

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790649

研究課題名（和文） ストレス応答性 tra2 ベータ mRNA アイソフォームの機能解析

研究課題名（英文） The role of Tra2 β mRNA variants in cellular proliferation and apoptosis

研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO YUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00563454

研究成果の概要（和文）：

選択的スプライシング調節因子をコードする Tra2 β 遺伝子のプロモーター解析により、Ets1 と HSF1 がそれぞれ基本転写およびストレス誘導性の転写に必須であることを見出した。TRA2 β の発現は大腸癌において顕著に増加していることを見出した。また、Tra2 β は Bcl-2 や PTMA 等の細胞死関連遺伝子に特異的に結合し、大腸癌細胞株において Tra2 β 1 mRNA をノックダウンするとアポトーシスが誘導された。一方、TRA2 β 4 バリエントは、細胞増殖及び細胞老化の制御に関与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In response to oxidative stress, colon cancer cells (HCT116) increased levels of *TRA2 β 1* mRNA without changing its mRNA stability. *TRA2 β* promoters and Chip assay demonstrated that an Ets1-binding site was crucial for basal transcription, while three heat shock elements mediated the oxidant-induced transactivation of *TRA2 β* . Tra2 β knockdown caused apoptosis of HCT116 cells. Tra2 β were preferentially expressed in proliferative compartment of normal human colonic glands and adenocarcinomas, where Ets1 and HSF1 were also highly expressed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：選択的スプライシング、大腸がん、Transformer 2 β 、SR タンパク質

1. 研究開始当初の背景

選択的スプライシングは様々なストレス（酸化ストレス・低栄養・熱ストレス等）に応答して組織・細胞特異的に遺伝子発現を調節し、細胞のフェノタイプを変化させる。ヒ

ト全遺伝子の約 95%以上が選択的スプライシングにより調節されており、選択的スプライシング異常と発がんや神経疾患の関連性が注目されている。選択的スプライシング調節因子 Transformer 2-beta（以下 Tra2 β ）は

SR (セリン/アルギニン:SR) 様タンパク質 (SRSF) ファミリーの一つで、濃度依存的に標的遺伝子のスプライス部位を認識し、選択的スプライシングのエンハンサーとして働く。Tra2 β 遺伝子自身も選択的スプライシングを受け、5種類のmRNA アイソフォームが生成される (Tra2 β 1-5)。ヒト胃癌細胞 AGS 細胞およびラット胃粘膜細胞にストレスを付加すると Tra2 β 4 mRNA isoform が選択的に誘導されることを報告した (*Am J Physiol Cell Physiol.* 2009)。しかしながら、Tra2 β 4 は premature termination codon (PTC) をコードする exon 2 を含む PTC バリエーションであり、native Tra2 β タンパク質は翻訳されない。Tra2 β 4 isoform に特異的な exon 2 配列を標的とした siRNA を用いて、Tra2 β 4 をノックダウンした AGS 細胞では、3,000 以上の遺伝子発現が変化し、G1/S 期での細胞周期の停止、tubulin の増加と細胞の巨大化が認められた。本来、PTC バリエーションである Tra2 β 4 は nonsense-mediated RNA decay (NMD) システムにより分解されるはずであるが、胃癌細胞や大腸癌細胞に恒常的に発現していることを見出した。

これらの研究成果をもとに、本研究では、消化器領域において、「選択的スプライシング異常と疾患」の関連を解明することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、選択的スプライシング因子 Tra2 β の機能解析を行い、

(1) 消化管細胞において酸化ストレスにより発現が誘導される、Tra2 β の新たな細胞内機能を同定する

(2) PTC (中途終止コドン) をコードするが、NMD により分解されない Tra2 β 4 バリエーションの生理学的役割と発がんとの関連を解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Tra2 β 遺伝子のプロモーター解析

Tra2 β 遺伝子の 5' flank の 1 kb 上流領域を pGL-3 basic (Promega社) ルシフェラーゼベクターにサブクローニングし、プロモーター解析を行い、酸化ストレスに応答し活性化されるプロモーター領域を同定する。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いてトランス調節因子を決定する。

(2) 全転写産物量の変化の網羅的な解析

Tra2 β RNA のノックダウン細胞株を樹立し、Agilent 社製 whole human genome array システムを用いて、mRNA 発現レベルで調節を受け

