

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700413

研究課題名(和文)

RNA 結合蛋白質 Musashi 1 による let - 7 機能発現阻害の分子機構解明

研究課題名(英文)

Elucidation of the molecular mechanism for inhibition of let - 7 miRNA function by RNA binding protein Musashi1

研究代表者

今井 貴雄 (IMAI TAKAO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10383712

研究成果の概要(和文):

神経幹細胞を含む神経系前駆細胞に発現する RNA 結合蛋白質 Musashi1 は、配列特異性をもって let - 7 miRNA に直接結合し、let - 7 が下流標的遺伝子に対して行う翻訳抑制機能を阻害することを明らかにした。Musashi1 は、Argonaute2 (Ago2) と同一複合体に存在することで PAZ ドメインの蛋白質分解を促進し、microRNA の選択的機能阻害をする働きがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):

Musashi1 is an RNA binding protein, which is expressed in neural stem/progenitor cells. I revealed following new findings. (1) Musashi1 directly bound to let - 7 micro RNAs with sequence specific manner. (2) Musashi1 inhibited the translational repression of let - 7 down - stream target gene thorough the let - 7. (3) There was the molecular aspect that Ago2 and Musashi1 exist in the same protein complex. (4) Musashi1 promoted the protein degradation of PAZ domain. The inhibition of let - 7 function by Musashi1 is possibly due to the Musashi1 - induced PAZ degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：RNA 結合蛋白質・神経幹細胞・miRNA・翻訳

1. 研究開始当初の背景

Musashi1 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。研究代表者はこの蛋白質分子の機能を研究しており、これまでに、Musashi1 蛋白質が下流標的配列 [(G/A)UnAGU] (n=1~3) を有する RNA に結合すること、下流標的遺伝子の翻訳を抑制することを明らかとしてきた (Imai

et al. *Mol. Cell Biol.* 2001; Okabe et al., *Nature* 2001)。Musashi1 の下流標的遺伝子の一つである *m-numb* の遺伝子産物は、Notch シグナル活性を低下させるが、研究代表者を含む研究グループの検証により、Musashi1 による m-Numb の翻訳抑制は、*in vitro* の実験結果と *musashi1* 遺伝子欠損マウスの解析から、神経幹細胞の未分化性の維

持・増殖能に寄与していると考えられている (Imai et al. *Mol. Cell Biol.* 2001; Sakakibara et al. *PNAS* 2002)。また、Musashi1 が、細胞周期のレギュレーターである *p21* の mRNA を翻訳抑制することが示され (Battelli et al. *Mol. Cell. Neuroscience* 2005) Musashi1 の性質上、Musashi1 が神経幹細胞の細胞周期調節に基づく増殖制御に関わっていることが予想される。さらに、研究代表者が発案し、科学研究費補助金(若手B:平成17年~平成18年)を元に研究の実行・指導を行うことにより、Musashi1 の翻訳抑制の分子メカニズムを近年明らかにした。その詳細は、翻訳開始因子の一つで mRNA の 5'-Cap 構造に形成される基本翻訳因子複合体の key molecule である eIF4G に対して Musashi1 が競合的に PABP (Poly(A) binding protein) に結合することで、eIF4G の機能阻害を引き起こして Musashi1 結合 mRNA の翻訳抑制が達せられることである。

最近、Musashi1 が microRNA(miRNA) の機能発現に関わる蛋白質 Argonaute2 (Ago2) と同一複合体に存在することが明らかとなり、miRNA を介した神経幹細胞の制御をしている可能性を予期させる実験結果を得た。すなわち、RNA 結合タンパク質である Musashi1 は、特異的な配列の miRNA に結合しこれを活性化もしくは阻害する可能性が考えられた。そこで、Musashi1 結合配列を有する癌抑制性の *let-7* miRNA と精製 Musashi1 蛋白質との結合実験を行ったところ、*let7a* と *let7f* に特異的に結合する結果を得た。

let-7 は癌遺伝子である Ras、c-Myc、HmgA2 の翻訳を抑制する miRNA をコードしている (He, L. et al. *Nature* 2005 他)。胎生期の神経発生において *let-7* が未分化な細胞において発現が抑えられ、細胞分化に伴って発現が上昇することは、Musashi1 の発現と相補的である。このため、Musashi1 が *let-7* miRNA の代謝制御、機能制御に深く関与していることが考えられ、胎生期神経幹細胞から発する癌組織発生と通常の神経幹細胞の分化・増殖での Musashi1 と *let-7* miRNA の関係について調査する経緯に至った。

