

平成22年 3月31日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20013020
 研究課題名（和文） 細胞死制御分子が細胞がん化・細胞増殖制御に機能する分子機構解析
 研究課題名（英文） Regulation of transformation and cell growth
 by molecules controlling cell death
 研究代表者
 米原 伸 (YONEHARA SHIN)
 京都大学・大学院生命科学研究科・教授
 研究者番号： 00124503

研究成果の概要（和文）：細胞分裂期の染色体凝縮異常によって生じる二核四媒体細胞にアポトーシスとは異なる新しい細胞死が誘導されること、この新規細胞死がタンパク質の翻訳伸張因子である eEF1A1 の発現抑制によって誘導されることを示した。また、eEF1A1 の発現抑制が mRNA の安定性低下と翻訳抑制の二つの原因により生じ、それには eEF1A1 mRNA の非翻訳領域に存在する 5'-TOP という構造が必要であることを示した。

研究成果の概要（英文）： We show that tetraploid cells induced by impaired mitotic chromosomal condensation are eliminated by a novel type of cell death different from caspase-dependent apoptosis. The cell death was executed by the downregulation of eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1), a typical housekeeping gene products. The downregulation of eEF1A1 expression was shown to be induced by both destabilization of its mRNA and its translational inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,000,000	0	8,000,000
2009 年度	8,000,000	0	8,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞死、遺伝子、癌、細胞・組織、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスと呼ばれる細胞死誘導シグナルが、caspase と呼ばれるプロテアーゼの活性化によって誘導されるという実体（分子機構と制御機構）が明らかとなってきた。こ

のにより、細胞死の研究は新しい局面に入ったといえる。このような状況をふまえ、我々は、caspase に依存しない新しい細胞死の分子機構と生理機能を解明する研究を開始し、細胞がアポトーシスに陥るか、生存し

続けるかを振り分ける分子機構と生理機能を解明する研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、1) 染色体の凝縮異常によって誘導される四倍体(二核)細胞が、caspaseに依存しない新しい細胞死によって除去される分子機構と生理機能を明らかにすることを目的とする。M期の異常を持つ細胞がM期を脱出し四倍体細胞として次の間期に突入すると、染色体が不安定化し、細胞のがん化につながると報告されている。このような細胞に典型的なハウスキープ遺伝子産物 eEF1A1 (EF-1 α)の発現抑制によって細胞死が誘導されることを見いだしているため、その発現抑制の分子機構を明らかにすることを目的とする。また、eEF1A1 遺伝子の強発現トランスジェニックマウスを作製し、この新規細胞死が発がんに関わるかを明らかにする。

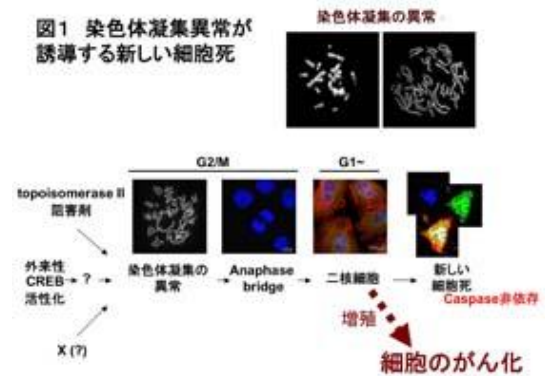
3. 研究の方法

新規細胞死は eEF1A1 の発現抑制によって誘導されるが、これが翻訳抑制によること、その翻訳抑制には 5' -TOP 構造を有する eEF1A1 mRNA への CNBP の結合が必要であることを、CNBP 特異的 shRNA の発現実験等によって明らかにする。さらに、その翻訳抑制の機構として mRNA の P body への移行が関連することを、eEF1A1 mRNA を FISH 法で検出することによって示す。さらに、レンチウイルスベクターを用いて eEF1A1 の過剰発現や CNBP の発現抑制を種々の細胞株に実施し、これらによって二核細胞の出現頻度が増加するかを解析する。また eEF1A1 のトランスジェニックマウスを作製することによって個体レベルでの発がん性が高まるかを解析する。これらの研究によって、この新規細胞死の発がんとの関連、また生理的意味を明らかにする。

