

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790675  
 研究課題名(和文) mRNA 安定性調節メカニズムを介した造血細胞のアポトーシス制御と白血病への関与  
 研究課題名(英文) Apoptosis control of hematopoietic cells through the regulation of mRNA stability and its involvement in leukemogenesis  
 研究代表者  
 松井 啓隆 (MATSUI HIROTAKA)  
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
 研究者番号：60379849

研究成果の概要(和文)：Hsc70 複合体が結合する Bim mRNA 上のシスエレメントを同定した。本配列は、Bim mRNA 3' UTR のうちヒトとマウスで高度に保存されている 800bp 程度の AU-rich な配列である。また Bim mRNA に結合しうる miRNA を明らかにした。Bim 3' UTR 開始部位から約 200 塩基下流へ miR-181 が結合し、Bim mRNA の安定性制御に関与するという実験結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We identified cis-elements on Bim mRNA that would be bound by Hsc70-complex. These were almost 800bp long AU-rich sequences which were highly conserved between human and mouse. Furthermore, we isolated miRNA that bind to Bim mRNA. miR-181 seemed to bound to 200bp downstream of stop codon of Bim mRNA and to regulate the stability of Bim mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：Bim, Hsc70, mRNA 安定性制御

## 1. 研究開始当初の背景

Bim は、Bcl-2 スーパーファミリーに属するアポトーシス促進因子で、造血細胞数を調節している。Bim の発現は多くの細胞では mRNA レベルで調節されるので、当初、サイトカインによる Bim の発現低下は転写抑制によるものと考えた。しかしながら、単造血細胞を用いた解析では転写制御の関与は証明できず、Bim の発現が抑制されるはずの

サイトカイン存在下でも、Bim mRNA の転写が積極的に行われることを示唆するデータを得た。この結果をふまえ、サイトカインによる Bim mRNA の発現抑制が転写調節ではなく mRNA 安定性制御によりなされると考え、解析を試みた。その結果、サイトカインが Bim mRNA へのヒートショック関連因子 Heat shock cognate protein 70 (Hsc70) の結合を抑制し、mRNA を不安定化することが

判明した。すなわち、Hsc70 は一般に知られるシャペロン機能のほかに mRNA 結合因子としての側面を持ち、Bim mRNA を安定化する機能を有する。しかしサイトカインが Hsc70 と Bim mRNA との結合を抑えるため、Bim mRNA が不安定となり発現量が減少するのである。これに加え、サイトカインによる Hsc70 の mRNA 結合能調節には、コシャペロンとよばれる一群のタンパク質が関わることも明らかとなった。サイトカイン存在下では、Hsc70 とコシャペロン Bag-4, Chip が複合体を形成し、本複合体は mRNA と結合しない(図 1)。一方サイトカイン非存在下では、Hsc70 と別のコシャペロン Hip, Hsp40 が複合体となり、Bim mRNA に結合してこれを安定化するので、Bim mRNA の発現が増加しアポトーシスが誘導されることが判明した(図 2)。

## 2. 研究の目的

本研究は上記研究成果をもとに、サイトカインによる mRNA 安定性制御を介したアポトーシス調整メカニズムの詳細を解明することを目的とした。具体的には、(1)サイトカインは Hsc70 複合体構成因子を変化させ Bim mRNA との結合能を調節する。複合体構成因子を明らかにし、結合能調節機構を解明する。(2)Hsc70 が Bim mRNA 特異的に結合するメカニズムを明らかにする。(3) mRNA 安定性制御システムにマイクロ RNA(miRNA)を介した mRNA 分解が関与することを示す。

## 3. 研究の方法

(1)サイトカインによる mRNA 結合能の制御メカニズムの解明

サイトカインは、Hsc70 とコシャペロンから構成される Hsc70 複合体の構成因子を変化させ、Hsc70 の mRNA 結合能を制御している。具体的には Hsc70 と Bag-4, Chip との結合を促進させ、Hip, Hsp40 との結合を抑制するが、そのメカニズムを解明する。

Hsc70 複合体構成コシャペロンの変化にリン酸化などのタンパク修飾が関与していることを予想し、正リン酸化標識法やリン酸化特異抗体などを用いて種々検討したが、確たる証拠は得られなかった。そこで本研究では、Hsc70/コシャペロン複合体に両者の結合を調節する別の因子が存在する作業仮説のもと、解析を行う。具体的には、免疫沈降法により Hsc70 複合体を精製し、サイトカインの有無による複合体構成因子の相違を検討する。また Bim

mRNA に結合する因子を細胞抽出液から精製し、サイトカインの有無で結合因子を比較する。本方法は申請者が mRNA アフィニティクロマトグラフィーと称しているもので、ビオチン化 Bim mRNA を結合させたストレプトアビジン固定化ビーズを用い、ビーズと細胞抽出液を混合し反応させたのち洗浄し、Bim mRNA に結合するタンパク質を精製する方法である(本実験手段により Bim mRNA と Hsc70 の結合が明らかになった)。Hsc70 複合体構成因子と mRNA 結合タンパク質の解析には質量分析器を用いるため、候補因子の同定が可能である。

