

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460276

研究課題名(和文) 翻訳抑制因子Pdc4を介した細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) The translation inhibitor Pdc4 is involved in the induction of cell differentiation

研究代表者

江頭 恒 (Eto, Ko)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・准教授

研究者番号：40359964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：未分化な細胞は自己複製して未分化性を維持する一方で、分化した細胞に変化する。未分化な細胞が分化するには、分化しようとする細胞で発現する遺伝子の発現が抑制され、分化した細胞で発現する遺伝子の発現が促進される必要がある。本研究では、mRNAの翻訳を抑制する翻訳阻害因子Pdc4の発現量が増加することで、未分化な細胞で発現する遺伝子の発現が阻害され、分化が誘導されることを示した。Pdc4は未分化な細胞が自己複製する状態から分化するための分子スイッチとして機能していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Undifferentiated cells can not only self-replicate but also differentiate. During cell differentiation, the expression of genes specific for undifferentiated cells is suppressed and then that of genes specific for differentiated cells is promoted. The present study indicated that increased levels of Pdc4, a translation inhibitor suppressing mRNA translation, caused decreased levels of genes expressing in undifferentiated cells, inducing cell differentiation. Thus, Pdc4 may be a molecular switch for undifferentiated cells to convert from their self-replication state to their differentiation state.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Cell differentiation mRNA translation Translation inhibitor Neurogenesis Myogenesis Pdc4

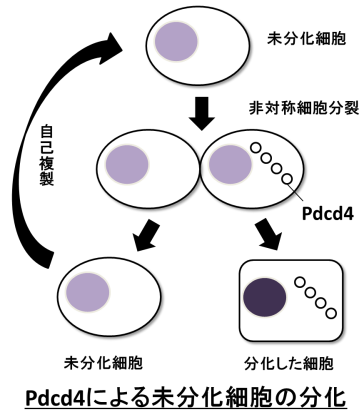
1. 研究開始当初の背景

幹細胞やそれから生じる前駆細胞のような未分化細胞は、非対称細胞分裂によって自己複製する細胞と分化した細胞を生み出す。未分化細胞の分化機構については、世界中で盛んに研究されているが、十分に解明されていない。

申請者はこれまで、mRNA に作用する RNA 結合タンパク質や翻訳抑制因子などが mRNA の翻訳を選択的に制御することで細胞の生死を調節する分子機構を研究し、特定の mRNA が翻訳されるかされないかによって細胞が生きるか死ぬかを決めることを明らかにしてきた。

最近、申請者は翻訳抑制因子の一つである Pdc4 が未分化細胞を分化させるのに必要であることを見出した。この成果は、神経、筋肉の未分化細胞の初代培養（マウス由来の神経幹細胞、神経前駆細胞、筋幹細胞（サテライト細胞）筋前駆細胞（筋芽細胞））や培養細胞（ヒト由来の神経前駆細胞 SH-SY5Y、マウス由来の筋芽細胞 C2C12）を用いて得られた。これらの細胞は、増殖培地で培養すると、自己複製するが、分化培地で培養すると、分化する。このように、申請者は mRNA の翻訳阻害がもたらす未分化細胞の分化機構を活性に研究しているところであるが、まだ解明されていない問題が数多く残されている。そこで本研究は、Pdc4 による細胞分化機構を明らかにすることを旨とした。申請者は、本研究計画を進展させるために予備的な研究結果を以下のように得ていた（未発表の結果を含む）。

- (1) 神経、筋肉の未分化細胞の初代培養や培養細胞に分化を誘導すると、Pdc4 の発現が著しく増加することを明らかにした。
- (2) この Pdc4 の発現増加は、分化マーカーの発現や未分化細胞の分化した細胞への形態変化よりも早く起こり、未分化細胞の分化を誘導することを明らかにした。
- (3) この Pdc4 の発現増加は、Pdc4 遺伝子の転写活性化によることを明らかにした。
- (4) 神経、筋肉の未分化細胞の初代培養や培養細胞に Pdc4 を過剰発現させると、未分化細胞は増殖培地で培養しているにも関わらず、分化マーカーの発現、分化した細胞への形態変化を起こし、分化す



ることを明らかにした。

- (5) 神経、筋肉の未分化細胞の初代培養や培養細胞で Pdc4 を欠損させると、未分化細胞は分化培地で培養しているにも関わらず、分化マーカーの発現、分化した細胞への形態変化を起こさずに、分化しないことを明らかにした。

