

論 文 内 容 要 旨

題目 Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells

(酸化ストレスにより誘導される truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 はヒト大腸癌細胞のインターロイキン 8 の産生を調節する)

著者 Shizuka Kano, Kensei Nishida, Hiroyuki Kurebe, Chihiro Nishiyama, Kentaro Kita, Yoko Akaike, Keisuke Kajita, Ken Kurokawa, Kiyoshi Masuda, Yuki Kuwano, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan

平成 26 年 2 月 1 日発行

American Journal of Physiology - Cell Physiology

第 306 巻第 3 号 C250 ページから C262 ページに発表済

内容要旨

Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) は、N 末端に RNA 認識ドメインと C 末端に Arg/ser-rich (RS) ドメインを持つ 12 種類の SRSF タンパク質ファミリーのなかで、最も分子量の小さい SRSF タンパク質である。SRSF3 は、スプライシング反応や mRNA の核外輸送を調節して遺伝子発現を制御し、細胞周期などを調節する。さらに、SRSF3 は、卵巣がんや大腸がんで高発現しており、これらのがん細胞の異常増殖に関与する可能性も示唆されている。SRSF3 遺伝子のエクソン 4 は、マウス、ラット、ヒトで配列が 100% 保存されている超保存領域の一つをコードしている。ヒトゲノムには 481 の超保存領域が見つかり、進化の過程で何か重要な機能を獲得したと想定されているが、その詳細は不明である。本研究では、SRSF3 遺伝子のエクソン 4 を含むスプライスバリエーションの機能を解析した。

SRSF3 遺伝子のエクソン 4 は中途ストップコドン (PTC) を含んでおり、エクソン 4 を含む mRNA バリエーション (SRSF3-PTC mRNA) はナンセンス変異分解機構 (NMD) により分解される。しかしながら、ヒト大腸癌細胞株 (HCT116) を酸化ストレス (100 μ M 亜硝酸ナトリウム処理) に暴露すると、SRSF3-PTC mRNA の安定性が増し、3 時間をピークに SRSF3-PTC mRNA の発現量が約 8 倍まで上昇した。

化学発光法による NMD レポーターアッセイシステムを用いて NMD 活性を測定すると、亜ヒ酸ナトリウム処理は NMD 活性を有意に低下させた。また、この時、細胞質で増加した *SRSF3-PTC* mRNA から、細胞内局在を調節する RS ドメインの大部分を欠いた truncated SRSF3 (SRSF-TR) が翻訳されることをウェスタンブロット法で発見した。SRSF3-FL 過剰発現細胞とは異なり、SRSF3-TR 過剰発現細胞は、非ストレス下においても細胞質にストレス顆粒を形成し、細胞質およびストレス顆粒に SRSF3-TR が局在することを蛍光免疫細胞化学染色法で確認した。さらに、*SRSF3-PTC* mRNA をノックダウンすると、酸化ストレスによる *IL8* 遺伝子の転写の活性化が抑制され、培養液中へのインターロイキン (IL)-8 の分泌が約 40% 低下した。この時、*IL8* mRNA の安定性に変化は見られなかった。*IL8* 遺伝子のプロモーター活性を調べたところ、*IL8* 遺伝子の転写開始点より上流 -126 から -120 塩基対内に存在する AP-1 結合配列が亜ヒ酸ナトリウムに対する応答領域であること、この AP-1 結合配列に 2 点変異を導入するとその応答性が消失することを確認した。*SRSF3-PTC* mRNA ノックダウン細胞に亜ヒ酸ナトリウムを添加すると、c-Jun の誘導が特異的に抑制されていることをウェスタンブロット法で確認した。最後に、*SRSF3-PTC* mRNA のノックダウン細胞では、クロマチン免疫沈降法により *IL8* 遺伝子のプロモーター領域に存在する AP-1 結合サイトへの c-Jun の結合が低下すること、及び、AP-1 の転写活性が低下することを確認した。

これらの結果から、酸化ストレスに曝された大腸がん細胞では、*SRSF3-PTC* mRNA バリエーションから SRSF3-TR タンパク質が翻訳され、SRSF3-TR は c-Jun の発現制御を介して IL-8 の産生を調節する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1277号	氏名	狩野 静香
審査委員	主査	勢井 宏義	
	副査	井本 逸勢	
	副査	米村 重信	

題目 Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 production in human colon cancer cells

(酸化ストレスにより誘導される truncated serine/arginine-rich splicing factor 3はヒト大腸癌細胞のインターロイキン8の産生を調節する)

著者 Shizuka Kano, Kensei Nishida, Hiroyuki Kurebe, Chihiro Nishiyama, Kentaro Kita, Yoko Akaike, Keisuke Kajita, Ken Kurokawa, Kiyoshi Masuda, Yuki Kuwano, Toshihito Tanahashi, Kazuhito Rokutan

平成26年2月1日発行

American Journal of Physiology - Cell Physiology

第306巻第3号 C250頁からC262頁に発表済

(主任教授 六反 一仁)

要旨 serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3)は、スプライシング反応や mRNA の核外輸送を制御して遺伝子発現を調節する。また、SRSF3 は卵巣がんや大腸がんで高発現しており、これらのがん細胞の異常増殖との関連も示唆されている。SRSF3 遺伝子のエクソン4は中途ストップコドン(PTC)を含んでおり、エクソン4を含むスプライスバリエント(SRSF3-PTC) mRNA は、mRNA 品質管理機構(NMD)により速やかに分解される。

申請者は、ヒト大腸癌細胞株(HCT116)を酸化ストレスに曝すと *SRSF3-PTC* mRNA が発現することを見出し、本バリエーションの機能を解析した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) HCT116 細胞を酸化剤(亜ヒ酸ナトリウム)で処理すると、NMD 活性が阻害され、細胞質内の *SRSF3-PTC* mRNA 量が約 20 倍増加した。この *SRSF3-PTC* mRNA から serine/arginine-rich (SR) ドメインの大部分を欠如した truncated SRSF3 (SRSF3-TR)が翻訳された。
- 2) SRSF3-TR 過剰発現細胞は、SRSF3 過剰発現細胞とは異なり、非ストレス下においても細胞質にストレス顆粒を形成し、SRSF3-TR は細胞質に加えストレス顆粒にも局在していた。
- 3) HCT116 細胞に亜ヒ酸ナトリウムを添加すると、*IL8* 遺伝子の転写開始点の上流-120 から-126 塩基対に存在する AP-1 結合配列を介して転写が活性化され、IL-8 の分泌が増加した。*SRSF3-PTC* mRNA をノックダウンすると、亜ヒ酸ナトリウムによる IL-8 の分泌を約 40%低下させた。
- 4) HCT116 細胞の *SRSF3-PTC* mRNA をノックダウンすると、亜ヒ酸ナトリウム添加による c-Jun の誘導が抑制され、*IL8* 遺伝子のプロモーター領域に存在する AP-1 結合サイトへの c-Jun の結合が低下し、AP-1 の転写活性が低下することを確認した。

本研究では、酸化ストレスにより増加する *SRSF3-PTC* mRNA バリエーションから翻訳される機能性タンパク質は、c-Jun の発現制御を介して IL-8 の産生を調節することを初めて明らかにした。本研究の成果は、炎症と発がんのメカニズムを理解する上で新しい知見を示すものであり、学位授与に値すると判定した。