

Mini Review

シグナル伝達経路を介した alternative splicing の誘導—その生物学的意義と制御メカニズム—

蒲池 誠*, 江口勝美

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 展開医療科学講座 (第1内科)

*連絡先: 蒲池 誠, 〒852-8501 長崎市坂本 1-7-1 長崎大学医歯学部附属病院. Tel: 095-849-7262, -7263 (大代表)

Alternative splicing through intracellular signaling pathways: The emerging importance of diversity and regulation in immune regulation

RNA splicing has two different processes: namely, constitutive and alternative splicing. The latter has now emerged as an important mechanism which produces a high degree of protein diversity at a low genetic cost. Importantly, alternative splicing generates functionally distinct products from the same apoptosis-related genes including Bcl-x, caspase-9, caspase-2, Fas and caspase-8. Furthermore, many genes in the immune system are alternatively spliced including CD45, CD44, CTLA-4 and ICAM-1, thus indicating that alternative splicing plays a critical role in both T-cell homeostasis and the activation-induced cell death (AICD). A critical issue in alternative splicing regulation is the specific recognition of the splice site, which mainly depends on the phosphorylation level of serine/arginine splicing factors (SR proteins). SR proteins are all subjected to phosphorylation and dephosphorylation on Ser residues within their RS domains. Their activities are tightly regulated by reversible phosphorylation. Recently, intensive efforts have been made to obtain new insight into how intracellular signaling regulates RNA splicing. This brief summary outlines both the mechanism and the role of alternative splicing through the intracellular signaling pathways.

Rec.5/24/2007, Acc.6/22/2007, pp575-578

Makoto Kamachi*, and Kastumi Eguchi

First Department of Internal Medicine Unit of Translational Medicine,
Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Key words RNA splicing, SR protein, SR protein kinase, caspase, Ser/Thr phosphatase

はじめに

RNA スプライシングは一つの遺伝子から一つの成熟 mRNA を生み出す constitutive splicing (恒常的スプライシング) と複数の成熟 mRNA を生み出す alternative splicing (選択的スプライシング) に分けられる。ヒトゲノム解析はヒト遺伝子数が約 22,000 個程度と予想外に少ないことを明らかにした。この事実は単一の遺伝子から複数の蛋白質を生み出すメカニズムが存在することを明示してお

り、このメカニズムの一つである alternative splicing に現在注目が集まりつつある。筆者らは RNA スプライシング制御因子である SR 蛋白質に注目し、SR 蛋白質のリン酸化と脱リン酸化による alternative splicing 制御と免疫制御における役割について報告してきた。本稿では alternative splicing の制御機構とシグナル伝達経路とのクロストークについて紹介する。

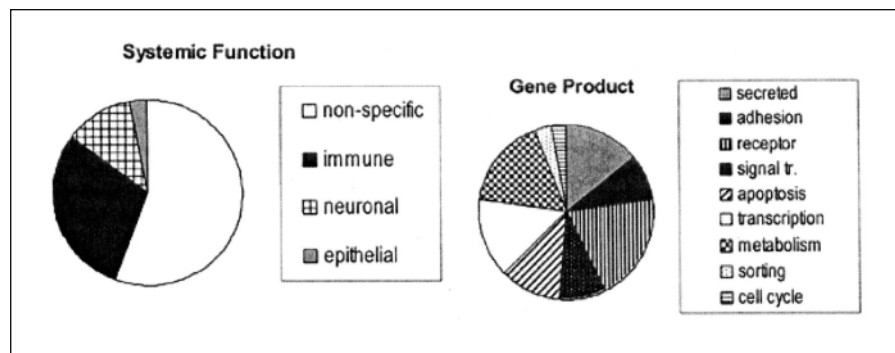


図1 alternative splicing を受ける遺伝子の機能分類(文献1より引用)

A: alternative splicing を受ける遺伝子を全身機能で分類したもの、B: alternative splicing を受ける遺伝子を分子機能で分類したもの。