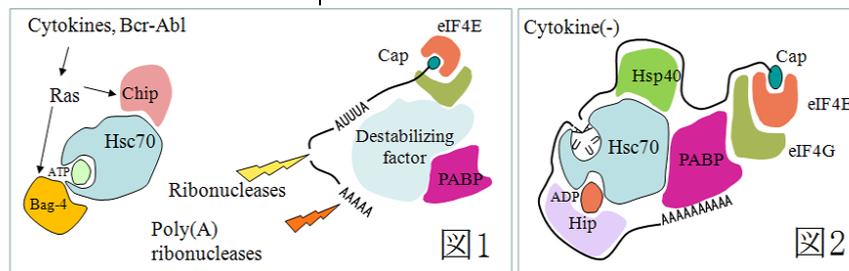
(2)遺伝子特異的 mRNA 結合メカニズムの解明

Hsc70 複合体は Bim mRNA の 3' UTR に存在する ARE に結合し、mRNA を安定化するが、同じく典型的な ARE を有する Fos の mRNA には結合しない。したがって Hsc70 は ARE 周辺の mRNA 配列(シスエレメント)を認識し、結合特異性を発揮すると思われる。Bim の 3' UTR 配列(約 4Kb)は全体としてはマウスとヒトで大きく異なるが、ARE が集中する約 850bp の範囲に限っては高度(約 85%)に保存されている。そこでこの領域に的を絞って、結合特異性を決定するシスエレメントの同定を試みる。

マウスとヒトとで保存されている領域の Bim 3' UTR 配列にさまざまな変異を導入した mRNA を合成し、Hsc70 複合体との結合能を測定する。細胞抽出液より免疫沈降にて Hsc70 複合体を精製し、ここにラジオアイソトープ標識した mRNA を加えて、Hsc70 複合体と mRNA との結合を定量する。ほかに、上述の mRNA アフィニティクロマトグラフィーを用い、変異を導入した mRNA に結合する Hsc70 の量を解析して結合に重要な配列を決定する。また、それぞれ試験管内で合成した Hsc70 複合体と mRNA とを直接混合して結合を確認する。この方法では、Hsc70 複合体構成因子の一部を追加したり除去したりすることが可能なため、両者の結合に必要なシスエレメントの解析のみならず、複合体構成因子のうち結合特異性を規定する因子(トランスエレメント)の特定にもつながるものと期待される。

(3)マイクロ RNA (miRNA)の関与の解明

miRNA は mRNA と相補的な配列を有し、特



定の mRNA に結合してその分解を促進する。最近、miRNA と RNA 不安定化因子 TTP が協調して mRNA の寿命を短縮するメカニズムが報告された (Jing Q et al, 2007)。このことから類推すると、mRNA 安定化機能を持つ Hsc70 複合体は、miRNA の機能を抑制している可能性がある。最も単純な筋書きは、mRNA と結合した Hsc70 複合体が miRNA の結合部位を「隠す」ことである。別の作業仮説として、(計画 2) のテーマ (ARE 周囲に存在し Hsc70 結合特異性を規定するシスエレメント) こそが miRNA 結合部位そのものであり、Hsc70 複合体は mRNA/miRNA の二重鎖 RNA を認識してそこに結合すると同時に、miRNA の mRNA 不安定化機能を抑制するという想定も可能である。

Bim mRNA 3' UTR に結合する miRNA を同定し、IL-3 存在下・非存在下での mRNA 結合 miRNA を比較検討する。miRBase 等のデータベース解析から、Bim mRNA に結合する可能性のある miRNA は少なくとも数十はあると予測された。実際に Bim mRNA に結合している miRNA を IL-3 の有無で比較検討するために、Vatolin らが報告した、mRNA 上の miRNA をプライマーとして cDNA を合成し、合成された cDNA の末端を確認することによって miRNA の種類と結合部位を同定する方法 (Vatolin S et al, 2006) を適用する。また、すでに樹立済みの Hsc70 発現抑制 Baf-3 細胞株を用い、上記の方法にて Bim mRNA に結合する miRNA を野生型 Baf-3 細胞と比較する。これらの解析は平成 20 年度に行う。平成 21 年度には、このようにして得られた miRNA 候補を細胞内で強制発現させたり、相補配列の過剰発現による機能抑制を行ったりして、その表現型を検討する。また Hsc70 複合体と miRNA や mRNA/miRNA の二重鎖 RNA との結合を検討する。

