Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-12

熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析

山本，耕一

(Degree)
博士（理学）
(Date of Degree)
2016-09-09
(Date of Publication)
2018-09-09
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙第3316号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003316

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（別紙様式３）

論 文 内 容 の 要 旨

氏　　名　　山本　耕一

論文題目

熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析

学位論文要旨

論文題目：熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析

高等真核生物の多くの遺伝子発現は選択的スプライシングにより制御されている。これら選択的スプライシングは特定のスプライシングに関わる因子の存在や細胞がおかれた状況に応じて高度に制御されていることが明らかとなってきている。これらの制御機構について近年の研究から理解が進んでいるが、依然として未解明な点が多く残されている。本研究では、細胞の熱ストレス応答性のスプライシング制御に着目し検討を行った。

選択的スプライシングの制御は細胞の熱ストレス応答において重要な働きを担っており、これらの制御について SRp38 を介した全体的なスプライシング抑制のモデルが広く知られている。一方で一部遺伝子に関する近年の研究結果から本制御機構によるスプライシング抑制以外にも、熱ストレス応答において多様な選択的スプライシング制御が行われている可能性が明らかになっている。しかし、これら制御の全体像は依然不明である。そこで、本研究では熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御をうける hsp105 遺伝子の制御で中心的な役割を果たしていると考えられる hnRNPK 及び PSF（SFPQ）を対象とし、これらスプライシング因子により熱ストレス下で選択的スプライシングが制御される遺伝子群を明らかにすることにより、熱ストレス応答における選択的スプライシング制御の全体像について理解を深めることを目的とし、熱ストレス応答に伴う選択的スプライシング制御について網羅的に解析することを試みた。

本検討では、ヒト胎児腎由来細胞（HEK293 細胞）と siRNA を用いた実験系を構築し、hnRNPK 及び PSF（SFPQ）をノックダウンした時の熱ストレス応答性の選択的スプライシングに与える影響について、マイクロアレイを用いた解析を実施した。本解析には、従来のエキソンアレイと異なり、コード転写産物のエキソンに加え、エキソン間のスプライス接合部、非コード転写産物までの広範囲な領域をカバーすることが可能なマイクロアレイである Affymetrix 社の Human Transcriptome Array 2.0 を使用した。さらに hnRNPK 及び PSF（SFPQ）に加え、SRp38（SRSF10）についても同様の検討を実施した。本解析結果から、これらスプライシング因子によって熱ストレス応答性の選択的スプライシングが制御されることが示唆された遺伝子群について、遺伝子オントロジー（GO: Gene Ontology）解析を行い、それぞれ抽出された遺伝子群について生物学的な機能に特徴が認められるかについても併せて検討を行った。

まず、HEK293 細胞に対し 42℃、3 時間の熱ストレス条件を与え解析を行ったところ、4360 遺伝子について熱ストレスに応答性の選択的スプライシング制御を受けることが示唆された。次に、それら遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシング様式を確認したところ、スプライシング抑制によって生じると考えられるイントロンリテンション以外にも、多様な選択的スプライシングが多くの遺伝子で生じていると推定された。これら遺伝子について GO 解析を行った結果、これらの遺伝子

は、熱ストレス応答に関連する機能を含め多様な生物学的機能に属していることが確認された。次に、hnRNPK 及び PSF について RNAi によるノックダウンを行い、それら選択的スプライシングの変化を解析したところ、hnRNPK は 678 遺伝子、PSF は 477 遺伝子の熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御に関与していると推定された。また、これら抽出された遺伝子について同様に GO 解析を行ったところ、hnRNPK が制御に関わると推定された遺伝子群では、熱ストレス応答に関連する機能に属する遺伝子の割合が相対的に増加していることが確認された。一方、PSF では特に目立った傾向は認められなかった。次に、SRp38 について行った検討から、SRp38 も 600 近い遺伝子の熱ストレス応答性の選択的スプライシングに関与していることが示唆された。これら遺伝子群に対しても同様に GO 解析を行った結果、SRp38 では hnRNPK とは異なる傾向が認められ SRp38 が関与する熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受けると考えられる遺伝子群では、M 期を含む細胞周期に関連する機能やタンパク質の細胞内移送に関連する機能に関わる遺伝子の割合が相対的に増加している様子が確認された。また、これら熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受ける遺伝子のうち hsp105 及び TNRC6A を用いた検討を行い、これらスプライシング因子による選択的スプライシング制御の様子の確認も併せて実施した。その結果、hnRNPK がエキソンインクルージョンを抑制する方向で、SRp38 がエキソンインクルージョンを促進する方向で制御に関わっている様子を確認した。

今回の検討結果から、HEK293 細胞において 42℃、3 時間の熱ストレス条件において 4360 と多くの遺伝子が選択的スプライシングの制御を受けること、さらに多様な選択的スプライシング制御が行われている様子が明らかとなった。また、これら熱ストレス応答性の選択的スプライシングに関与する因子として hnRNPK、PSF 及び SRp38 について解析を行い、これら因子がそれぞれ 500～700 遺伝子の制御に関わっていること、これら 3 つの因子を合せて全体の約 30%の遺伝子の熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御に関わっていることが推定された。さらに、hnRNPK 及び SRp38 に関する解析から、それぞれの因子の制御を受けると推定された遺伝子群の間で、生物学的な機能に特徴的な傾向が認められることが明らかとなった。今回の検討では、残り 70%の遺伝子の制御に関与する制御因子及びそれら遺伝子の機能については依然不明なままであるが、一連の検討により熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御自体の多様性に加え、それら制御の対象となる遺伝子が広範囲に及んでいる様子が明らかとなった。本研究で得られたこれら知見は、熱ストレス応答において選択的スプライシング制御が多彩な遺伝子発現に寄与していることを示唆するものであると考えられた。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	山本　耕一		
論文題目	熱ストレス応答性の選択的スプライシングの網羅的解析		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	教授	井上　邦夫
	副　査	教授	坂本　博
	副　査	教授	深城　英弘
	副　査		
	副　査		

