

Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) 新規 ASV の発見

荒木 章伍*¹, 久富 寿*²

Expression of Hypoxia-inducible factor1 alpha splice variants in human cell lines

Shogo ARAKI*¹, Hisashi HISATOMI*²

(Received March 21 2013)

1. 背景

正常組織と比較し、がん組織では酸素供給量の減少が報告されている。低酸素状態の細胞では血管新生や細胞増殖に関与する遺伝子の誘導が惹起され、結果としてがんの浸潤、転移が誘発される。その遺伝子誘導には低酸素誘導因子であるHypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) が関与している¹⁾。HIF-1 α は通常酸素分圧においてユビキチン-プロテアソームによる分解を受け、タンパク質発現がほとんど確認されない。しかし低酸素状態の細胞においてはHIF-1 α の分解が抑制され、HIF-1 β とヘテロ二量体を形成して標的遺伝子の転写を誘導する。

ヒトHIF-1 α は14q23に位置し、52859 bpのHIF-1 α 遺伝子からFull Length isoformであるisoform1と、alternative splicing variants (ASVs)として精巣特異的な発現を示すisoform1.2、さらにT cell特異的な発現を示すisoform1.3が転写される²⁾。我々はヒトがん細胞株においてHIF-1 α の3種目のASVを発見したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 細胞培養

ヒト胃癌細胞株AZ521細胞を10% Fetal Bovine Serum (FBS)、0.1 mM Non-Essential Amino Acids (GIBCO)を添加したD-MEM培地(GIBCO)を用い、37°C、5% CO₂条件下で培養した。

2.2 RT-PCRによるHIF-1 α ASVの検出

培養細胞からIsogen (NIPPON GENE)を用いてtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNA 100 ngを、

Reaction mixture (1 \times Reaction buffer, 5 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 25 μ M Random primer, 6.4 U / μ L M-MLV RTase, 0.32 U / μ L RNase Inhibitor)に添加し、37°C、1時間反応させ、cDNAを合成した。

合成したcDNA 1 μ LをPCR mixture (1 \times PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 0.6 pM Forward primer, 0.6 pM Reverse primer, 0.02 U / μ L Paq5000TM DNA polymerase)に添加し、95°C/5min、その後95°C/30sec、62°C/30sec、72°C/30secを1サイクルとし、40サイクルPCR反応を行った。反応終了後、PCR増幅産物を2%アガロースゲルに供し、電気泳動を行った。エチジウムブロマイド染色したPCR増幅産物をUVトランスイルミネーターにより確認した。

3. 結果

RT-PCRの結果、目的のPCR増幅産物より短いPCR増幅産物が確認された。そこで短いPCR増幅産物に特異的なprimerを設定し、RT-PCRを行った結果exon5が欠失したASVの存在が示唆された(Fig.1)。

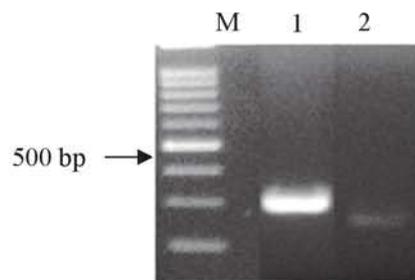


Fig.1 HIF-1 α mRNAのRT-PCR結果

M, Size Marker; 1, HIF-1 α Full Length mRNA;
2, HIF-1 α ASV mRNA

*¹: 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

*²: 物質生命理工学科教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

また、大腸癌、膀胱癌、直腸癌細胞株より抽出したRNA

をASVに特異的なprimer setを用いてRT-PCR法を行った結果、各種癌細胞株においてもexon5が欠失したASVの存在を確認した。

4. 考察

RT-PCR法の結果より、exon5が欠失したHIF-1 α mRNAを発見した。さらに、各種癌細胞株においてexon5が欠失したASV mRNAの存在を確認した。各種癌細胞株ではASV mRNAの発現量に差異が確認された。したがって、今回発見したASV mRNAはヒト由来がん細胞において、普遍的に存在する可能性が示唆された。

exon5が欠失したHIF-1 α mRNAではフレームシフトによりアミノ酸の読み枠がずれ、アミノ酸数がFull Length isoformでは826 aa、ASV isoformでは76 aaと推測された。したがって、タンパク質の分子量の理論値はFull Length isoformでは93 kDa、ASV isoformでは9 kDaと推測された。ASV isoform mRNAは転写の過程でsplicing errorとして産生される可能性がある。本来、splicing errorで生じるmRNAは細胞内でnonsense-mediated mRNA decay systemにより選択的に分解される³⁾。しかし、このsystemからの回避し、発現が確認されたHIF-1 α ASV mRNAの存在は、単なるsplicing errorによる産生ではなく、癌細胞において存在意義のあるASVの可能性はある。

しかし、HIF-1 α ASV mRNAから翻訳されるタンパク質の検出には未だ成功していない。HIF-1 α のタンパク質は通常酸素分圧で培養された細胞において酸素依存的な分解を受け、Full Length isoformタンパク質の発現さえ確認できない。そのため、酸素濃度を調節できるインキュベーターの使用や真空環境における細胞培養、細胞が凝集し中心部分の酸素供給量の減少が推測される三次元培養などを用いて、今回発見したASVのタンパク質発現を確認する必要がある。

尚、本ASV mRNAはGene Bank Accession No.AB733094に登録された。

参考文献

- 1) Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 2006;70:1469-80.
- 2) Lukashey D, sitkovsky M. Preferential expression of the novel alternative isoform I.3 of hypoxia -inducible factor 1alpha in activated human T lymphocytes. *Hum Immunol*. 2008;69:421-5.

- 3) Green RE, Lewis BP, Hillman RT, *et al*. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics*. 2003;19:i118-21.