#### 4. 研究成果

サイトカイン存在下では Hsc70 タンパク質複合体が Bim mRNA に結合せず、Bim mRNA が不安定になり発現量が減少する。一方、サイトカイン非存在下では Hsc70 複合体が Bim mRNA に結合し安定化する結果、Bim タンパク質発現量が増加しアポトーシスが誘導される。Hsc70 複合体の認識配列は Bim mRNA 3' UTR のうちヒトとマウスで高度に保存されている 800bp 程度の AU-rich な配列であるが、同様に AU-rich な 3' UTR 配列を有する fos mRNA は Hsc70 複合体に依存せず、サイトカインの有無にかかわらず不安定であったので、Hsc70 は Bim mRNA 上の AU-rich なコア・エレメント周辺にある mRNA 配列 (シスエレメント) を認識し、結合特異性を発揮すると考えられた。現在、Bim 3' UTR にさまざまな変異を導入した mRNA を合成し、Hsc70 複合体との

結合能測定を行っている。また mRNA の安定性や翻訳制御には micro RNA が関与することが知られているが、われわれは Hsc70 複合体が micro RNA と競合的に Bim mRNA に結合し不安定化を妨げる可能性や、micro RNA の結合部位を Hsc70 複合体が認識して結合し micro RNA の機能を阻害する可能性があると考え、Bim mRNA に結合する micro RNA の同定を進めている。これまでに Bim 3' UTR 開始部位から約 200 塩基下流への miR-181 の結合が推測された。miR-181 は慢性リンパ性白血病 (CLL) 細胞で発現が低下することが知られており、CLL では miR-181 の発現低下が腫瘍関連因子 TCL1 の発現亢進に関与すると考えられている。今後さらに、これらの Bim mRNA 安定性制御へのかかわりを明らかにする予定である。

#### 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 Up-regulation of survivin by the E2A-HLF chimera is indispensable for the survival of t(17;19)-positive leukemia cells. Okuya M, Kurosawa H, Kikuchi J, Furukawa Y, Matsui H, Aki D, Matsunaga T, Inukai T, Goto H, Altura RA, Sugita K, Arisaka O, Look AT, Inaba T. *J Biol Chem.* 2010, 285(3):1850-1860. (査読有)
- ② Identification of a common microdeletion cluster in 7q21.3 subband among patients with myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Asou H, Matsui H, Ozaki Y, Nagamachi A, Nakamura M, Aki D, Inaba T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 383(2), 245-251. (査読有)
- ③ Ras-mediated up-regulation of survivin expression in cytokine-dependent murine pro-B lymphocytic cells. Shinjyo T, Kurosawa H, Miyagi J, Ohama K, Masuda M, Nagasaki A, Matsui H, Inaba T, Furukawa Y, Takasu N. *Tohoku J Exp Med.* 2008, 216(1):25-34. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Matsui H, Loss of Titan (Samd9L), a Candidate -7/7q- Responsible Gene Encoding An Actin Remodeling Regulator, Develops MDS/AML in Cooperation with Ev11 or Fbx110, ASH annual meeting, 2009 年 12 月 6 日, ニューオーリンズ, USA.

- ② 松井啓隆, 7q欠失責任遺伝子候補Titanの機能解析：アクチンリモデリング活性化と古典的wnt経路抑制による造血細胞制御, 日本血液学会総会, 2009年10月24日, 京都.
- ③ 松井啓隆, 7q欠失責任遺伝子候補Titanの機能解析：アクチンリモデリング活性化、および古典的wnt経路の抑制による造血細胞の制御, 日本癌学会総会, 2009年10月2日, 横浜.
- ④ Matsui H, Identification of Two 7q Genes Encoding Centrosomal Proteins as Myeloid Tumor-Suppressor Candidates, ASH annual meeting, 2008年12月6日, サンフランシスコ, USA.
- ⑤ 松井啓隆, 7q欠失責任遺伝子候補Titanはアクチンリモデリングを制御する, 日本癌学会総会, 2008年10月29日, 名古屋.
- ⑥ 松井啓隆, 7q欠失責任遺伝子候補Titanはアクチンリモデリングを制御する, 日本血液学会総会, 2008年10月11日, 京都.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松井 啓隆 (MATSUI HIROTAKA)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：60379849

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：