

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26670104

研究課題名(和文)未分化上皮細胞選択的スプライシングによる多機能性発現の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of multifunctional expression induced by the mRNA splicing selective in undifferentiated epithelium

研究代表者

山崎 純 (Yamazaki, Jun)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：50230397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Ca活性化Cl⁻チャンネル関連分子CLCAが上皮分化において短縮型アイソフォーム(CLCA-t)へ切替わるmRNAスプライシング機構を明らかにすることを目的にした。スプライシングが異なるexon 8～10までの遺伝子領域を含むレポータープラスミドを作成したところ、CLCA-tに対応したスプライシング様式(exon 8+10)が上皮分化によって抑制を受けることが示された。次に、CLCAの選択的スプライシングに対するエピジェネティック制御の影響を3次元粘膜再構築系を用いて検討した。その結果、ヒストンのトリメチル化によるクロマチン構造の変化がCLCAのスプライシングスイッチに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This project aims to clarify the mRNA splicing mechanism in which Ca²⁺-activated Cl⁻ channel modulator CLCA is switched to its truncated isoform (CLCA-t). Using the splicing reporter plasmids including the gene region (minigene) of exons 8, 9 and 10, the splicing pattern of which is distinct between two CLCA isoforms, the splicing pattern observed in CLCA-t (exon 8+10) was shown to be attenuated by the differentiation of epithelium. Next, we examined the epigenetic regulation of the selective splicing of CLCA in the 3-dimensional mucosal culture model. Overall, trimethylation of histone that reportedly alters the chromatin structure is likely to contribute to the splicing pattern in the CLCA isoforms.

研究分野：薬理学

キーワード：スプライシング 上皮細胞 クロライドチャンネル 分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上に発現する Cl⁻ チャンネルは細胞の興奮性、細胞容積、分泌などに関与する。Ca 活性化 Cl⁻ チャンネル (CaCC) は上皮細胞、神経細胞、筋細胞に存在し、数 μM 程度の細胞内 Ca²⁺ 濃度増加に応じて開口する。CaCC の分子本体は CLCA、bestrophin、tweety などが考えられていたが、近年、TMEM16A (anoctamine) であると報告された。Cl⁻ 透過性を制御する分子であるという位置づけにある CLCA は、ウシ気管から最初の遺伝子クローニングがなされ、大きな遺伝子ファミリーを形成することが示された。

申請者は、Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ チャンネル活性を促進させる分子 CLCA-f (903 a.a.) をラット小腸から初めてクローニングした (Yamazaki et al., Biochim. Biophys. Acta. - Biomemb., 2005)。そして、CLCA-f が唾液腺導管上皮細胞に局在して、Cl⁻ の再吸収に寄与することを示した (Ishibashi et al., J. Dent. Res., 2006)。分化・未分化状態の CLCA 発現制御を明らかにする目的で、マウス角化細胞株 Pam212 で転写制御を検討したところ、Ca²⁺ 濃度増加によって分化が促進され CLCA の発現が増大することが明らかになった。

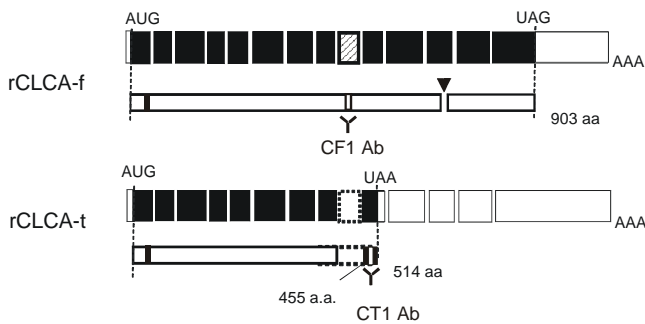


図1 rCLCA-f と rCLCA-t mRNA とのタンパク配列の比較。

ところが予期せぬことに、この研究過程において偶然に短縮型アイソフォーム (CLCA-t; 514 a.a.) が見出され、これが機能分子であることが徐々に明らかになってきた (図1)。CLCA-f とは異なる特徴を列挙すると (Yamazaki et al., J. Biol. Chem., 2013)