2. 研究の目的

上記のように、Pdc4 の発現は種々の未分化細胞を分化させるのに必要であることが示唆された。しかし、Pdc4 による未分化細胞の分化機構は未解明のままである。そこで、研究の学術的背景、及びこれまでの研究結果をもとに、本研究は Pdc4 による細胞分化の分子機構を解明することを目的とする。研究期間内には以下のことを明らかにする。

- (1) Pdc4 遺伝子の発現を活性化する因子を見つけ出し、Pdc4 の発現を未分化細胞で増加させる発現制御機構を明らかにする。
- (2) Pdc4 が翻訳を阻害する標的 mRNA を見つけ出し、Pdc4 による未分化細胞の分化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Pdc4 の発現制御機構の解明

Pdc4 遺伝子の発現を活性化する因子を同定し、Pdc4 を増加させる発現制御機構を明らかにする。

Pdc4 発現の活性化因子の探索

Pdc4 mRNA の配列解析によって、Pdc4 mRNA に結合して遺伝子の転写後制御に関わる因子を探索する。神経、筋肉の未分化細胞で Pdc4 mRNA に結合する因子を RNA 免疫沈降によって確定する。

Pdc4 遺伝子の転写後制御の解析

見つけた Pdc4 発現の活性化因子が、未分化細胞で Pdc4 遺伝子の転写後制御を活性化するかを調べる。方法としては、Pdc4 mRNA の 5' 非翻訳領域 (UTR) や 3' UTR、翻訳領域に緑色蛍光タンパク質の遺伝子をつないだレポーター遺伝子を作製して未分化細胞に導入し、分化誘導に伴うレポーター遺伝子の発現を測定する。さらに、見つけた活性化因子を未分化細胞で過剰発現させると、Pdc4 の発現が高まり、未分化細胞の分化が起こるかを分化マーカーの発現、分化した細胞への形態変化で調べる。

(2) Pdc4 による細胞分化機構の解明

Pdc4 が結合する標的 mRNA を同定し、Pdc4 による未分化細胞の分化機構を明らかにする。

Pdc4 の標的 mRNA の探索

Pdc4 を過剰発現させた未分化細胞から、Pdc4 抗体を用いて免疫沈降し、Pdc4 と共沈降される RNA のシーケンス解析を行い、Pdc4 の標的 mRNA を網羅的に探索する。

Pdc4 の標的 mRNA がコードするタンパク

質の細胞分化における機能解析

Pdcd4の標的mRNAがコードするタンパク質を未分化細胞に過剰発現させて、分化が阻害されるかを分化マーカーの発現、分化した細胞への形態変化で調べる。

4. 研究成果

(1) Pdcd4の発現制御機構の解明

当初、Pdcd4の細胞分化に伴う発現の増加は転写因子を介した遺伝子転写の活性化によるものと予想されたが、本研究によってRNA結合タンパク質を介した遺伝子の転写後制御によるものと判明した。Pdcd4の発現は、Pdcd4の遺伝子から転写されたmRNAの安定化や翻訳効率の促進によって高まること、この遺伝子発現の転写後制御は、RNA結合タンパク質RBM3によって行われていること、RBM3はPdcd4 mRNAの3'UTRに結合することが分かった。このように、RNA結合タンパク質RBM3によるPdcd4遺伝子発現の転写後制御がPdcd4の高発現を誘導し、細胞分化をもたらすことを明らかにした。

(2) Pdcd4による細胞分化機構の解明

Pdcd4による細胞分化機構を解明するために、Pdcd4が結合して翻訳を阻害する標的mRNAを免疫沈降とRNAシーケンスの組み合わせで探索した。当初の予想より、比較的に多くの標的mRNA候補が見つかったので、細胞分化への影響を指標に解析し、標的mRNAの絞り込みを行った。その標的mRNAがコードするタンパク質の細胞分化における機能を解析し、標的mRNAがコードするタンパク質は、細胞分化に伴ってPdcd4が増加すると、減少すること、増殖促進に働く因子であることが分かった。このように、発現が促進、増加する因子が細胞分化を誘導するという従来の考え方とは対照的に、発現が抑制、減少する因子が細胞分化を誘導するという新しい考え方を提唱することができた。また、その発現を低下させるPdcd4のような翻訳抑制因子が細胞分化の誘導を制御する分子機構を明らかにした。