4. 研究成果

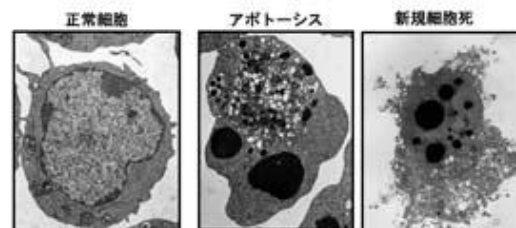
(1) 染色体の凝縮異常によって生じる二核細胞に誘導される新規細胞死

これまで、染色体の凝縮異常を誘導した細胞が細胞分裂期を経て二核四倍体となり、次の細胞周期に突入すると、caspase に依存しない新規細胞死に陥ることを示してきた。また、このような染色体凝縮異常は、外来性 CREB の強発現や DNA topoisomerase II の阻害剤である ICRF-193 の処理等によって誘導してきた。この新規細胞死に陥る状態の二核四倍体細胞は染色体が不安定化しており、そのまま増殖するとがん化することが知られている極めて危険な細胞である。そのようながん化に向かう危険な細胞が、『染色体凝縮異常誘導→アナフェーズブリッジ形成→二核四倍体細胞出現→細胞周期の進行→ハウスキープ遺伝子産物 eEF1A1 (EF-1 α)の発現抑制→新規細胞死誘導』という経路で細胞が除去されることを示してきたのである(図1)。なお、eEF1A1 の減少が新規細胞死の原因であることは、外来生 flag-eEF1A1 の発現(レンチウイルスベクターを用いて内性の eEF1A1 の発現量に相当する量の発現)によって細胞死が抑制されることによって証明した。



さらに、この細胞死がアポトーシスと異なっていることを、形態学的にも明らかにした(図2)。アポトーシスとは、透過型電子顕微鏡による形態学的観察から定義されたものであり、形態学的解析は意味があるものと考えられた。

図2 新規細胞死の形態学的特徴はアポトーシスとは異なっている

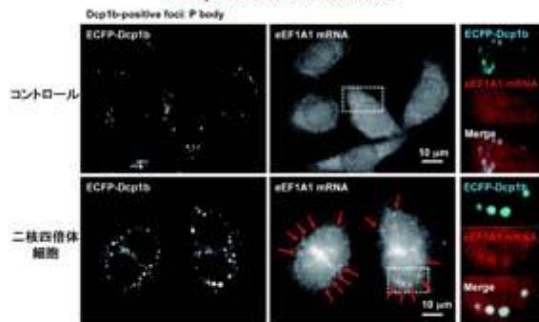


アポトーシス (Fas 刺激によって誘導した) では、核が分断し、分断化した核全体が染色体の凝縮により黒くなっている。一方、新規細胞死では、染色体の凝縮によると考えられる黒くなった塊が認められるが、これは核内でいくつかの塊として観察され、アポトーシスの核とは大きく異なっている。また、細胞質の様子もアポトーシスとは異なっており、明らかに異なった種類の細胞死であることが示された。

(2) eEF1A1 の発現抑制は mRNA の P body への移行が関連する。

次に、eEF1A1 の発現抑制が誘導される分子機構の解析を行った。eEF1A1 の発現抑制は翻訳抑制によって誘導されることを示してきたが、このときの eEF1A1 mRNA の局在を蛍光 in situ hybridization 法によって解析した (図 3)。二核四倍体化を誘導していない細胞では eEF1A1 mRNA は細胞内に拡散して存在し、特徴的な局在は示さなかった。一方、二核四倍体化を誘導した細胞では eEF1A1 mRNA が細胞質にフォーカスを形成している様子が観察され、そのフォーカスは mRNA 分解や翻訳抑制の場として知られている P ボディ (Processing body) のマーカーである Dcp1b と共局在していた。以上の結果から、二核四倍体化した細胞における eEF1A1 の発現減少は、eEF1A1 mRNA が P ボディに局在化することによって分解あるいは翻訳抑制を受けることで誘導されると示唆された。

図 3 CREB-ER活性化によって誘導された二核細胞では eEF1A1 mRNA が processing body (P body) に集積する



(3) 新規細胞死は二核四倍体の異常細胞の除去に関わっている。

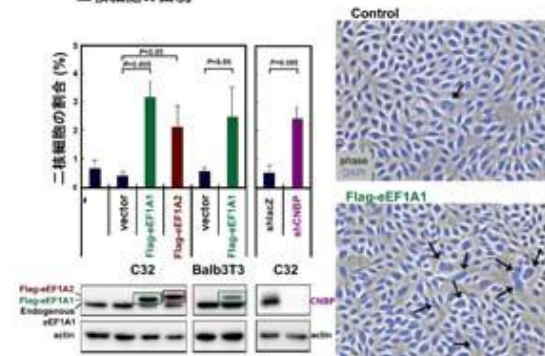
このような新規細胞死が導かれる二核四倍体細胞は、外来性 CREB の強発現や DNA topoisomerase II の阻害剤である ICRF-193

の処理によって作製してきたが、このような異常な細胞は通常の培養条件下でも生じているのか、我々が見いだした新規細胞死誘導機構によって、そのような異常な細胞は除去されているのかが問題である。

研究室で通常に培養している細胞株において M 期中期染色体伸展標本 (metaphase chromosome spread) を作製して解析したところ、4.6% の細胞で染色体の凝縮異常が認められた。一方、二核となった細胞は全体の 1% 以下しか存在しなかった。このような結果は、通常の培養条件下においても染色体の凝縮異常によって二核四倍体となる細胞はかなりの高頻度で出現していることを示唆している。そして、このような自然に生じた二核四倍体細胞には、我々が発見した新規細胞死が誘導されている可能性が考えられた。