- (1) スプライシングの違い (exon 9-) によるフレームシフトで作られる。
- (2) CLCA-t は表皮や唾液腺導管において未分化上皮細胞に局限する。
- (3) 細胞質内から核内へのトランスロケーションが起きる。
- (4) 細胞外マトリックスとの β1-integrin 依存性の接着を抑制する。

表皮基底層の未分化上皮細胞における発現、核内移行、細胞接着抑制などの特徴は CLCA-t に固有のものであった。これらの結果によって、RNA スプライシングの相違に

よって異なる機能 (Cl⁻ 透過亢進と細胞接着抑制) が分化あるいは未分化の上皮細胞にそれぞれ賦与される可能性を示唆された。そこで、「上皮細胞の分化度の違いで RNA スプライシングが切替わり CLCA アイソフォームが生成されて、異なる生理機能を発揮する」のではないかと推定された。

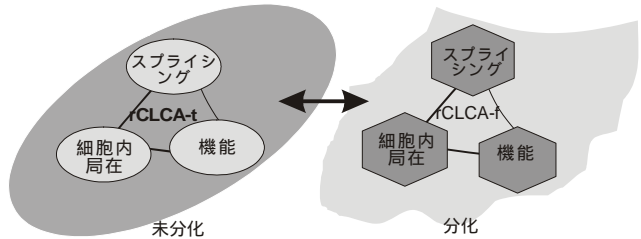


図2 分化による機能変換のスキーム

2. 研究の目的

本プロジェクトの目的は、「上皮細胞の分化度の違いで RNA スプライシングが切り替わり CLCA アイソフォームが生成されて、異なる生理機能を発揮する」との仮説を証明することであった (図2)。

選択的 RNA スプライシングは単一の遺伝子から複数のタンパク質をコードする mRNA を作り出す機構である。RNA スプライシングは組織依存的であり、発生学的に制御を受けていることも報告されている。スプライス部位の選択性はこれまでにあまりよくわかっていなかったが、イントロンやエクソンに splicing enhancer 結合部位があり、スプライシングを制御する機構が提唱されている。また、細胞種に応じたスプライシング因子のリクルートや、外来刺激によって転写とカップリングしたスプライシング選択が起きることが近年報告されている (Schor et al., Epigenetics, 2010)。そこで、分化依存的に CLCA をスイッチさせる機構として、エピジェネティック制御、すなわちヒストンリジン残基のアセチル化やメチル化によりスプライシング選択が起きる可能性がある (図3)。ヒストン修飾に関与する polycomb 複合体は発生や発癌に関連があるとされ、それによってスプライシングが制御されれば、分化依存的な発現スイッチ機構を考える上で大変興味深い。

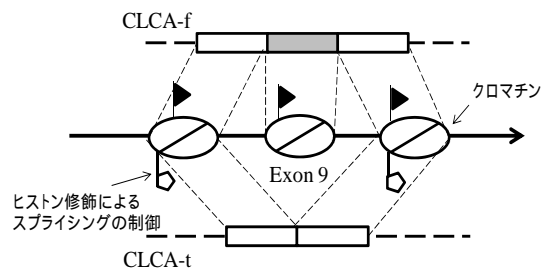


図3 クロマチン修飾によるスプライシングの変化

3. 研究の方法

(1) CLCA 遺伝子発現を担う転写因子解析
細胞外 Ca^{2+} 濃度の違いによって未分化 (0.05 mM) または分化 (1.0 mM) 状態にしたマウス表皮細胞株 Pam212 細胞に CLCA プロモーターベクターを遺伝子導入して、CLCA 遺伝子発現を検討した。プロモーター解析のためのコンストラクトは、CLCA の 5'-プロモーター領域をルシフェラーゼプロモーターベクターにサブクローニングして作成した。遺伝子発現に寄与する転写因子群を特定するためにプロモーター領域に変異を導入した。