2. 研究の目的

神経幹細胞 (NS/PC) における RNA 結合蛋白質 Musashi1 による *let-7* の機能阻害の

分子メカニズムについて明らかにすることを目的とした。具体的には、Musashi1 を介して *let-7* の生合成・プロセッシング課程を阻害している可能性、あるいは、RNA-induced silencing complex (RISC) 中に装填されている *let-7* の働きを RNA 結合能によって阻害している可能性があり、これら複数の可能性について、生化学的・細胞生物学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試験管内において、放射性標識した *let-7* RNA と精製 Musashi1 蛋白質を作用させ、配列特異的結合性について gel shift 法を用いて評価した。

(2) *lin41* 遺伝子 3'-UTR の一部と Luciferase 遺伝子を利用した *let-7* sensor レポーター遺伝子を作製し、培養細胞 (NS/PC、P19, NIH3T3) に導入し、Musashi1 の発現量に応じたレポーター活性の変動を評価した。

(3) Musashi1 と Ago2 の相互作用部位の相互作用部位の同定: 培養細胞 (NS/PC、HEK293T) に Musashi1 と断片化した Ago2 を共導入し、免疫沈降法により相互作用部位の同定を行った。

(4) (3)と同様の細胞培養系に MG132 を終濃度 5 μ M になるように添加し、PAZ ドメイン蛋白質の蛋白質量について、immunoblot 法を用いて MG132 非添加群と比較した。

4. 研究成果

(1) Musashi1 が *let-7* miRNA に配列特異性をもって結合することが明らかとなった。

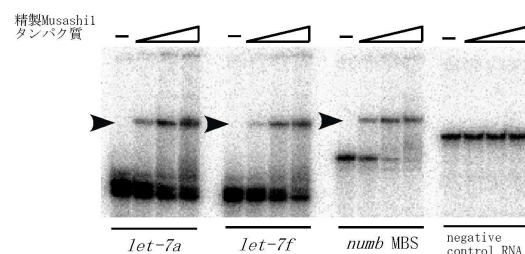


図1. Musashi1 蛋白質は *let-7a*, *let-7f*, *numb* の 3'UTR の RNA に特異的に結合する。MBS; Musashi1 結合配列. 矢頭は Musashi1 と RNA の複合体を示している

(2) *let-7*の活性を評価できる reporter 遺伝子を用いて、神経幹細胞(NSC), P19 細胞(EC 細胞), NIH3T3(繊維芽細胞)における *let-7*の活性を評価した(図 2)。レポーターは Luciferase に *lin-41* 遺伝子の *let-7*配位部位(LCS)を連結させたもので、*let-7*が配位できるもの[Intact reporter]、配位できないもの[Mutation reporter]の二種を構築した。Intact reporter は *let-7*による翻訳抑制を受け、Mutation reporter は翻訳抑制を受けない。これらを用いると、Musashi1 が発現している NS/PC, P19 においては *let-7*の活性が殆ど無かったのに対し、Musashi1 の発現がほとんど無い NIH3T3 においては、*let-7*の活性が高いことが明らかとなった(図 2 囲み部)。さらに、NIH3T3 に Musashi1 を発現させると、Musashi1 の発現量依存的に *let-7* の翻訳抑制の解除がなされることが明らかとなった(図 2 下段)。

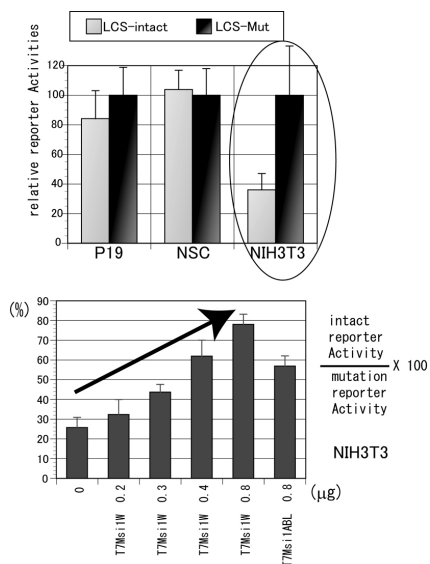


図 2. Musashi1 の発現と *let-7* の活性の相関

(3) P19 細胞において、Musashi1 の発現を siRNA によって減弱させた場合と control siRNA 群のそれぞれの *let-7* miRNA の量を定量的に比較した結果、成熟 *let-7* の RNA 量に変化がなく、Argonaute2 (Ago2)への装填量に顕著な変化が無いことが予想された。(4) (3)の結果を踏まえ、RISC 複合体の中心分子である Ago2 と Musashi1 が同一複合体中に存在する局面があることに着目し、Ago2 と Musashi1 との相互作用部位の同定を行った。HEK293T 細胞内で、PAZ ドメインを含

