

## 論文の要約

報告番号	① 乙	医 第1277号	氏名	狩野 静香
学位論文題目	Oxidative stress-inducible truncated serine/arginine-rich splicing factor 3 regulates interleukin-8 in human colon cancer cells			
<p>Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) は、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タンパク質であり、N末端にRNA認識ドメインとC末端に1つのArg/ser-rich (RS)ドメインを持つ。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の高発現が報告されており、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遺伝子は7つのエクソンを持ち、このうちエクソン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。</p> <p>機能が報告されているSRSF3タンパク質(SRSF3-FL)は選択的スプライシングによりエクソン4が除かれたmRNAバリエーション(SRSF3-FL mRNA)から翻訳される。一方、エクソン4を含むmRNAバリエーション(SRSF3-PTC mRNA)はエクソン4内に中途ストップコドン(PTC)が含まれるため、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 μM 亜ヒ酸ナトリウム処理)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、リン酸化修飾を受けることで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。次にSRSF3-FL及び-TRタンパク質の過剰発現細胞を構築し、蛍光免疫細胞化学染色法を用いて細胞内局在を検討したところ、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が局在することが明らかになった。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。さらに、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、AP-1構成因子である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</p>				