(2) スプライシング・レポータープラスミド

スプライシングを受ける前の部分的な mRNA 配列からなる pre-mRNA を用いて組織分化選択的にスプライシングのスイッチを調べる手法が報告されている。そこには、CMV promoter の下流に、スプライシングを受けるエクソンを挟み込んだ minigene を繋ぎ、 β -globin のポリアデニレーションシグナルを含んでいる。本研究では、CLCA 遺伝子スプライシング・レポータープラスミドは、CMV promoter 領域、exon 8 から 10 までの遺伝子領域 (minigene) とその下流に GFP を連結した。CLCA-t 型のスプライシングを受ければ GFP が発現する仕組みであった (図 4)。

細胞外 Ca^{2+} 濃度の違いによって分化または未分化状態にしたマウスあるいはヒト表皮細胞株に minigene プラスミドを遺伝子導入して、スプライシング選択が影響を受けるか否かを RT-PCR あるいは Western blot 法によって検討した。

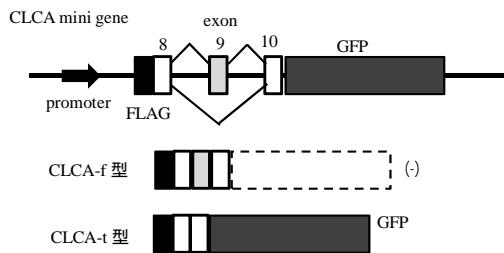


図4 スプライシング・レポーター プラスミド

(3) エピジェネティック制御 (クロマチン修飾) によるスプライシングの検討

ラット線維芽細胞をコラーゲンゲルに包埋して、その上にラット口蓋粘膜上皮細胞あるいは表皮細胞株を播種したのちにゲル表面を気相に触れさせて上皮の重層化を誘導した (3次元粘膜再構築モデルの作成) (Arita et al., J. Periodont. Res. (in press) 2018; Murakami et al., J. Periodont. Res., 2014)。

重層化誘導開始後から、histone deacetylase 阻害薬の Na butylate や polycomb 複合体の阻害薬 3-deazaneplanocin A などを処理した。

サンプルは上皮重層化 6 日間後にホルマリンにて固定し、パラフィン包埋後薄切して H-E 染色にて重層化構造に与える影響を調べた。また、抗原賦活化後に免疫蛍光染色法にて CLCA アイソフォームの局在を検討し、スプライシング選択による影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 転写活性に関する CLCA プロモーター解析

CLCA 遺伝子の 5' 末端のプロモーター解析によると、-478 番の塩基から転写開始点までにある NF- κ B 結合部位 (-960 から -950) が転写活性に重要であることが見出した。さらに、NF- κ B 経路を活性化させる TNF- α がプロモーター活性を 20% 増加させ、NF- κ B 経路阻害剤 caffeic acid phenethyl ester (CAPE) が活性を 60% 抑制することが明らかになった。また、TNF- α あるいは CAPE は内在性の CLCA mRNA とタンパクレベルをそれぞれ 20% 増強あるいは 30~50% 抑制した。他方、細胞外 Ca^{2+} 濃度の増加により内在性の CLCA レベルの増加が認められた。これらの結果は、CLCA 遺伝子の発現調節には Ca^{2+} とともに NF- κ B 活性が関与することを示している。

(2) Minigene 導入によるスプライシング切替え

RNA スプライシングの切り替わる機構を、minigene を基盤にした CLCA 遺伝子スプライシング・レポーターを遺伝子導入した複数の細胞株を用いて検討した。レポータープラスミドを HEK293 細胞へ遺伝子導入したところ、exon 8+10 の発現と exon 8+9+10 のごく僅かな発現が認められた。

重層化上皮での機構を検討するために、マウス角化細胞株 Pam212 に遺伝子導入すると、exon 8+10 は検出されたが、exon 8+9+10 は検出されなかった。 Ca^{2+} 濃度を 0.05 mM から 1 mM 以上へ増加させて Pam212 の分化を促進させたが、CLCA スプライシングには影響を与えなかった。また、線維芽細胞株を包埋したコラーゲンゲル上で Pam212 を 3次元培養しても適切な重層構造が見られなかった。