む N 末端の領域、PAZ ドメイン・mid ドメインを含む領域、PIWI ドメイン領域に分割した断片化 Ago2 蛋白質のそれぞれと Musashi1 全長蛋白質を同時発現させ、免疫沈降法により相互作用を調べたところ、全ての領域が Musashi1 と共沈降することが確認された。Musashi1 と Ago2 が直接結合する可能性は否定できないが、複数部位で Ago2 と相互作用する GW182 などの中間介在分子が存在することが予想された。

(4) さらに Ago2 の狭小断片化を行い、Musashi1 との共発現-免疫沈降解析を行ったところ、PAZ ドメイン領域蛋白質が Musashi1 蛋白質の存在により、蛋白質分解されることが明らかとなった。PAZ ドメインは miRNA の 3'端と相互作用している RISC 機能発現の重要部位であるので、Musashi1 による PAZ ドメインの蛋白質修飾は、Musashi1 による *let-7* の機能発現減弱の原因となり得ると考えられた。

(5) この蛋白質不安定性の増大は MG132 の添加によって回避されることが明らかとなり、ユビキチンプロテアソームによる蛋白質分解が原因だと考えられた。

(6) 10 アミノ酸ずつ段階的に欠削した PAZ ドメイン変異体を HEK293T 細胞内で発現させて Musashi1 蛋白質と共存させたところ、不安定化が起こらなくなる欠失部位を同定した。この部位には、ユビキチン付化がなされるアミノ酸が複数個集中して存在し、そのアミノ酸を別のアミノ酸に置換することにより、Musashi1 依存的な蛋白質分解(不安定化)が軽減された。また、Ago2 は幹細胞特異的に発現する E3-ligase の一つである Lin-41 によってユビキチン化がなされることが明らかとなっている。Musashi1 は配列特異性をもって *let-7* に結合するが、その RNA 結合と共に Ago2 複合体に存在する Lin-41 による蛋白質分解を誘発している可能性は、上記(5)で行った MG132 添加実験の結果からも高いと考えられる。Musashi1 による PAZ ドメインの蛋白質分解促進は、RNA 結合蛋白質による microRNA の選択性を有した機能減弱の新しい分子機構であると考えられる。

(7) Lin-28 を介した一部の *let-7* family

(miR98)のプロセッシング阻害効果に対し、Musashi1 は増強機能を有することを明らかにした。

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6件)

Kawase S, Imai T, Miyauchi-Hara C, Yaguchi K, Nishimoto Y, Fukami SI, Matsuzaki Y, Miyawaki A, Itohara S, Okano H: Identification of a Novel Intronic Enhancer Responsible for the Transcriptional Regulation of Musashi1 in Neural Stem/Progenitor Cells. **Molecular Brain**, 4(1):14, 2011. [Epub ahead of print] (査読有り)

Kawahara H, Okada Y, Imai T, Iwanami A, Mischel PS, Okano H: Musashi 1 cooperates in abnormal cell LINeage protein 28 (Lin28)-mediated Let-7 family microRNA biogenesis in early neural differentiation. **J Biol Chem**. 286, 16121-16130, Epub 2011 Mar 4, 2011. (査読有り)

Kuwako K, Kakumoto K, Imai T, Igarashi M, Hamakubo T, Sakakibara S, Tessier-Lavigne M, Okano HJ, Okano H: Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through posttranscriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression. **Neuron**. 12;67(3):407-21, 2010. (査読有り)

Horisawa K., Imai T, Okano H, Yanagawa H: The Musashi family RNA-binding proteins in stem cells. **BioMol Concepts**, Vol. 1, pp. 59-66, 2010. (査読有り)

Oki K, Kaneko N, Kanki H, Imai T, Suzuki N, Sawamoto K, Okano H: Musashi1 as a marker of reactive astrocytes after transient focal brain ischemia. **Neurosci Res**. 66:390-5, 2010. (査読有り)

Horisawa K, Imai T, Okano H, Yanagawa H.: 3'-Untranslated region of doublecortin mRNA is a binding target of the Musashi1 RNA-binding protein. **FEBS Lett**. 583(14):2429-2434, 2009. (査読有り)

〔学会発表〕(計13件)