要　　旨

細胞は、各種ストレス、外部からの物理的・化学的刺激や細胞間相互作用、細胞増殖・細胞周期・細胞死、感染などに応答して適切・迅速な遺伝子発現制御を行う。

真核生物遺伝子の多くはイントロンによって分断化されており、mRNA 前駆体におけるスプライシングは形質発現に必須の過程である。さらに、スプライシング様式を巧妙に変化させる選択的スプライシングは、単一の遺伝子から複数種の異なる蛋白質の生成を可能にする制御機構であり、限られた数の遺伝子から多様な蛋白質を生じる大きな原動力となっている。

細胞環境に応答したスプライシング制御機構については、手つかずの問題が多く残されているが、熱ストレス応答機構は、これらの問題を解明する上で有効なモデル系と言える。熱ストレス条件下では、スプライシング反応のグローバルな抑制が起こるとされてきたが、実際には、選択的スプライシングが誘導されるいくつかの遺伝子が報告されている。その１つである哺乳類の hsp105 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシング誘導については、最近の当グループの研究により、RNA 結合性蛋白質の hnRNP K や PSF が必要なことが示されている。

本研究は、選択的スプライシング産物の検出に有効なエキソンアレイ解析手法を用いることによって、（1）ヒト細胞における熱ストレス応答性の選択的スプライシングをゲノムワイドに探索してその生理的役割を明らかにすること、（2）いくつかの制御因子とその標的とする遺伝子群をゲノムワイドに解析することによって、熱ストレス応答性の選択的スプライシングの制御ネットワークを包括的に明らかにすることを目指している。

本論文は全４章で構成されている。

第一章の序論では、選択的スプライシングやその制御機構、および、熱ストレスによるスプライシング制御に関するこれまでの知見を整理し、本研究の背景と目的をまとめている。

第二章の材料と方法では、siRNA を用いた RNA 干渉による遺伝子のノックダウン手法、エキソンアレイ法や、アレイデータをもとにした遺伝子オントロジー解析手法について述べている。

第三章の結果では、まず、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞において熱ストレスにより hsp105 遺伝子の選択的スプライシング（第 12 エキソンの除去）の誘導が起こること、および、その誘導が hnRNP K のノックダウンによって阻害されることを確認し、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いて得られたこれまでの結果が異なる細胞株でも同様であることを示した。その上で、HEK293 細胞から抽出した全 RNA を用いてエキソンアレイ解析を行った。

氏名	山本　耕一

通常の 37 度で培養した細胞と 42 度 3 時間の熱ストレス処理を行った細胞を比較した結果、選択的スプライシングの指標である SI 値が 2 倍以上変動する 4 千数百の遺伝子が同定された。この中には、hsp105 を含め、熱ストレスに応じてエキソン除去が誘導されるものに加え、エキソン挿入が誘導されるもの、5' スプライス部位や 3' スプライス部位が選択されるもの、イントロン残留が制御されるものなど、多様な様式の選択的スプライシングが存在していた。通常温度で観察される残留イントロンが熱ストレス処理によって除去される 14 遺伝子には、clk1/4 遺伝子が含まれていた。clk1/4 遺伝子は、スプライシング因子 SR タンパク質ファミリーのリン酸化制御を担うことが知られ、近年、マウス細胞において、熱ストレスによって残留イントロンのスプライシング活性化が誘導されることが報告されている。また、これら 4 千数百の遺伝子のオントロジー解析を行ったところ、熱ストレス応答に関与する遺伝子群のほか、細胞周期、ユビキチン修飾、mRNA 代謝などに関係する遺伝子が濃縮されていることが明らかとなった。

次に、hsp105 における熱ストレス応答性の選択的スプライシングに働く hnRNP K をノックダウンした細胞について比較検討を行った。その結果、hnRNP K 依存的に熱ストレス応答性の選択的スプライシングが誘導される遺伝子数は 700 弱であることがわかった。これらの遺伝子群には、熱ストレス応答に関与する遺伝子に加え、mRNA の核外輸送や RNA プロセシング、RNA サイレンシングなどに関係する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。

さらに、hnRNP K に依存しないグループについても解析を進め、miRNA サイレンシング複合体の構成因子である TNRC6A の選択的スプライシングに必要な SRp38 に依存した遺伝子群なども同定した。SRp38 は熱ストレスに応答したグローバルなスプライシング抑制において中心的な役割を果たすと考えられてきたが、熱ストレス応答性の選択的スプライシングにおいても数百遺伝子の制御を担うことが示唆された。

第四章において、本研究から得られた結果を総合し、熱ストレスに応答した遺伝子発現制御における選択的スプライシングの生理的役割に関して議論している。

本研究は、哺乳類細胞における熱ストレス応答性の広範な選択的スプライシング制御とその役割について新しい発見をなしており、細胞環境による遺伝子発現制御機構の理解に貢献する重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の山本 耕一は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。

学位審査申請に関する発表論文数　　1 編
参考論文　　4 編