

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700348

研究課題名（和文）

生体内 CRIP 法を用いた RNA 結合蛋白質 Musashi の翻訳制御標的遺伝子探索

研究課題名（英文）

Identification of target RNAs for neural RNA binding protein Musashi1

研究代表者

今井 貴雄（TAKAO IMAI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 10383712

## 研究成果の概要：

神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi1 の標的 RNA を生化学的な手法を用いて精製し同定する試みを行った。その結果、神経幹細胞においては蛋白質発現が非常に弱い神経細胞へと分化するに伴って蛋白質発現が上昇して機能する遺伝子の mRNA が Musashi1 の標的 RNA として新たに同定された。Musashi1 はその遺伝子の mRNA に対し、Musashi1 結合配列を介して翻訳を抑制することが試験管内の実験により明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：分科（神経科学） 細目（神経化学・神経薬理学）

キーワード：分子・細胞・神経生物学・翻訳制御

## 1. 研究開始当初の背景

Musashi 蛋白質は、進化的に高度に保存された RNA 結合蛋白質であり、神経系幹細胞を含む神経系の前駆細胞に発現している。研究代表者はこれまでに、Musashi1 蛋白質（以下 Msi1）が (G/A)UnAGU (n=1-3) を有する RNA に結合すること、下流標的 RNA の翻訳を抑制することを発見し、RNA 結合蛋白質 Msi1 の機能を明らかにしてきている (Imai et al., *Mol Cell Biol* 2001)。

また、下流標的遺伝子の一つとして *m-numb* を同定、*m-numb* mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に Msi1 は結合し、同遺伝子の翻訳を抑制することによって、Notch signal を亢進させて細胞の未分化性、増殖活性に寄与していることを明らかにしている (Imai et al., *Mol Cell Biol* 2001)。一方、ショウジョウバエの Musashi は、下流標的遺伝子の一つの *tramtrack69* の 3' 非翻訳領域に結合して翻訳を抑制し、

この翻訳抑制が神経系二次前駆細胞 (I1b) の細胞分化運命を決定することを明らかにしている (Okabe et al., *Nature* 2001)。

近年、研究代表者らは、Msi1 が下流標的の遺伝子に対して起こす翻訳抑制の機能がどのようなメカニズムによって引き起こされるかについて、生化学的な免疫沈降実験を用いて蛋白質複合体の中における Msi1 の位置を探ることで明らかにした。その詳細は、Msi1 が下流標的の mRNA に結合していると同時に poly(A) binding protein1 (PABP1) に結合し、PABP1 が翻訳開始因子 eIF4G に結合する相互作用を阻害する働きを有することであった。PABP1 が eIF4G に結合することは、5' cap 複合体と mRNA の poly(A) tail が近接することを意味するが、この近接がうまく作用しないと、cap 依存的な翻訳の開始課程のうち、eIF4G と eIF4E (5' cap 結合蛋白質) との結合、eIF4G と eIF4A との結合、40S ribosome subunit の複合体への参加、60S ribosome subunit の複合体への参加が効率的に起こらないことが示されている (Kahvejian et al., 2005)。

研究代表者のこれまでの研究、とりわけ 2001 年に報告した 2 報の論文 (Imai et al., *M.C.B.* 2001; Okabe et al., *Nature* 2001) が先駆けになり、多くの海外の研究者による Msi1 についての研究が行われることになった。ショウジョウバエの精巢の幹細胞の性質に必須であることが示され (Siddall NA et al)、特に Battelli et al と Charlesworth et al の 2 論文には、Imai et al., *M.C.B.* 2001 の情報を元にして新たに *p21*, *c-Mos* を脊椎動物の Msi1 の下流標的の遺伝子と同定し、Msi1 が翻訳抑制を行っていることを示す同様の実験結果が示されている。