他方、ヒト由来ケラチノサイト N/TERT1 株では、 Ca^{2+} 濃度の増加による分化マーカー

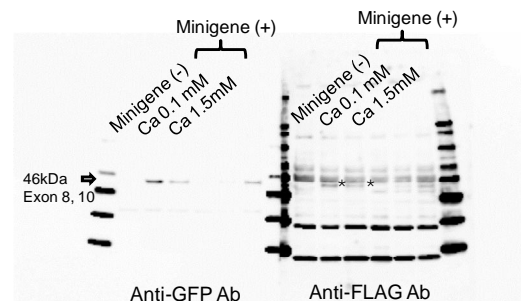


図5 GFPタグが付いた minigene 産物 (exon 8+10) の発現

ーであるケラチンの発現パターンの変化が確認された。N/TERT1 株に minigene を遺伝子導入したところ RT-PCR によって exon 8+10 が検出された。Western blot によって、GFP 標識された短縮型 (exon 8+10) が、Ca²⁺ 濃度の増加によって抑制された (図 5)。

N/TERT1 株は 3 次元的に培養を行なうと適切な重層構造を呈することが明らかになったため、3 次元培養条件下でのスプライシングスイッチを見る良い細胞系であろうと考えられた。3 次元モデル系においては minigene を遺伝子導入後、RT-PCR により exon 8+10 のみ検出された。以上により、exon 8 から 10 までの pre-mRNA において、基本的なスプライシング様式は CLCA-t に示される形式であるが、上皮分化によって抑制を受ける可能性が示された。

(3) エピジェネティック制御と CLCA アイソフォームの発現切替え

エピジェネティックとは DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の多様性を起こす仕組みのことであり、その分子基盤は DNA のメチル化やヒストンの化学修飾にある。DNA のメチル化によって転写因子の結合は阻害されて遺伝子発現が変化する。これまで、転写制御と選択的スプライシングとの関係が示されてきた。ヌクレオソームの局在が、エクソンの位置やその認識に関連するとされているため、クロマチン修飾がスプライシングの制御に重要な影響を与えることが予測された。

ヒストンの複数のリジン残基は 1~3 個のメチル基を可逆的に結合する。メチル基を転移する酵素をリジンメチル基転移酵素と呼び、その阻害剤には G9a 阻害剤 (H3K9 ジメチル化酵素阻害剤) や Ezh2 阻害剤 (H3K27 トリメチル化酵素阻害剤) などがある。Ezh2 は polycomb 複合体のサブユニットであり、メチル基転移酵素活性を持つ。

ラットの口蓋粘膜上皮と線維芽細胞からなる 3 次元構築系を作成し、これらの阻害薬を処置後に、CLCA アイソフォームならびに CLCA-t と結合することが知られる RACK1 タンパクの局在を免疫蛍光法にて検討した。

コントロールでは、基底層から上層にかけて CLCA-t と RACK1 の発現が認められ、CLCA-f の発現は基底層以外の層に限定されていた。G9a 阻害剤の BIX01294 (10 μM) は上皮重層化や CLCA-t、RACK1 と CLCA-f の発現に影響を与えなかった。一方、Ezh2 阻害剤の 3-deazaneplanocin A (DZNep, 10 μM) は重層化や CLCA-f タンパクと CLCA-f mRNA の発現を抑制するが、基底層での CLCA-t、RACK1 の発現は弱いながらも認められた。DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害剤の 5-aza-2'-deoxycytidine は上皮の重層化を完全に抑制し、CLCA アイソフォームのいずれの発現も認められなかった。

次に、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)

阻害剤による上皮重層化の影響を検討した。Trichostatin A は 1 nM 以下に下げても細胞毒性が著しく高かったため、酪酸ナトリウム (NaBt; 1 mM) を用いて検討した。NaBt によって上皮層の厚みは減少するが、CLCA-t の局在は基底層に局限し、CLCA-f は基底層直上の層に局在が認められた。未分化マーカーであるケラチン 14 あるいは分化マーカーであるケラチン 1 には、基底層あるいはその直上の層での強い局在がそれぞれ認められた。