る標的遺伝子を同定する。

また、選択的スプライシング値の評価としては Affimetrix 社の exon gene chip array システムを用い、SR スプライシング因子の一つである Tra2 β の選択的スプライシングの標的遺伝子のスクリーニングを行う。得られたデータは Gene spring GX11 および Ingenuity Pathway Analysis (IPA) ソフトウェアを用い統計学的かつ生理的・機能的な意味づけを行う。

(3) Tra2 β に直接的に結合する遺伝子の同定

方法2で解析したマイクロアレイチップの結果をもとに、*in vivo* において Tra2 β が影響を与えるターゲット遺伝子の絞り込みを行う。Tra2 β は RNA 結合部位を持ち、標的遺伝子と結合することで、相互作用を持つため、リボヌクレオタンパク (RNP) 免疫沈降実験を行う。サンプルより細胞質を抽出し、Tra2 β タンパク質と相互作用を持つ遺伝子をタンパク-RNA 免疫沈降させ、マイクロアレイおよび半定量的 RCR 法により標的 RNA を同定する。

(4) Tra2 β の機能解析 (アポトーシスの関与)

Tra2 β RNA のノックダウン細胞および過剰発現系を用い、Tra2 β の機能解析を行う。先行実験により細胞増殖および細胞死に関連する可能性が示唆された。そこで、さらに β -ガラクトシダーゼ染色、Caspase 経路の活性化の検討、TUNEL 染色、MTT assay 等の詳細な実験を行い、Tra2 β の生理的意義を明らかにする。

(5) Tra2 β バリエーションの免疫組織学染色

ヒト消化管がん細胞での Tra2 β 1 および Tra2 β 4 mRNA の発現をノーザンブロット法により認めた。今後はさらに、ヒト大腸がん組織を用いて、胃癌の悪性度と Tra2 β 4 mRNA 発現量及び細胞内局在との関連を *in situ* ハイブリダイゼーション法により明らかにする。また、特異的な抗体を用いた免疫組織学染色 Tra2 β の大腸組織での局在と癌部での高発現を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Tra2 β 遺伝子のプロモーター領域の特定

Tra2 β 遺伝子のプロモーター解析及びクロマチン免疫沈降により、Tra2 β はオンコプロテインである Ets1 が -64 から -55 bp 5' 上流の領域に結合することで、基本転写調節を受けることを明らかにした。また、酸化ストレスは Tra2 β の RNA 安定性には関与せず、主に転写調節により Tra2 β 遺伝子を活性化する可能性を見出した。アルセナイト刺激に

より、転写因子 HSF1 がリン酸化され、Tra2 β 遺伝子の 5' 上流-145 から -99 bp の heat shock element(HSE)に結合しプロモーターを活性化することを明らかにした(図1)。また、HSF1 をノックダウンした細胞株において酸化ストレスによる Tra2 β の誘導が顕著に阻害された。(現在論文リバイス中)

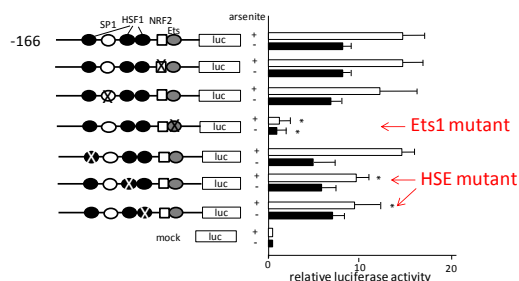


図1. Tra2 β プロモーター解析

(2) Tra2 β の標的 RNA の同定

RNA 免疫沈降法を用いて、Tra2 β に結合する RNA をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、Tra2 β と特異的に結合する約 500 種類の RNA を見出した。パスウェイ解析により、特に細胞死関連遺伝子が有意であった。

(3) Tra2 β の細胞内機能の発見

大腸癌細胞株 HCT116 を用いて、Tra2 β 1 および Tra2 β 4 のノックダウン細胞系を樹立した。解析の結果、Tra2 β 1 のノックダウン細胞においては caspase および bcl-2 依存性のアポトーシスが顕著に誘導され、Tra2 β は抗アポトーシス因子の一つである可能性が示唆された。さらに、TRA2 β 4 バリエントをノックダウンした細胞では、Tra2 β 1 と異なり、アポトーシスシグナルには影響を与えず、細胞増殖の低下や細胞の肥大化など細胞老化様のフェノタイプが出現した。(論文投稿中)

