

論文内容要旨

細胞老化における MDM4 の選択的スプライシング制御を介したスプライシング因子 PRPF19 の役割

主指導教員：田原 栄俊教授
(医系科学研究科 細胞分子生物学)
副指導教員：高野 幹久教授
(医系科学研究科 医療薬剤学)
副指導教員：紙谷 浩之教授
(医系科学研究科 核酸分析化学)

矢野 公義
(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

細胞老化は、主に p53-p21/p16-Rb 経路によって制御される安定的な細胞周期停止機構であり、発がんストレスに対するがん抑制機構として考えられている。細胞老化誘導機構は、転写因子やクロマチン修飾因子による遺伝子発現、microRNA による翻訳抑制などを介した複雑な分子シグナルによって制御されている。興味深いことに、細胞老化誘導機構に関して、RNA やタンパク質の量的変化だけでなく、TP53 などの特定の遺伝子の選択的スプライシングの変化も重要であることが報告されている。しかしながら現在までに、RNA スプライシング機構の変化が細胞老化に与える影響については十分に検討されていない。

本研究では、細胞老化を制御するスプライシング因子を同定、機能解析することによって、細胞老化における RNA スプライシング機構の役割を解明することを目的とした。

はじめに、細胞老化を制御するスプライシング因子を探索するために、正常ヒト胎児肺由来線維芽細胞株 TIG-3 の継代早期細胞と老化細胞を用いてマイクロアレイ解析を行なった。パスウェイ解析や遺伝子オントロジー解析の結果から、RNA スプライシングに関与する遺伝子群の発現が老化細胞で有意に低下することが示された。これらの発現低下した遺伝子に着目して、siRNA による標的遺伝子のノックダウン後の細胞増殖および老化関連 β ガラクトシダーゼ活性の評価に基づいた機能的スクリーニングを行なった。その結果、細胞老化の誘導に関与する重要なスプライシング因子として PRPF19 が同定された。PRPF19 の発現低下が細胞老化の誘導に寄与するかどうかを詳細に調べた結果、PRPF19 のノックダウンした細胞では、老化関連遺伝子である CDKN1A (p21) や CDKN2A (p16) の発現上昇、LMNB1 (Lamin B1) の発現低下、老化関連 β ガラクトシダーゼ活性の上昇、老化関連ヘテロクロマチン構造を含む複数の細胞老化マーカーが観察された。これらの結果から、PRPF19 の発現低下は細胞老化の誘導を促進することが示された。

次に、PRPF19 によって制御される細胞老化誘導機構を調べた。PRPF19 をノックダウンした細胞では p53-p21 経路の活性化が観察されたことから、PRPF19 が p53 依存的な細胞老化誘導に関与しているかどうかを検証した。siRNA によって p53 をノックダウンした細胞では、PRPF19 のノックダウンによる老化関連 β ガラクトシダーゼ活性の上昇及び細胞周期停止が抑制された。これらの結果から、PRPF19 の発現低下は p53 依存的に細胞老化を誘導することが示された。さらに、RNA シークエンス解析を用いた Multivariate Analysis of Transcript Splicing (MATS) 解析から、PRPF19 をノックダウンした細胞ではエクソン 6 をスキッピングした MDM4 mRNA が検出されることを見出した。MDM4 は p53 抑制因子として知られていることから、PRPF19 を介した p53 依存的な細胞老化誘導機構に MDM4 の選択的スプライシング変化が関与しているかどうかを検証した。PRPF19 のノックダウンは、MDM4 mRNA のエクソン 6 スキッピングと MDM4 タンパク質の発現低下を引き起こした。重要なことに、継代早期細胞と比較して老化細胞においても同様にこれらの変化が観察された。また、MDM4 のノックダウンは p53-p21 経路を活性化させた一方で、MDM4 の過剰発現は PRPF19 のノックダウンによる p53-p21 経路の活性化を抑制した。以上の結果から、PRPF19 は MDM4 の選択的スプライシング調節を介して p53 依存的細胞老化を制御することが示された。

最後に、PRPF19 がどのように MDM4 の選択的スプライシングを調節しているのかを調べた。PRPF19 は、U4 snRNP 構成因子 PRPF3 と U5 snRNP 構成因子 PRPF8 の相互作用を促進することによって U4/U6.U5 tri-snRNP 複合体を安定化することが報告されている。これらの因子が MDM4 の選択的スプライシングを制御しているかどうかを検討した結果、これらのノックダウンは、MDM4 mRNA のエクソン 6 スキッピングと MDM4 タンパク質の発現低下を引き起こした。また、PRPF19 のノックダウンによって PRPF3-PRPF8 相互作用が減弱した。このことから、PRPF19 は PRPF3-PRPF8 相互作用を介して MDM4 の選択的スプライシングを調節していることが示唆された。

本研究より、PRPF19 を中心とした RNA スプライシング機構の調節変化が p53 依存的な細胞老化誘導機構に重要な役割を果たすことが明らかになった。