

【要約】

修士課程優秀論文

RAGE mRNA選択的スプライシングの制御機構

Regulatory mechanism of alternative splicing of RAGE mRNA

金沢大学大学院医学系研究科  
血管分子生物学研究分野  
大江 和 代

【はじめに】

AGE-RAGE系

RAGE (Receptor for AGE)は、advanced glycation endproducts (AGE, 終末糖化産物)の細胞膜受容体として同定されたタンパク質である。AGEとはタンパク質が非酵素的に糖化・修飾されて生成する物質の総称であり、高血糖状態により過剰に形成されるAGEがその受容体であるRAGEと結合することにより引き起こされる細胞応答が、糖尿病血管障害を促進すると考えられている。

RAGEは分子量55kDaの一回膜貫通型のI型膜タンパクであり、細胞外領域に3つの免疫グロブリン様ドメインを持つ。そして最もN末端にある免疫グロブリン可変領域様ドメインにリガンド結合部位が存在する。RAGEの発現は血管細胞やマクロファージなど広汎な細胞・組織で認められている。近年、RAGEはAGE以外にも、アルツハイマー病脳に蓄積するβアミロイドタンパク、細胞接着に関わりがん転移との関連が指摘されているHMGB-1/amphoterin, 免疫系細胞から分泌され炎症のメディエーターと考えられているS100/calgranulinなどと結合することが明らかになり、糖尿病以外の様々な病態にも関与していると考えられるようになった。

RAGEのスプライスバリエント

最近、血管細胞が、前述の膜型RAGE以外に、選択的スプライシングによって生じる分泌型のRAGEタンパクを産生していることが見いだされた<sup>1)</sup>(図1)。膜型RAGEが、エクソン8に続いてエクソン9、エクソン10(細胞膜貫通領域を含む)、エクソン11というスプライシングによって生成するのに対し、分泌型RAGEはイントロン9の5'-スプライス部位(エクソン9とイントロン9との境界)が3'-側にシフトし、エクソン10をスキップしてエクソン11が続くようなスプライシングにより生成する。この分泌型RAGEタイプのスプライシングによってエクソン9の3'-側に付加された82bpの配列 (additional exon 9; AE9)中にストップコドン (UGA)が存在するため、膜貫通領域および細胞内領域を欠く分泌型RAGEが生成する。分泌型RAGEのカルボキシル末端はAE9に由来する特有の16アミノ酸配列を持つ。エクソン10のスキップは、イントロン9の長さが5'-スプライス部位のシフトにより哺乳類のイントロンに許される最短の長さより短くなることによって起こると考えられる。

分泌型RAGEは血管内皮細胞で発現しているのみならず、様々なヒト組織や循環血液中にも存在していることが確認されている<sup>2)</sup>。分泌型RAGEはリガンド結合部位を持つため、細胞外でリガンドを捕捉することで、リガンドと細胞膜に存在する

膜型RAGEとの結合を阻害し、結果的にRAGEを介する情報伝達を阻害しうる<sup>3)</sup>。糖尿病においては、膜型RAGEがAGEと結合することによって引き起こされる作用が血管障害を増悪する方向に働くのに対して、分泌型RAGEはこれを遮断することにより保護的に働こうと考えられ(図2)、実際、血中分泌型RAGE濃度と糖尿病網膜症の進行度との間に逆相関が見出されている<sup>4)</sup>。即ち、個々の患者の組織における膜型RAGEと分泌型RAGEの発現比は、糖尿病合併症などの病態において病変の進展に影響を与える重要な因子であると考えられる。

しかし、膜型RAGEと分泌型RAGEの発現比を決定するイントロン9の5'-スプライス部位シフトのメカニズムは全く不明である。そこで本研究では、RAGEの選択的スプライシングを再現できる最小要素から成るミニ遺伝子を構築し、RAGEの選択的スプライシングの制御機構を解析した。

ヒトRAGE遺伝子

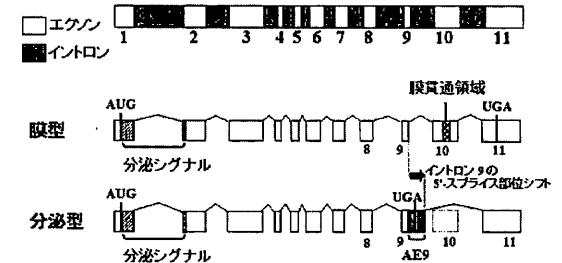


図1 ヒトRAGEのスプライスバリエント。膜型RAGEと分泌型RAGEをコードするmRNAバリエントはイントロン9の5'-スプライス部位選択により生成される。

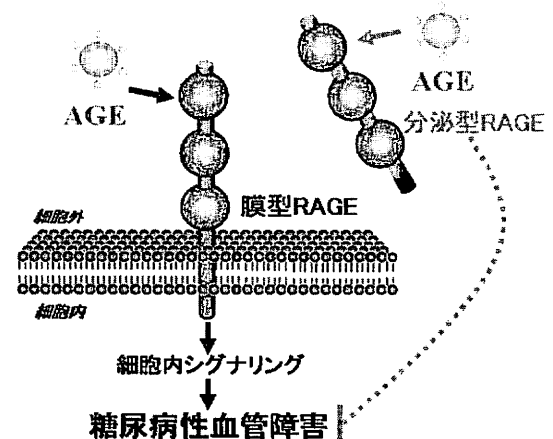


図2 分泌型RAGEの機能。分泌型RAGEはデコイ受容体としてリガンドを捕捉し、血管細胞を保護する。

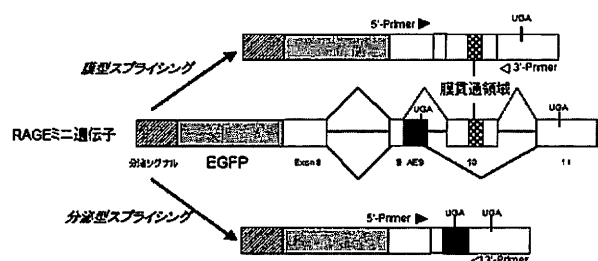


図3 構築したミニ遺伝子とそのスプライシング産物。中段にミニ遺伝子、上・下段に膜型・分泌型スプライシング産物とこれらの解析に用いたRT-PCRプライマーの位置を示す。

### 【結果および考察】

#### スプライシング産物の解析

pEGFP-N1ベクターを用いて、タグとして用いるEGFP (enhanced green fluorescent protein) 配列の上流にヒトRAGE分泌シグナル配列、下流にexon8以降のヒトRAGE遺伝子配列を組み込んだRAGEミニ遺伝子を作製した。これをヒト胎児腎臓由来細胞株HEK-293Tに導入後、total RNAを抽出し図3に示すプライマーを用いてRT-PCR反応で分析した結果、膜型RAGEタイプ及び、分泌型RAGEタイプの両タイプのスプライシング産物が確認された。従って、このミニ遺伝子は選択的スプライシングのモデル系となると評価された。

#### 変異導入による効果の解析

スプライシングに関与する因子が結合する可能性が報告されているプリン塩基の連続配列またはピリミジン塩基の連続配列に変異を導入したミニ遺伝子を数種類作製し、HEK-293Tに導入して選択的スプライシングの変化を観察した。その結果、一部の変異ミニ遺伝子では正常型ミニ遺伝子の選択的スプライシングと比較して、分泌型/膜型比が変化した。そこで、当該部位をRAGE選択的スプライシングにおける制御配列と考え、次に示す実験を行った。

#### RAGE選択的スプライシングにおけるhnRNP-Fおよび-Hの発現抑制または過剰発現の影響

先の実験で同定された制御配列に結合するタンパクをオンライン検索ツールにより検索した結果、SC35タンパク、hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)-F、hnRNP-HおよびhnRNP-Uなどが結合する可能性が示された。その中でも特に、Bcl-xのプリン塩基の連続配列に結合し5'-スプライス部位選択に関与していることが報告されているhnRNP-F、hnRNP-HについてRAGEの選択的スプライシングに及ぼす影響を検討した。hnRNPとは核内に豊富に存在し、pre-mRNAと複合体を形成し

て、mRNAへのプロセッシングや核外輸送に関わると推測されているRNA結合タンパク質群であり、hnRNP-FおよびhnRNP-Hを含め、約30の分子種が同定されている。

hnRNP-FおよびhnRNP-Hの発現抑制及び過剰発現を行い、正常型RAGEミニ遺伝子のスプライシングパターンがどのように変化するかを検討した。その結果hnRNP-FとhnRNP-Hを同時に発現抑制すると、分泌型/膜型比は減少する傾向が観察された。また、hnRNP-Fを単独で発現抑制しても明らかな変化は認められなかった。そこで、hnRNP-Hの過剰発現を試みたところ、分泌型/膜型比は有意に増大した。従って、hnRNP-Hが分泌型RAGEを生成する選択的スプライシングに促進的に働いていると推定された。

### 【結語】

本研究により、RAGEの選択的スプライシングに関わる複数のシス制御配列が同定され、また、hnRNP-Hが分泌型RAGEタイプのスプライシングに促進的に働く可能性が示唆された。しかし、hnRNP-Hが今回同定された制御配列に直接結合しているか否かは明らかではなく、また、hnRNP-H以外の調節因子が結合している可能性もある。それで今後は、electro mobility shift assayなどの実験手法を用いてトランス調節因子の同定を目指したい。

### 参 考 文 献

- 1) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Watanabe T, Yamamoto H. (2005) J. Pharmacol. Sci. 97, 305-11.
- 2) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. (2003) Biochem. J. 370, 1097-109.
- 3) Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, Watanabe T, Takano Y, Yamamoto H, Yamamoto Y. (2005) Mod. Pathol. 18, 1385-96.
- 4) Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, Matsuki H, Obata K, Hui L, Miura J, Osawa M, Uchigata Y, Iwamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H. (2006) Diabetes. Res. Clin. Pract. 73, 158-65.



### Profile

2005年3月 北陸大学薬学部衛生薬学科卒業  
 2006年9月 金沢大学医学系研究科修士課程修了  
 2007年 金沢大学医学系研究科博士課程在学中  
 趣味：Wii