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 5件)

Yamada S, Marutsuka M, Inoue M, Zhang J, Abe S, Ishibashi K, Yamaguchi N, Eto K., The interaction of the ErbB4 intracellular domain p80 with -enolase in the nuclei is associated with the inhibition of the neuregulin1-dependent cell proliferation, *Int J Biochem Mol Biol*, 査読有, 2, 2014, 21-29, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955285/>

Anai C, Kawaguchi M, Eto K, Effects of culture media on the susceptibility of cells to apoptotic cell death, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 査読有, 50, 2014, 683-687, 10.1007/s11626-014-9756-z

Eto K, Nociceptin and meiosis during spermatogenesis in postnatal testes, *Vitam Horm*, 査読有, 97, 2015, 167-186, 10.1016/bs.vh.2014.10.003

Ushio A, Eto K, RBM3 expression is upregulated by NF- κ B p65 activity, protecting cells from apoptosis, during mild hypothermia, *J Cell Biochem*, 査読有, 119, 2018, 5734-5749, 10.1002/jcb.26757

Takaki S, Eto K, Cytoplasmic localization of programmed cell death 4 contributes to its anti-apoptotic function, *Mol Cell Biochem*, 査読有, 2018, 10.1007/s11010-018-3322-z

[学会発表](計 8件)

山田智美、丸塚真佐希、井上雅、張継東、安部眞一、石橋賢一、山口直人、江頭恒、ErbB4の細胞内ドメイン p80 と -enolaseの相互作用は、neureguin1に依存した細胞増殖を阻害する、日本分子生物学会第37回年会、2014年11月25日～2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

村岡明彦、山田智美、江頭恒、翻訳抑制因子 Pdcd4による細胞分化機構の解明、日本分子生物学会第37回年会、2014年11月25日～2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

池田早希、橋本愛理、但馬達哉、江頭恒、アフリカツメガエルの初期胚発生過程における新たな母性因子 Pdcd4の機能解析、日本分子生物学会第37回年会、2014年11月25日～2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高木翔平、江頭恒、細胞が生きるか死ぬかは翻訳阻害因子 Pdcd4によって決められるか?、日本分子生物学会第38回年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日～2015年12月4日、神戸ポートピアホテル 他(兵庫県・神戸市)

江頭恒、柴田大圭、生塩文子、Posttranscriptional mechanisms inhibiting cell proliferation and apoptotic cell death by the RNA binding

protein RBM3、日本分子生物学会第 38 回
年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、
2015 年 12 月 1 日～ 2015 年 12 月 4 日、
神戸ポートピアホテル 他（兵庫県・神
戸市）

鹿島瑠衣、村岡明彦、江頭恒、翻訳抑制
因子 Pdc4 を介した細胞分化機構の解明、
第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月
25 日～ 2016 年 9 月 27 日、仙台国際セン
ター/東北大学川内北キャンパス（宮城
県・仙台市）

鹿島瑠衣、村岡明彦、江頭恒、翻訳抑制
因子 Pdc4 を介した細胞分化機構の解明、
日本分子生物学会第 39 回年会、2016 年
11 月 30 日～ 2016 年 12 月 2 日、パシフ
ィコ横浜(神奈川県・横浜市)

鹿島瑠衣、江頭恒、翻訳抑制因子 Pdc4
を介した細胞分化機構の解明、第 69 回日
本細胞生物学会、2017 年 6 月 13 日～2017
年 6 月 15 日、仙台国際センター(宮城県・
仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

Eto K, Elsevier, Plasma Medical Science,
2018, 350 pages, pp25-32

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
熊本大学理学部 HP
[http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/staff/s
taff5.html](http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/staff/staff5.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 恒 (Eto Ko)

熊本大学・大学院先端科学研究部・准教授
研究者番号：40359964

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

生塩 文子 (Ushio Ayako)

山田 智美 (Yamada Satomi)

穴井 力 (Anai Chikara)

村岡 明彦 (Muraoka Akihiko)

橋本 愛理 (Hashimoto Airi)

高木 翔平 (Takaki Syohei)

池田 早希 (Ikeda Saki)

鹿島 瑠衣 (Kashima Rui)