## 2. 研究の目的

配列特異的な RNA 結合ドメインを有する Msi1 は poly(A) を有する mRNA の翻訳も抑えてしまうという細胞にとっての危険因子ではなく、特異的に結合する mRNA の翻訳抑制を行う因子であると考えられる。したがって、Msi1 が翻訳制御する遺伝子群の

profile を知ることは、Msi1 が発現する神経幹細胞の性質を知ることにつながると考え、本研究の目的とした。Msi1 の下流標的の遺伝子を知り神経幹細胞における翻訳制御 profile を知るには、結合配列の有無を指標に 1 遺伝子ごとに翻訳調節の有無を調べるこれまでの手法は多くの時間を要し、効率的ではないので、神経系の Msi1 が発現している神経幹細胞を含む細胞群において発現する Msi1 の下流標的の遺伝子を網羅的にスクリーニングする方法について、至適な方法を模索開発し、Msi1 による翻訳制御遺伝子を同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Msi1 特異的であり、かつ効率的な免疫沈降が可能な抗体を作出するために、バキュロウイルス膜上に Msi1 の C 末端側の 50 アミノ酸を露出させ、そのウイルスをマウスへの免疫し、その後のハイブリドーマ選択を行った。内在性の Msi1 蛋白質を精製濃縮できる抗体を免疫沈降法およびウェスタンブロット法で選択した。その抗体を使って、Msi1 RNA 複合体を精製濃縮する手法として、CLIP 法 (Cross linking immunoprecipitation)、In vitro virus 法、RIP-Chip (RNA immunoprecipitation Chip) 法があったが、当初申請書で記した CRIP 法は困難であったため、In vitro virus 法を用いて、Msi1 と相互作用する RNA の探索を行った (慶大理工学部柳川研究室と共同)。

## 4. 研究成果

RNA 結合蛋白質 Msi1 を特異的に認識する 32 種のモノクローナル抗体を、バキュロウイルス膜上露出法によるマウスへの免疫とその後のハイブリドーマ選択によって得た。次に、外来的に遺伝子導入して発現させた Msi1 蛋白質を特異的に免疫沈降可能なモノクローナル抗体を 32 種の内より 10 種選別した。さらに、P19 細胞に発現している内在性の Msi1 蛋白質を効率よく免疫沈降できるモノクローナル抗体を、10 種の抗体の中から 2 種を選別した。Msi1 の標的 RNA を免疫沈降法で効率的に採取可能なモノクローナル抗体を得ることに成功した (東大先端研・分子生物学部門の浜窪教授・望月准教授との共同で

行った)。

Msi1 標的 RNA 複合体の濃縮精製を行い、標的 RNA の同定を行う件であるが、計画に記した生体内 CRIP 法による蛋白質-RNA 複合体の濃縮が困難であったため、代替法として *in vitro* virus 法 (以下 IVV 法、慶大・理工学部・柳川教授らと共同) と特異的抗体による免疫沈降を組み合わせた手法を採択することにより遂行した。

無細胞翻訳系で翻訳して精製した Msi1 蛋白質と胎生期 12 日目マウスの終脳領域由来ライブラリを使用して Msi1 蛋白質の免疫沈降と IVV 法による Msi1 親和性分子の検索を行ったところ、幼弱神経細胞に発現しており細胞の移動に参与する遺伝子(X)の mRNA, 他 3 種 mRNA のいずれも 3' UTR が Msi1 親和性 RNA として同定された。

Msi1 蛋白質がこれらの mRNA に結合すること、さらに、Msi1 がその結合部位を有する RNA の翻訳を抑制することが培養細胞を用いた系で明らかになった。これらより、神経幹細胞において、Msi1 が X 遺伝子の mRNA の翻訳を抑制し、神経幹細胞において細胞の移動能を制限していることを示唆する結果を得た。

#### 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 1 件)

(1) Kawahara H, Imai T, Imataka H, Tsujimoto M, Matsumoto K, Okano H. Neural RNA binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *Journal of Cell Biology* 181, 639-6532, 2008, 査読有り

[学会発表](計 11 件)

