵素処理した後に、質量分析装置を用いてタンパク質を同定した。同定されたタンパク質を確認するために、再度核抽出液を免疫沈降してウエスタン法を行なった。Ahed と相互作用が確認されたタンパク質については、相互作用が直接であるのか in vitro でタンパク質を合成して検討した。ウサギ網状赤血球の細胞抽出液内で、Ahed は FLAG-tag 融合タンパク質として、相手タンパク質は V5-tag 融合タンパク質として合成した。抗 FLAG 抗体あるいは抗 V5 抗体で免疫沈降を行い、ウエスタン法により共沈殿の有無を確認した。

(2). Ahed 欠損による RNA スプライシングの変化

タモキシフェン誘導性表皮特異的 AhedKO マウス (AhedIndEck0) から表皮角化細胞を調製し

て、In vitro にて 40HT を作用させ AhedKO 角化細胞とした。この細胞から RNA を抽出して full length cDNA-seq の試料とした。full length cDNA-seq の実施およびデータ解析は創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム・バイオロジカルシーズ探索ユニットの支援を受けた。AhedKO による RNA スプライシングの変化は PCR にて確認した。

4 . 研究成果

(1). Ahed 結合タンパク質の同定

GFP-Ahed 融合タンパク質発現 HeLa 細胞および GFP 発現 HeLa 細胞から核抽出液を調製し、抗 GFP 抗体にて免疫沈降を行なったところ、複数の沈降物が確認された。GFP-Ahed 発現細胞試料に特異的に見られたバンドを質量分析したところ、スプライソソーム構成タンパク質を含む多数の核タンパク質が結合候補タンパク質として同定された。これら候補タンパク質についてウエスタン法による確認を行ったところ、PRPF8、SF3B1 が Ahed と特異的に結合することが示された。また、スプライシング関連タンパク質である PRPF22、RBM39 も Ahed と特異的に結合することが示された。さらに、RBM39 に対する抗体を用いて免疫沈降を行なったところ PRPF8、SF3B1 と共に Ahed が共沈殿することが示された。スプライソソームは多数のタンパク質からなる巨大なタンパク質複合体であるため、Ahed がスプライソソームを構成するどのタンパク質と直接相互作用するのか検討を行った。In vitro でタンパク質を合成し免疫沈降を行い、さらにウエスタン法での解析を行なった。結果として、SF3B1、PRPF8、PRPF22 との結合が示された。スプライソソーム上で PRPF8、PRPF22 と空間的に近い場所に配置される他のタンパク質についても同様の方法で検討したところ SLU7、BRR2 にも Ahed が結合することが示された。SF3B1 を除けば、これらのタンパク質は C* complex あるいは P complex とよばれるスプライソソームで一堂に会することになる。従って、スプライシングのこのステップにおいて、Ahed もその役割を果たすと予想された。

(2). Ahed 欠損による RNA スプライシングの変化

In vitro で Ahed を欠損した角化細胞から全 RNA を抽出して full length cDNA -seq の試料とした。対照試料として、EtOH を作用させた細胞由来の RNA を用いた。予測転写物として対照で 42,813、AhedKO で 64,883 が得られた。ここから単一エクソンからなる遺伝子を除き、それぞれの試料に特異なスプライシングアイソフォーム抽出すると、対照で 5,922、AhedKO で 21,534 であった。このうち CD44、Cdk2 などは、AhedKO 細胞でアイソフォームの構成が異なることが PCR 法により示された。

以上の結果より、Ahed は新規のスプライソソーム構成タンパク質であり、Ahed の分子機能は少なくとも一部の RNA に対するスプライシング制御であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1 . 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2 . 発表標題 Ahed is a novel component of spliceosome and is required for cell proliferation of epidermal keratinocytes.
3 . 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2 . 発表標題 Ahed, an uncharacterized nuclear protein, is required for epidermal cell growth and differentiation
3 . 学会等名 JAPAN-SINGAPORE INTERNATIONAL SKIN CONFERENCE 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2 . 発表標題 Ahed plays crucial roles in growth and differentiation of epidermal keratinocytes
3 . 学会等名 The 49th ESDR Annual Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2 . 発表標題 Ahed is involved in proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes
3 . 学会等名 The 44th Annual Meeting of the JSID (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 高石 樹朗、石元 達士、徳永 正浩、國府 力、竹田 潤二、佐野 栄紀
2. 発表標題 表皮角化細胞の増殖におけるAhedの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2. 発表標題 Ahed, a novel spliceosomal protein, is essential for the development and maintenance of the epidermis through regulation of mRNA splicing.
3. 学会等名 The 50th ESDR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mikiro Takaishi, Tatsushi Ishimoto, Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Junji Takeda, and Shigetoshi Sano
2. 発表標題 Ahed has crucial roles as a spliceosomal protein for cell proliferation of epidermal keratinocytes
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高石 樹朗、石元 達士、徳永 正浩、國府 力、竹田 潤二、佐野 栄紀
2. 発表標題 新規スプライソソムタンパク質Ahedは表皮の発生とその維持に重要な働きを担う
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	佐野 栄紀 (Sano Shigetoshi) (80273621)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------