そこでレンチウイルスベクターを用いて、外来性 eEF1A1 や eEF1A2 の発現や CNBP の発現抑制を実行し、このような新規細胞死を阻害する条件下に細胞を培養した。実際にはベクター感染から二週間、細胞を培養した後に、二核となっている細胞数の割合を測定した。その結果、外来性 eEF1A1 や eEF1A2 の発現や CNBP の発現抑制によって、二核細胞の出現頻度が有意に上昇することが明らかとなった (図 4)。これらの結果は、普通に増殖している細胞においても二核四倍体細胞は常に出現しているが、このような異常な細胞の除去に我々の見いだした新規細胞死誘導機構が関わっていることを示していると考えられた。

図 4 四倍体細胞に誘導される新規細胞死の抑制条件下での二核細胞の出現



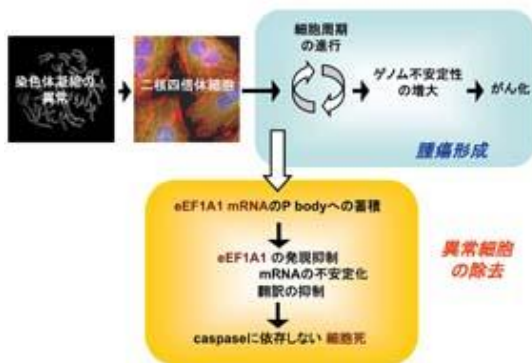
(4) まとめと今後の展望

我々が見いだした caspase に依存しない新規細胞死は、染色体の凝縮異常によって誘導

される二核四倍体細胞に引き起こされるが、その分子機構はCNBPが関わるeEF1A1の発現抑制によることを示してきた。そして、このような新規細胞死誘導機構が普通に増殖している細胞において自然発生する二核四倍体細胞の除去に関与していることを示唆することができた(図4)。また、eEF1A1の発現抑制は、通常はポリゾームを形成しているeEF1A1 mRNAがPボディ(mRNAの分解や翻訳抑制を実行する場として知られている)へ局在化することによって誘導されることが示唆された(図3)。

現在、この細胞死誘導機構が発生や発がんに関わるかを生体レベルで明らかにすべく、外来性eEF1A1の強制発現を誘導できるマウスを作製して解析を行っている。そして、新たな発がんモデル系を提出したいと考えている(図5)。

図5 異常な二核四倍体細胞の除去機構



また、CNBPがどのような分子機構でeEF1A1の翻訳抑制またはeEF1A1 mRNAのPボディへの集積に関与するのかを明らかにしていく必要がある。これらの研究によって、本ゲノムネットワークプロジェクトで発見し解析を行ってきた「染色体の凝縮異常によって生じる二核四倍体に誘導される新規細胞死」の分子機構と生理機能の全体像を提示することができることを期待している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kobayashi Y, and Yonehara S. Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids. *Cell Death Differ*, 16; 139-150, 2009.

2. Kiriya M, Kobayashi Y, Saito M, Ishikawa F, and Yonehara S. Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase. *Mol Cell Biol*, 29: 4742-4756, 2009.

3. Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, Saito M, and Isikawa F. RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway. *Mol Cell*, 36, 193-206, 2009.

[学会発表] (計5件)

1. Shin Yonehara. "Novel cell death by downregulation of eEF1A1 expression in tetraploids" The 5th NTU-Kyoto U Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology. Kyoto, May 23, 2009.

2. Shin Yonehara. "Physiological roles of Fas" Independent Symposium: Future Prospective New Drug, MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 23-26, 2008.

3. Shin Yonehara. "Novel types of cell death identified in 1989 and 2008" Argenes Sponsored Symposium: Apoptotic Therapy in RA, MEDICAL-EXPO 2008 in APLAR's World: The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology, Yokohama, September 23-26, 2008.

4. Shin Yonehara. "Novel caspase-independent cell death by downregulation of eEF1A1/EF-1 α expression in tetraploids with chromosomal aberrations" The 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Seoul, Korea, July 20-23, 2008.

5. 米原 伸: 「Death Receptor Fas と自己免疫疾患・炎症」、第29回日本炎症・再生医学会シンポジウム「アポトーシスは炎症の終息と再生の始まりである」、東京都、7月9日、2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 細胞増殖抑制剤及びそのスクリーニング法

発明者: 京都大学大学院生命科学研究科 教授 米原 伸 他3名

権利者: 同上

種類: 特許出願 (国内)

番号: 特願 2009-052628

出願年月日：2009年3月5日
国内外の別：国内出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米原 伸 (YONEHARA SHIN)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：00124503