武藤 淳、今井貴雄、馬淵洋、松崎由未、吉田一成、岡野栄之：ヒト悪性脳腫瘍癌幹細胞における Musashi の発現と抗腫瘍効果のメカニズム、第10回日本再生医療学会総会、O-19-6、2011年3月2日*会期3/1-2(京王プラザホテル・東京)

河瀬 聡、今井貴雄、原 央子、矢口 邦夫、糸原 重美、岡野 栄之：神経幹細胞におけるmusashi1遺伝子の転写制御解析、第33回日本神経科学会・第50回日本神経化学会・第20回神経回路学会合同年会、P1-d18、2010年9月2日*会期9/2-4(神戸国際会議場・神戸)

今井貴雄、河原 裕憲、河瀬 聡、岩成 宏子、望月 康弘、児玉 龍彦、浜窪 隆雄、岡野 栄之：Ribonomics解析によるMusashiを介したmRNA regulonの同定、第12回日本RNA学会年会、P-120、2010年7月28日*会期7/27-29(一橋記念講堂・東京)

堀澤 健一、松尾 薫、今井貴雄、岡野 栄之、柳川 弘志：RNA結合蛋白質Msi1と新規標的mRNAの相互作用解析、第12回日本RNA学会年会、P-118、2010年7月28日*会期7/27-29(一橋記念講堂・東京)

大山 貴子、永田 崇、田中 志穂、飯倉 裕之、河原 裕憲、今井貴雄、岡野 栄之、山崎俊夫、片平 正人：分化制御の鍵をにぎる翻訳抑制複合体のNMR構造機能解析)、第12回日本RNA学会年会、P-119、2010年7月27日*会期7/27-29(一橋記念講堂・東京)

河瀬 聡、今井貴雄、原 央子、矢口 邦雄、糸原 重美、岡野 栄之：神経幹細胞におけるmusashi-1 遺伝子の転写制御機構の解析(Analysis of transcriptional regulation of musashi-1 gene in neural stem cells), 4P-0004, 第32回日本分子生物学会年会(MBSJ2009), 2009/12/12 パシフィコ横浜

堀澤 健一、今井貴雄、岡野 栄之、柳川 弘志：Musashi1 と新規標的 doublecortin との相互作用解析 (Interaction analysis of the Musashi1 RNA-binding protein and a novel target mRNA, doublecortin), 4P-0096, 第32回

日本分子生物学会年会 (MBSJ2009) ,
2009/12/12 パシフィコ横浜

飯倉 裕之, 田中 志穂, 樋口 敬介, 河原
裕憲, 今井 貴雄, 岡野 栄之, 永田 崇, 片平
正人: 翻訳制御に関わる Musashi1 と PABP1
の相互作用と立体構造の解析 (NMR
approaches to elucidate the molecular mechanism
of translation inhibition by Musashi1 and
PABP1), 3P-0088, 第 32 回日本分子生物学会
年会 (MBSJ2009), 2009/12/11 パシフィコ
横浜

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 (RNA-binding protein
Musashi1 regulates the function of let-7
miRNAs.), 1P-0286, 第 32 回日本分子生物学会
年会 (MBSJ2009), 2009/12/09, パシフィコ
横浜

Hironori Kawahara, Takao Imai, Hideyuki
Okano

A contribution of Musashi1 to the regulation by
Lin-28 in blocking miRNA processing
第 7 回幹細胞シンポジウム, 2009/5/15, 泉ガ
ーデンギャラリー, 東京

Takao Imai, Hironori Kawahara, Satoshi
Kawase, Hideyuki Okano.

RNA-binding protein Musashi1 inhibits let-7
miRNA activity
第 7 回幹細胞シンポジウム, 2009/5/15, 泉ガ
ーデンギャラリー, 東京

Satoshi Kawase, Takao Imai, Chikako Hara,
Hideyuki Okano

Analysis of transcriptional regulation of
musashi1 gene in neural stem cells
第 7 回幹細胞シンポジウム, 2009/5/15, 泉ガ
ーデンギャラリー, 東京

Jun Muto, Takao Imai, Yumi Matsuzaki,
Takeshi Kawase, Hideyuki Okano

Analysis of Musashi1 function in human glioma
stem cells and development of gene therapy for
tumor growth suppression.
第 7 回幹細胞シンポジウム, 2009/5/15, 泉ガ
ーデンギャラリー, 東京

[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]
無し

6 . 研究組織

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

(2) 研究分担者
無し

(3) 連携研究者
無し