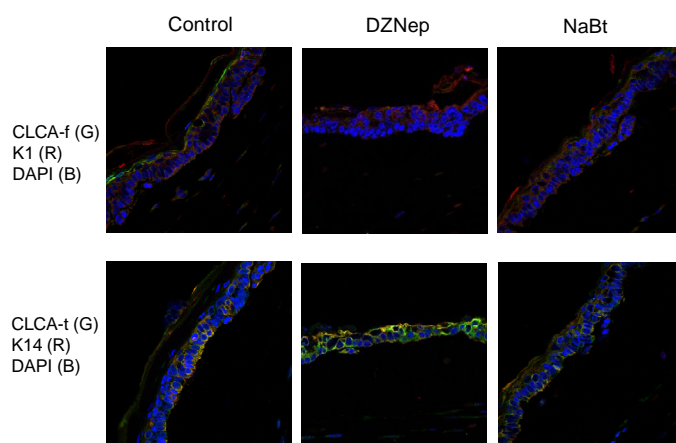


図6 ラット由来表皮細胞株FRSKを重層化させたモデルに対するエピジェネティック阻害剤の効果

さらに、ラット口腔粘膜線維芽細胞を包埋したゲルの上にラット由来表皮細胞株 FRSK を重層化させたモデル標本を用いた。まず、この細胞株を重層化させると、CLCA-f mRNA のみならず CLCA-t mRNA が発現することを確認した。DZNep 処置は FRSK における CLCA-f 発現を抑制するが、ケラチン 1 の発現には影響を与えなかった。他方、基底層での CLCA-t の発現は増強され、ケラチン 14 との共発現が認められた (図 6)。また、NaBt 処理条件下では、FRSK における CLCA-f、CLCA-t、ケラチン 1 と 14 はコントロールに比べて不明瞭な発現様式であった。

以上の結果から、エピジェネティック阻害剤、特に Ezh2 阻害剤は表皮あるいは口腔粘膜における CLCA アイソフォームの切替えに影響を与える可能性が示唆された。

本研究によって、CLCA の転写には 5'-プロモーター領域が重要ではあるが、未分化あるいは分化型の上皮細胞によるスプライシング切替えには、少なくとも一部には exon 8 から 10 までの pre-mRNA 配列が影響を与えられた。また、この機構にヒストンのメチル化によるクロマチン構造の変化が関与する可能性がある。これらの結果を踏まえて、スプライシング切替えに必要な部位の特定を統合的に図ることが今後の課題である。

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 10 件)

Arita S., Hatta M., Uchida K., Kita T., Okamura K., Ryu T., Murakami H., Sakagami R., Yamazaki J. Peptidylarginine deiminase is involved in maintaining the cornified oral mucosa of rats. *J. Periodont. Res.* (*in press*) 2018 .

Ishii T., Uchida K., Hata S., Hatta M., Kita T., Miyake Y., Okamura K., Tamaoki S., Ishikawa H., Yamazaki J. TRPV2 channel inhibitors attenuate fibroblast differentiation and contraction mediated by keratinocyte-derived TGF- β 1 in an in vitro wound healing model of rats. *J. Dermatol. Sci.* 90, 332-342, 2018. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.03.003.

Hatta M., Miyake Y., Uchida K., Yamazaki J. Keratin 13 gene is epigenetically suppressed during transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in a human keratinocyte cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 381-386, 2018. doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.047.

Hatta M., Arita S., Yamazaki J. Mechanistic insight into the aberrant silencing of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma cells. *J. Oral Biosci.* 58 (2), 45-49, 2016. doi:10.1016/j.job.2016.01.001.

山崎 純 上皮細胞のイオン輸送と分化に関与したカルシウム活性化クロライドチャネル関連分子の機能発現. *薬学雑誌* 136(3), 485-490, 2016 . doi:10.1248/yakushi.15-00246-5.

Hatta M., Naganuma K., Kato K., Yamazaki J. 3-Deazaneplanocin A suppresses aggressive phenotype-related gene expression in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468, 269-273, 2015. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.115.

