

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700358

研究課題名(和文)

RNA結合蛋白質Musashi1が介するmiRNA翻訳制御

研究課題名(英文)

RNA-binding protein Musashi1-mediated miRNA regulation

研究代表者

河原 裕憲 (KAWAHARA HIRONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：00424177

研究成果の概要(和文):

Musashi1 は神経幹細胞や前駆細胞に顕著に発現している RNA 結合蛋白質であり、近年種々の組織幹細胞にも高発現していることが分かってきた。種々の幹細胞を含む ES 細胞から分化させた EB 細胞を用いて Musashi1 の結合蛋白質として Lin28 を同定し、これの二者が協調して *let-7 family* の *miR98* の生合成過程を核内において阻害促進することを明らかにした。また、Musashi1 構造内に核移行シグナルを同定し、Musashi1 によって Lin28 が核内に存在する確率を上昇しうることも示した。

研究成果の概要(英文):

Musashi1 (Msi1) is an RNA-binding protein that is highly expressed in neural stem/progenitor cells (NS/PCs) as well as in other tissue stem cells. I showed that Msi1 works in concert with Lin28 to regulate post-transcriptional miRNA biogenesis in the cropping step, which occurs in the nucleus. Also, I found that Msi1 enhanced the localization of Lin28 to the nucleus and also inhibited the nuclear cropping step of another *let-7 family* miRNA, *miR98*.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：Musashi1, let-7, Lin28, 幹細胞, ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

Musashi1 (Msi1) は神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質とし同定され (Sakakibara et al., 1996 Dev Biol)、標的 mRNA に特異的に相互作用し、基本翻訳因子 eIF4G と PABP の相互作用競合的に阻害することで、標的遺伝子の発現を転写後レベルで調節する「翻訳抑制」機能を有した (Kawahara et al., 2008 JCB)。また、Msi1 は Stress Granule や Processing Body に局在したことから、miRNA を介した転写後調節への関与を示唆させた (Kawahara et al., 2008 JCB)。

Lin28 は胎生期および ES 細胞において顕著に高発現している RNA 結合蛋白質であり、その機能は当初 Polesskaya らによって、IGF-2 mRNA (Insulin-like Growth Factor 2 mRNA) の翻訳促進を介して筋細胞系において筋分化に寄与することが示された (Polesskaya et al., 2007 Genes & Dev.)。その後、細胞のリプログラミングに関わる iPS 細胞誘導因子であることが明らかとなった (Yu et al., 2007 Science)。さらに、Lin28 は特定の let-7 family miRNA の生合成を抑制することで、ES 細胞の分化や神経幹細胞の commitment に関与していた (Viswanathan et al., 2008 Science)。Polesskaya らの解析から筋細胞の系では Lin28 と Musashi 蛋白質が同じ複合体に存在することを示しているが、Lin-28 と Musashi の関係性には注目していなかった。

2. 研究の目的

Msi1 は Lin28 の複合体を形成し、Lin28 は miRNA 生合成経路に機能することから、

(1) Lin28 が標的とする let-7 family miRNA を用いて、その生合成経路について Msi1 の効果を解析する。

(2) 神経幹細胞に関して、Lin28 は miRNA の発現制御を介して幹細胞の commitment に関与、Msi1 は翻訳抑制によって幹細胞の未分化性維持に関与しており、ES 細胞の誘導系由来の神経幹細胞などを用いて、幹細胞に対する両分子の関係・関連を解析する。

すなわち、分子生物学・(幹)細胞生物学レベルの解析を柱に、miRNA を介した Msi1 の新たな翻訳制御機構の解明、幹細胞での効果を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) miRNA 生合成過程解析 (Microprocessing assay); miRNA 生合成

に関与する主要構成分子として Drosha と DGCR8 がある。これら両者と miRNA 前駆体 (primary miRNA; pri-miRNA) を混合反応させることで、miRNA の生合成過程 (Cropping step) を調べることが出来る。この microprocessing assay 反応中に Lin28 と Msi1 共存化させ miRNA の生合成過程での効果を調べた。

(2) ES 細胞の初期神経誘導における (幹)細胞生物学的解析; ES 細胞の誘導系由来の EB 細胞を用いて Msi1-Lin28 複合体の初期神経誘導に対する効果を、標的 miRNA である miR98 や初期神経系マーカー (sox1) の発現を指標に調べた。