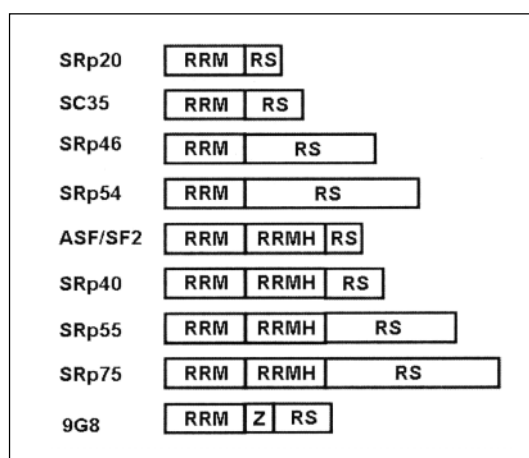


図2 ヒトSR蛋白質のドメイン構造(文献6を改変して引用)

SR蛋白質は1個ないし2個のRNA認識モチーフ(RRM)をN末端に持ち、ここでmRNAと結合する(RNA—蛋白質相互作用)。アルギニンとセリンの反復配列からなるRSドメインをC末端に持ち、ここで他のSR蛋白質等に結合する(蛋白質—蛋白質相互作用)。

Alternative splicing (選択的スプライシング) を受ける遺伝子の種類と機能

広範囲にわたるゲノム解析の結果alternative splicingは神経や免疫系など広義の“情報伝達プロセス”に関与することが報告されている⁷⁾。生理作用で分類すれば免疫系に関するものが約25%と最も多く、スプライスヴァリアントの分子機能別に分類すると細胞間シグナル伝達に関与する受容体、分泌型蛋白質が目立つ(図1)。特に免疫制御の中核をなすT細胞については蛋白質に翻訳されるスプライスヴァリアントがICAM-1, CD45, CD44, CTLA-4, CD95 (Fas)等について報告されている²⁾。さらにT細胞の分化、

増殖、機能の制御に関わるサイトカイン関連の遺伝子についてはIL-6, IL-15, IL-4R, IL-6R, IL-7RやMyD88等複数報告がなされている²⁾。CD45³⁾, CTLA-4⁴⁾はT細胞の活性化制御に関連する分子でいずれもT細胞の活性化によりalternative splicingが誘導される。CD45のalternative splicingの誘導はSR蛋白質の発現変化と関連性があり⁵⁾, CTLA-4のalternative splicingの誘導はSR蛋白質のhyperphosphorylationと関連性があることを筆者等は初めて報告した(蒲池 誠ら 2006年日本免疫学会総会 oral presentation)。次いでRNAスプライシング制御因子であるSR蛋白質について概説する。

SR蛋白質の構造と機能

RNAスプライシング制御因子であるSR蛋白質はN末端に1個あるいは2個のRNA認識配列(RRM), C末端にアルギニンとセリン残基に富むRSドメインを持つ(図2)⁶⁾。このセリン残基はSer/Thr kinaseあるいはphosphataseによってリン酸化、脱リン酸化される⁷⁾。このSer残基のリン酸化状態がシグナル伝達経路を介して変化するとRNAスプライシングが変わる。哺乳類のSR蛋白質リン酸化酵素にはSRPK (SR protein kinase), hPRP4 (human pre-mRNA processing mutant 4), Clk (Cdc-2 like kinase)などが同定されているが、これらのリン酸化酵素は一つの大きなファミリーを形成しており、いずれもSR蛋白質をリン酸化する保存領域 (conserved domain)を持つ。一方、セリン/アルギニンフォスファターゼはPP1, PP2A, PP2BおよびPP2Cに大別される。PP2B (カルシニューリン)はCa²⁺/カルモジュリン依存性に活性化されるフォスファターゼでシクロスポリンAとFK506で特異的に阻害される⁸⁾。SR蛋白質を脱リン酸化するフォスファターゼとしてPP1が報告されており、Chalfantと筆者がそれぞれBcl-x, caspase-9⁹⁾およびcaspase-2¹⁰⁾, Fas¹¹⁾のalternative splicingを報告した。

リン酸化制御機構には複数のメリットがある: 1)可逆的なこと、2)リン酸化基質のATPが細胞内には豊富に存

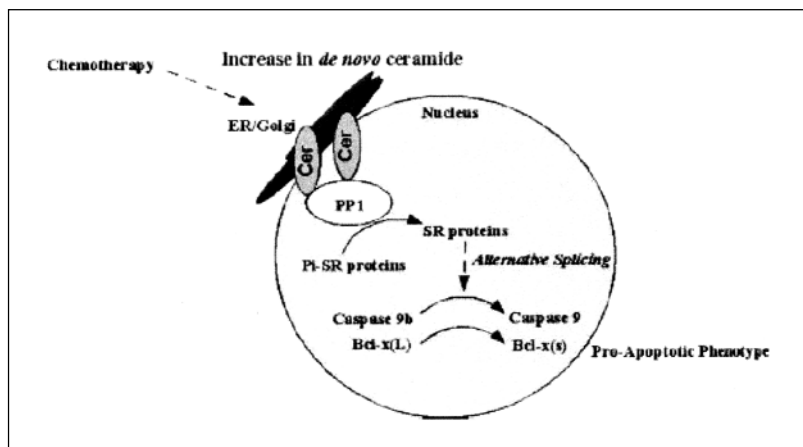


図3 シグナル伝達経路を介したBcl-xとcaspase-9の選択的スプライシング(文献8より引用)

セラミド合成に続いてフォスファターゼPP1が活性化しSR蛋白質を脱リン酸化してBcl-x, caspase-9のRNAスプライシングを変化させる。

在すること, 3)1個のリン酸基の付加によって比較的大きな構造変化が期待できること, 4)新たな転写を必要としないので蛋白質が機能している場所で瞬時に構造変化を誘導できること. アセチル化, メチル化, シトルリン化などリン酸化以外の翻訳後修飾 (post-translational modification) の意義が解明されつつあるが, 蛋白質リン酸化酵素のファミリーだけが圧倒的な多様性を持つことは上記の分子のメカニズムに関連していると推察される。

RNAスプライシング過程とその制御メカニズム

1)恒常的スプライシング(constitutive splicing)

イントロンを取り除いて前後のエクソンを結合させる反応がRNAスプライシングである。イントロンとエクソンの境界 (スプライス部位) のRNA配列は, 5'側は必ずGTで始まり, 3'側はAGで終わる¹²⁾。このスプライス部位の周辺には比較的保存性の高い領域が存在し, それらがスプライス部位認識シグナルとして機能している。出芽酵母では保存性が高いがより進化した脊椎動物の場合では保存性が低く, RNAスプライシング研究ではSR蛋白質/スプライスサイトからのアプローチを困難にしている。スプライシング反応は2段階のエステル転移反応 (transesterification) が中心となる¹³⁾。このエステル転移反応自体は比較的単純な制御機序に従うため, スプライシング反応全体の進行はRNA-RNA結合, RNA-蛋白質結合などの相互作用に依存する。この相互作用を大きく左右する因子はRNA-RNA, RNA-蛋白質の空間配置と考えられている。SR蛋白質の

リン酸化状態は蛋白質表面の電荷分布を介して空間配置に影響する¹⁴⁾。

2)選択的スプライシング(alternative splicing)

選択的スプライシングとは1種類の遺伝子から複数の成熟mRNAを生み出す過程を指す。脊椎動物ではスプライス部位の保存性が高くないのでスプライス部位の信号配列の選択に自由度が生じて選択的スプライシングが可能となる。5'と3'側のスプライス部位の選択にはU1-snRNP (U1-small nuclear RNP)とU2-snRNPが関与する。スプライス部位の配列に依存してU-snRNPがスプライス部位を認識する“強さ”に差異が生じ, 最も強く選択されたスプライス部位でRNAスプライシングが進行して選択的スプライシングが生ずる。

シグナル伝達経路とのクロストーク

RNAスプライシングパターンを変化させる刺激は抗原刺激以外にもサイトカイン, ホルモン, 成長因子, ストレス等多岐に渡る。下流で活性化するシグナル伝達経路にはPI3K, Ras, Caイオンを介する経路があり, スプライシング制御因子とのクロストークについてはまだ不明な点が多い。インスリン刺激, T細胞受容体のクロスリンクで誘導されるPKC β とCD44のRNAスプライシングパターン変化ではいずれもスプライシング因子のリン酸化が関与する^{15,16)}。最近解明が進んでいるのがアポトーシス関連遺伝子のRNAスプライシング制御である。ChalfantらはA549細胞株で細胞内のセラミドレベルの上昇に伴いSR蛋白質のSer残基を脱リン酸化するprotein phosphatase (PP1)が活性

化し, Bcl-x の RNA スプライシングパターンが変化することを報告した (図3) ⁹⁾. 筆者らも U937 細胞株で caspase-2¹⁰⁾, Fas¹¹⁾, ヒトリンパ球で TRAIL, caspase-8 で PP1 の活性化が RNA スプライシングパターンを変えることを報告した¹²⁾ (蒲池 誠ら 2004 年 第 25 回日本炎症・再生医学会 優秀演題). さらに caspase-8 の RNA スプライシングについて, 1) SR 蛋白質のリン酸化と脱リン酸化により拮抗的に制御されており, 2) ヒト T 細胞の活性化に伴い SR 蛋白質の hyperphosphorylation が生じて alternative splicing が抑制され, 3) 蛋白質レベルで splice variant の発現が減少し caspase-8, -3 の active form が生み出されることを報告した (蒲池 誠ら, 2006 年 第 27 回日本炎症・再生医学会).

おわりに

Alternative splicing は外的刺激に対応して遺伝子発現を調節していると考えられるが, そのシグナル伝達経路は多岐に渡り RNA スプライシングとのクロストークについては不明の部分が多い. 今後チャレンジングな研究が alternative splicing の調節作用の生理的意義やその調節不全が炎症性疾患, 自己免疫疾患でどのような病態的意義を持つかを明らかにすると期待される.

文 献

- 1) Modrek B, Resch A, Grasso C, Lee C: Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes. *Nucleic Acids Res*, 29: 2850-2859, 2001.
- 2) Lynch KW: Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4: 931-940, 2004.
- 3) Hermiston ML, Xu Z, Weiss A: CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21: 107-137, 2003.
- 4) Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J: A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*, 24: 65-97, 2006.
- 5) ten Dam GB, Zilch CF, Wallace D, Wieringa B, Beverley PC, Poels LG, Screaton GR: Regulation of alternative splicing of CD45 by antagonistic effects of SR protein splicing factors. *J Immunol*, 164: 5287-5295, 2000.
- 6) Graveley BR: Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6: 1197-1211, 2000.
- 7) Kamachi M, Le TM, Kim SJ, Geiger ME, Anerson P, Utz PJ: Human autoimmune sera as molecular probes for the identification of an autoantigen kinase signaling pathway. *J Exp Med*, 196: 1213-1225, 2002.
- 8) Feske S, Okamura H, Hogan PG, Rao A: Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun*, 311: 1117-1132, 2003.
- 9) Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, Hannun YA: De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*, 277: 12587-12595, 2002.
- 10) Iwanaga N, Kamachi M, Aratake K, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K: Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. *J Lab Clin Med*, 145: 105-110, 2005.
- 11) Aratake K, Kamachi M, Iwanaga N, Kawasaki E, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, Tamai M, Arima K, Nakamura H, Origuchi T, Kawakami A, Eguchi K: A cross-talk between RNA splicing and signaling pathway alters Fas gene expression at post-transcriptional level: Alternative splicing of Fas mRNA in the leukemic U937 cells. *J Lab Clin Med*, 146: 184-191, 2005.
- 12) Breathnach R, Chambon P: Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, 50: 349-383, 1981.
- 13) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR: Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, 3: 285-298, 2002.
- 14) Kramer A: The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 65: 367-409, 1996.
- 15) Konig H, Ponta H, Herrlich P: Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator. *EMBO J*, 17: 2904-2913, 1998.
- 16) Patel NA, Chalfant CE, Watson JE, Wyatt JR, Dean NM, Eichler DC, Cooper DR: Insulin regulates alternative splicing of protein kinase C beta II through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway involving the nuclear serine/arginine-rich splicing factor, SRp40, in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*, 276: 22648-22654, 2001.
- 17) Kamachi M, Aramaki T, Tanimura S, Ichinose K, Fujikawa K, Iwamoto N, Yoshizaki A, Ida H, Kawakami A, Kohno M, Eguchi K: Activation of protein phosphatase causes alternative splicing of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): Potential effect on immune surveillance. *BBRC*, 2007 in Press.