Hiromatsu R., Hatta M., Okamura K., Sakagami R., Yamazaki J. NF- κ B-regulated transcriptional control of CLCA in a differentiated mouse keratinocyte line. *J. Dermatol. Sci.* 78, 189-196, 2015. doi:10.1016/j.jdermsci.2015.03.007.

Naganuma K., Hatta M., Ikebe T., Yamazaki J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. *BMC cancer.* 14, 988, 2014. doi:10.1186/1471-2407-14-988.

Hata S., Okamura K., Hatta M., Ishikawa H., Yamazaki J. Proteolytic and non-proteolytic activation of keratinocyte-derived latent TGF- β 1 induces fibroblast differentiation in a wound-healing model using rat skin. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 230-243, 2014. doi:10.1254/jphs.13209FP

Murakami H., Okamura K., Aoki S., Sakagami R., Yamazaki J. Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models. *J. Periodont. Res.* 49, 703-710, 2014. doi:10.1111/jre.12152.

〔学会発表〕(計 10 件)

有田 晴一、八田 光世、笠 孝成、内田 邦敏、坂上 竜資、山崎 純 . 口腔粘膜上皮の構造維持に関与するペプチジルアルギニン脱イミノ化酵素 . 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 29 日 (高松)

有田晴一、笠 孝成、八田光世、内田邦敏、坂上竜資、山崎 純 . 口腔粘膜のバリア形成に寄与するペプチジルアルギニン脱イミノ化酵素 . 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15 日 (長崎).

八田光世、永沼香織、有田晴一、加藤健一、大久保つや子、山崎 純 . クロマチン修飾酵素阻害薬の口腔がん細胞の悪性形質に対する抑制効果 . 第 89 回日本薬理学会年会 . 2016 年 3 月 9 日 (横浜).

有田晴一、村上弘、八田光世、坂上竜資、山崎 純 . 皮膚と口腔粘膜におけるフィラグリンの発現様式および分解過程の比較 . 第 89 回日本薬理学会年会 . 2016 年 3 月 9 日 (横浜).

八田光世、永沼香織、山崎 純 . 口腔がん細胞におけるエピジェネティックサイレンシングに対する 3-deazaneplanocin A の効果 . 第 68 回日本薬理学会西南部会 2015 年 11 月 21 日 (下関).

八田光世、永沼香織、有田晴一、石井太郎、大久保つや子、山崎 純 . 3-Deazaneplanocin A は口腔がん細胞の遺伝子発現パターンを変化させる . 第 57 回歯科基礎医学会学術大会 2015 年 9 月 13 日 (新潟).

山崎 純 . 上皮細胞のイオン輸送と分化に
関与したカルシウム活性化クロライドチャ
ネル関連分子の機能発現 . (招待講演) 日本薬
学会第 135 年会 2015 年 3 月 27 日神戸学院
大学 (神戸)

廣松 亮、八田光世、坂上竜資、山崎 純 .
マウスケラチノサイト株における CLCA 発
現の NFkappaB による転写制御 . 第 88 回日
本薬理学会年会 2015 年 3 月 20 日 名古屋
国際会議場 (名古屋).

廣松 亮、八田光世、田中喜太郎、坂上竜資、
山崎 純 . マウス上皮細胞株における Cl チ
ヤネル調節因子の NFkappaB による転写制
御 . 第 67 回日本薬理学会西部会 2014 年
11 月 23 日 産業医科大学 (北九州).

廣松 亮、八田光世、坂上竜資、山崎 純 .
マウスケラチノサイトにおける CLCA 遺伝
子の発現調節因子 . 第 56 回歯科基礎医学会
学術大会 2014 年 9 月 27 日 福岡国際会議
場 (福岡).

〔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〕

ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 純 (YAMAZAKI, Jun)
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授
研究者番号：50230397

(2)研究分担者

八田光世 (HATTA, Mitsutoki)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号：30344518

岡村和彦 (OKAMURA, Kazuhiko)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号：00224056

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

加藤健一 (KATO, Kenichi)
福岡歯科大学・口腔歯学部・非常勤講師