(1) 今井貴雄、河原裕憲、河瀬聡、岡野栄之、RNA 結合蛋白質 Musashi1 の let-7 miRNA 機能発現に対する制御、4P-0719 (BMB2008; 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会) 2008 年 12 月 12 日神戸ポートア

일랜드

(2)

Hironori Kawahara, Takao Imai, Hiroaki Imataka, Masafumi Tsujimoto, Ken Matsumoto, Hideyuki Okano, Neural RNA binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. 4P-0735 (BMB2008; 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会) 2008 年 12 月 12 日神戸ポートアイランド

(3)

樋口敬介、永田崇、河原裕憲、今井貴雄、岡野栄之、片平正人、Musashi タンパク質と PABP の相互作用の解析、3P-0086 (BMB2008; 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会) 2008 年 12 月 11 日神戸ポートアイランド

(4)

Satoshi Kawase, Takao Imai, Chikako Hara, Hideyuki Okano. Analysis of transcriptional regulation of musashi1 gene in neural stem cells. 2P-1080 (BMB2008; 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会) 2008 年 12 月 10 日神戸ポートアイランド

(5)

大山貴子、永田崇、古川亜矢子、杉山孝司、真鶴司、今井貴雄、岡野栄之、山崎俊夫、片平正人 ロングレンジの距離情報に基づいたマルチドメイン蛋白質 Musashi 1 と標的 RNA の複合体の構造解析 0-19 第 10 回日本 RNA 学会年会 2008 年 7 月 23 日札幌市・札幌コンベンションセンター

(6)

今井貴雄、菅田浩司、河原裕憲、河瀬聡、岡野栄之 Musashi 蛋白質の RNA 結合能と翻訳抑制の翻訳後制御 (Posttranscriptional regulation of Musashi1 RNA binding

activity and its translational control.)  
P2-d20. 第31回日本神経科学大会  
(Neuroscience2008) 2008年7月10日 東京  
国際フォーラム

(7)

河瀬聡、今井貴雄、原央子、岡野栄之 神経  
幹細胞における *musashi* 遺伝子の転写制御解  
析 (Analysis of transcriptional  
regulation of *musashi1* gene in neural stem  
cells.) P2-d08. 第31回日本神経科学大会  
(Neuroscience2008) 2008年7月10日 東京  
国際フォーラム

(8)

河原裕憲、今井貴雄、今高寛晃、辻本雅文、  
松本健、岡野栄之 神経系 RNA 結合蛋白質  
*Musashi1* は eIF4G と PABP の相互作用を阻害  
する (Neural RNA binding protein *Musashi1*  
inhibits translation initiation by  
competing with eIF4G for PABPs.) P2-d13.  
第31回日本神経科学大会  
(Neuroscience2008) 2008年7月10日 東京  
国際フォーラム

(9)

今井貴雄、河原裕憲、芝田晋介、河瀬聡、岡  
野栄之 RNA 結合蛋白質 *Musashi1* の新規標的  
RNA の同定  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日  
本生化学大会 合同大会  
2007, Dec 13  
パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインター  
コンチネンタルホテル

(10)

河原裕憲、今井貴雄、今高寛晃、辻本雅文、  
松本健、岡野栄之  
Neural RNA binding protein *Musashi1*  
Inhibits Translational Initiation by  
Competing with eIF4G for PABP.  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日  
本生化学大会 合同大会

2007, Dec 13

パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインター  
コンチネンタルホテル

(11)

大山貴子、大柄晶太、宮ノ入洋平、古川亜矢  
子、今井貴雄、岡野栄之、永田崇、片平正人  
ロングレンジの構造情報を利用した *Musashi*  
タンパク質と標的 RNA との複合体の構造解析  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日  
本生化学大会 合同大会

2007, Dec 11

パシフィコ横浜、ヨコハマグランドインター  
コンチネンタルホテル

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 貴雄 (TAKAO IMAI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 10383712

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者