(4) Tra2 β の大腸における発現

ヒト大腸上皮細胞及び大腸がん組織の免疫化学染色により、Tra2 β は大腸上皮細胞及び大腸がん組織に高発現することを見出した(図2)。さらに、Tra2 β は HSF1 と Ets1 と共局在することを明らかにした。

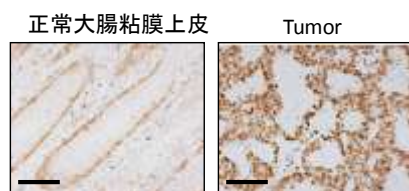


図2. 大腸におけるTra2 β の発現

以上のことから、Tra2 β 遺伝子の発現調節機構及び Tra2 β の新しい細胞内機能を見出し、

Tra2 β 4 mRNA バリエントが大腸がん細胞株において機能性 RNA 分子として作用する可能性があると重要な知見を得ることが出来た。

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 9 件)

- 1) Katsuura S, Kuwano Y, Yamagishi N, Kurokawa K, Kajita K, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. MicroRNAs miR-144/144* and miR-16 in peripheral blood are potential biomarkers for naturalistic stress in healthy Japanese medical students. *Neurosci Lett.* 516(1): 79-84, 2012, DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.062, 査読有
- 2) Masuda K, Kuwano Y, Nishida K, Rokutan K. General RBP expression in human tissues as a function of age. *Ageing Res Rev.* 2012 (in press) doi:10.1016/j.arr.2012.01.005, 査読有
- 3) Kurokawa K, Tanahashi T, Iima T, Yamamoto Y, Akaike Y, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Murakami Y, Fukushima M, Rokutan K. Role of miR-19b and its target mRNAs in 5-fluorouracil resistance in colon cancer cells. *J Gastroenterol.* 2012 (in press), DOI: 10.1007/s00535-012-0547-6, 査読有
- 4) Kuwano Y, Kamio Y, Kawai T, Katsuura S, Inada N, Takaki A, Rokutan K. Autism-associated gene expression in peripheral leucocytes commonly observed between subjects with autism and healthy women having autistic children. *PLoS One.* 6(9):e24723. 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0024723. t001, 査読有
- 5) Akaike Y, Kurokawa K, Kajita K, Kuwano Y, Masuda K, Nishida K, Kang SW, Tanahashi T, Rokutan K. Skipping of an alternative intron in the *srsf1* 3' untranslated region increases transcript stability. *J. Med. Invest.* 58(3-4):, 180-187, 2011, DOI: 10.2152/jmi.58.180, 査読有
- 6) Kurokawa K, Tanahashi T, Murata A, Akaike Y, Katsuura S, Nishida K, Masuda K, Kuwano Y, Kawai T, Rokutan K. Effects of chronic academic stress on mental state and expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in healthy Japanese medical students. *Stress,* 14(4):431-438, 2011, DOI: 10.3109/10253890.2011.555930, 査読有
- 7) Katsuura S, Kamezaki Y, Yamagishi N,

Kuwano Y, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Kawai T, Arisawa K, Rokutan K. Circulating vascular endothelial growth factor is independently and negatively associated with trait anxiety and depressive mood in healthy Japanese university students. *Int J Psychophysiol.* 81(1):38-43, 2011, DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2011.04.004, 査読有

8) Yamamoto Y, Tanahashi T, Katsuura S, Kurokawa K, Nishida K, Kuwano Y, Kawai T, Teshima-Kondo S, Chikahisa S, Tsuruo Y, Sei H, Rokutan K. Interleukin-18 deficiency reduces neuropeptide gene expressions in the mouse amygdala related with behavioral change. *J Neuroimmunol.* 15;229(1-2):129-39. 2010, DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.07.024, 査読有

9) Kurokawa K, Kuwano Y, Tominaga K, Kawai T, Katsuura S, Yamagishi N, Satake Y, Kajita K, Tanahashi T, Rokutan K. Brief naturalistic stress induces an alternative splice variant of SMG-1 lacking exon 63 in peripheral leukocytes. *Neurosci Lett.*;484(2):128-32. 2010, DOI: 10.1016/j.neulet.2010.08.031, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 梶田敬介、桑野由紀、山岸直子、黒川憲、佐竹讓、赤池瑤子、本田真奈美、増田清士、棚橋俊仁、六反一仁. ストレス応答性 **Tra2 β 4** PTC バリエーションによる **p21** の転写調節を介した細胞老化の制御, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- 2) 赤池瑤子、増田清士、山岸直子、黒川憲、佐竹讓、梶田敬介、本田真奈美、西田憲生、桑野由紀、棚橋俊仁、六反一仁. Hu antigen R (HuR) Functions as An Alternative Pre-mRNA Splicing Regulator of Transformer 2-beta (Tra2beta) under Oxidative Stress (酸化ストレス下での、HuR による transformer 2-beta (Tra2 β) の選択的スプライシング制御機構), 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- 3) 桑野由紀、神尾陽子、河合智子、勝浦桜子、稲田尚子、高木晶子、六反一仁. Autism-associated gene expression signatures in peripheral blood leukocytes, Joint Academic Conference on ASD 2011、2011 年 12 月 2 日、日本財団ビル (東京)
- 4) 桑野由紀, 遺伝子発現からみたストレス脆弱性, シンポジウム講演 第 27 回日本ストレス学会学術総会、2011 年 11 月 20 日、東京国際交流館 (東京)
- 5) 本田真奈美、桑野由紀、山岸直子、黒川

- 憲、佐竹讓、梶田敬介、赤池瑤子、西田憲生、増田清士、棚橋俊仁、六反一仁. 精神的ストレスに応答するヒト末梢血マイクロ RNA の発現, 第 27 回日本ストレス学会学術総会、2011 年 11 月 20 日、東京国際交流館 (東京)
- 6) 梶田敬介、桑野由紀、山岸直子、黒川憲、佐竹讓、赤池瑤子、本田真奈美、西田憲生、増田清士、棚橋俊仁、六反一仁. 酸化ストレス応答性 Tra2b4 mRNA による細胞老化の制御, 第 6 回臨床ストレス応答学会大会、2011 年 11 月 4-5 日、名古屋大学 (名古屋市)
 - 7) Kuwano Y, Kajita K, Satake Y, Kurokawa K, Yamagishi N, Akaike Y, Honda M, Nishida K, Masuda K, Tanahashi T, Rokutan K. Transformer-2beta regulates apoptosis through post-transcriptional regulation of bcl-2. Cell Symposia Regulatory RNAs, 2011 年 10 月 11 日 Wyndham hotel (Chicago, IL, U. S. A)
 - 8) Kajita K, Kuwano Y, Masuda K, Yamagishi N, Kurokawa K, Satake Y, Akaike Y, Honda M, Tanahashi T, Rokutan K. Premature stop codon-containing tra2beta4 mRNA isoform regulates cellular senescence. 3rd EMBO Meeting 2011, 2011 年 9 月 12 日 Austria Center Vienna (Vienna, Austria)
 - 9) 桑野由紀, 佐竹讓, 北村奈瑠香, 梶田敬介, 黒川憲, 山岸直子, 勝浦桜子, 棚橋俊仁, 近藤茂忠, 六反一仁. 大腸がん由来細胞株における *Transformer 2-beta* の酸化ストレス応答の解明 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド(神戸)
 - 10) 佐竹讓、桑野由紀、梶田敬介、黒川憲、山岸直子、勝浦桜子、北村奈瑠香、増田清士、棚橋俊仁、六反一仁. ヒト *transformer 2 beta* 遺伝子における選択的スプライシング制御機構の解明 第 5 回臨床ストレス応答学会大会、2010 年 11 月 19-20 日、徳島大学(徳島)
 - 11) Yuki Kuwano, Ken Kurokawa, Sakurako Katsuura, Naoko Yamagishi, Yuzuru Satake, Keisuke Kajita, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan. Alternative splice variants of SMG-1 as a potential marker for brief naturalistic stressors in peripheral leukocytes. The 7th World Congress on Stress、2010 年 8 月 25-27 日、Leiden University (Leiden), Netherlands
 - 12) Yuki Kuwano, Yuzuru Satake, Kensei Nishida, Kiyoshi Masuda, Ken Kurokawa, Shigetada Teshima-kondo, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan. The mechanism of *transformer 2-beta* gene expression in response to oxidative stress in human colon epithelial cells. Digestive Disease Week 2010. 2010 年 5 月 1-5 日、

Ernest N Morial Convention Center (New Orleans, LA, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑野 由紀 (KUWANO YUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：00563454