3. 研究成果

まず ES 細胞とその分野初期段階 (EB 細胞) での Msi1 と Lin28 の発現調べたところ、Lin28 は ES 細胞では発現が高いが ES 細胞分化後期では減衰した。また Msi1 は逆に ES 細胞分化に従って一過性の発現上昇が観察された。Lin28 は let-7 family miRNA の生合成抑制能が報告されていたが、let-7 family の発現は Lin28 発現減衰後、時期を遅れて発現し始めた。Lin28 標的 miRNA のうち ES 細胞と神経細胞の commitment に関与するものとして let-7 family の miR98 があるがこれまで全く解析されていなかった。そこで、miR98 を用いて Msi1 or/and Lin28 存在化で microprocessing assay を行ったところ、Msi1 は Lin28 と協調的にかつ選択的に miR98 生合成を抑制した。すなわち、Lin28 の発現減衰後の let-7 family の発現抑制解除に Msi1 が関与していることが示唆された。

次に、ES 細胞と EB 細胞を用いて Msi1 or/and Lin28 非存在化で miR98 や sox1 の発現を調べたところ、Msi1 は Lin28 と協調的にかつ選択的に miR98 の発現を負に調節しており、それに伴って、sox1 の発現解析から ES 細胞分化段階の初期神経細胞の誘導に Msi1-Lin28 複合体が寄与することが明らかとなった。さらに、Msi1 の構造内に核移行シグナルが存在し、このシグナルにより Lin28 の核存在率を上昇させる機能を有することを強く示唆した。

これらの発見は、未知であった Msi1 の核内機能も明らかにしただけでなく、ES 細胞分化に転写因子以外にも miRNA-RNA 結合蛋白質による時間的微調整効果の重要性を示すものである。

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 1 件)

(1)

Hironori Kawahara, Yohei Okada, Takao Imai, Akio Iwanami, Paul S. Mischel, and Hideyuki Okano. “Musashi1 Cooperates in Abnormal Cell Lineage Protein 28 (Lin28)-mediated Let-7 Family MicroRNA Biogenesis in Early Neural Differentiation” **Journal of Biological Chemistry** 2011 In press, 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

(1)

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, 2010 年 7 月 28 日, 東京都

(2)

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, 2010 年 7 月 28 日, 東京都

(3)

Hironori Kawahara, Takao Imai, and Hideyuki Okano. “A contribution of Musashi1 to the regulation by Lin-28 in blocking miRNA processing.” 49th American Society for Cell Biology (米国細胞生物学会) 2009 年 12 月 7 日, San Diego, CA, USA

(4)

Takao Imai, Hironori Kawahara, Satoshi Kawase, Hideyuki Okano. “RNA-binding protein Musashi1 regulates the function of let-7 miRNAs.” 第 32 回 日本分子生物学会, 2009 年 12 月 9 日, 横浜市

(5)

Masahiko Umei, Shinsuke Shibata, Hironori Kawahara, Shinji Makino, Hiroataka J Okano, Hideyuki Okano. “Characterization of RNA binding protein Musashi in zebrafish” 第 32 回 日本分子生物学会, 2009 年 12 月 11 日, 横浜市

(6)

Hironori Iikura, Shiho Tanaka, Keisuke Higuchi, Hironori Kawahara, Takao Imai, Hideyuki Okano, Takashi Nagata, Masato Katahira. “NMR approaches to elucidate the molecular mechanism of translation inhibition by Musashi1 and PABP1” 第 32 回 日本分子生物学会, 2009 年 12 月 11 日, 横浜市

(7)

永田 崇、大山 貴子、杉山 孝司、飯倉 裕之、樋口 敬介、河原 裕憲、今井 貴雄、岡野 栄之、山崎俊夫、片平 正人 “Musashi1, PABP, mRNA が構成する翻訳抑制複合体の NMR 構造機能解析” 第 11 回 日本 RNA 学会, 2009 年 7 月 28 日, 新潟市

(8)

Hironori Kawahara, Takao Imai, and Hideyuki Okano. “A contribution of Musashi1 to the regulation by Lin-28 in blocking miRNA processing.” 7th STEM CELL Research Symposium, 2009 年 5 月 15 日, 東京都

〔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〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河原 裕憲 (KAWAHARA HIRONORI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 00424177

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし