

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月29日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770199

研究課題名（和文）細胞の増殖・生存を保証するRNA結合タンパク質RBM42の解析

研究課題名（英文）Role of RBM42 in proliferation and survival

研究代表者

内木 隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70420081

研究成果の概要（和文）：RNA結合タンパク質による mRNA 安定性制御、翻訳調節といった転写後制御は、生命活動において重要な役割を果たす。本研究では、相互作用する2つの RNA 結合タンパク質 RBM42 と hnRNP の細胞増殖における機能を解析した。RBM42 ノックダウン細胞と hnRNP ノックダウン細胞では、細胞周期の G1 期から S 期への移行に遅れがみられ、また、S 期への移行に重要な働きをもつ転写因子 E2F の標的遺伝子の発現量の低下が観察された。さらに、我々は、hnRNP が E2F の mRNA に結合し、mRNA の安定化に関与することを見いだした。以上の結果から、hnRNP は、転写因子 E2F の mRNA 安定性制御を介して、細胞周期を正に制御すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Post-transcriptional regulation of gene expression by RNA-binding proteins has pivotal roles in many biological processes. We analyzed role of two RNA-binding proteins, RBM42 and hnRNP, in cell proliferation. In RBM42 and hnRNP knockdown cells, G1/S progression was delayed as compared to control cells. E2F is an essential transcription factor that is required for gene expression in G1/S transition. The expression of E2F target genes was significantly reduced in RBM42 and hnRNP knockdown cells. Furthermore, we found that hnRNP associates with E2F mRNA and regulates the mRNA stability of E2F mRNA. These results suggest that hnRNP positively regulates cell cycle progression through the regulation of E2F mRNA stability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

RNA結合タンパク質は、標的 mRNA に結

合して、mRNA の安定性や翻訳の制御を介して様々な生命現象に関与する。RBM42 は

RNA 結合モチーフをもつタンパク質としてデータベースに登録されていたが、機能に関する情報は皆無であった。我々の研究室では、RNA 結合タンパク質 hnRNPK と相互作用する因子として RBM42 を同定した。hnRNPK は、これまでにがん遺伝子 c-Myc の翻訳制御を介して、細胞増殖に正に作用することが報告されていた。本研究では、細胞増殖に着目して hnRNPK と RBM42 の機能解析を開始した。

2. 研究の目的

相互作用する2つの RNA 結合タンパク質、hnRNPK と RBM42 の細胞増殖における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ほ乳類培養細胞 NIH3T3 細胞において、hnRNPK、または、RBM42 をノックダウンし、細胞周期の進行、遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

(1) RBM42 の細胞増殖における機能解析

RBM42 をノックダウンした結果、細胞増殖が著しく低下した (図1)。この細胞増殖の欠陥は、外来の野生型 RBM42 を導入することにより回復したが、RNA 結合ドメインに変異を導入した変異型 RBM42 では、回復しなかったことから、RBM42 は、RNA 結合を介して細胞増殖を正に制御することが示唆された。

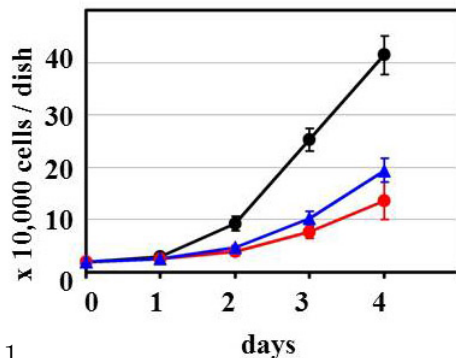


図1

RBM42 ノックダウンの細胞増殖への影響

黒：コントロール細胞

赤、青：RBM42 ノックダウン細胞

野生型 RBM42 は、C 末端に核移行シグナルと予想されるアミノ酸配列が存在し、主に核に局在する。C 末端を欠損した RBM42 は、細胞質に局在した (図2)。この細胞質に局在する C 末端欠損型 RBM42 も野生型と同様に RBM42 ノックダウンの効果を抑圧できたことから、RBM42 は、細胞質において、mRNA 安定性制御、または、翻訳制御を介して、細胞増殖

殖に関与することが考えられる。

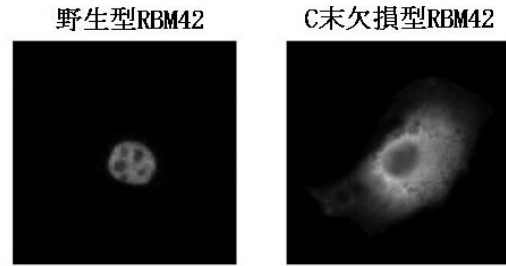


図2 RBM42 の細胞内局在

RBM42 ノックダウン細胞の細胞増殖の欠陥が、細胞周期の進行に異常があるためなのか検討するために、RBM42 ノックダウン細胞の細胞周期の進行を FACS により解析した。細胞を G0 期に同調した後、リリースして細胞周期の進行を観察した結果、RBM42 ノックダウン細胞は、コントロール細胞に比べ、S 期への移行が遅れていた (図3)。

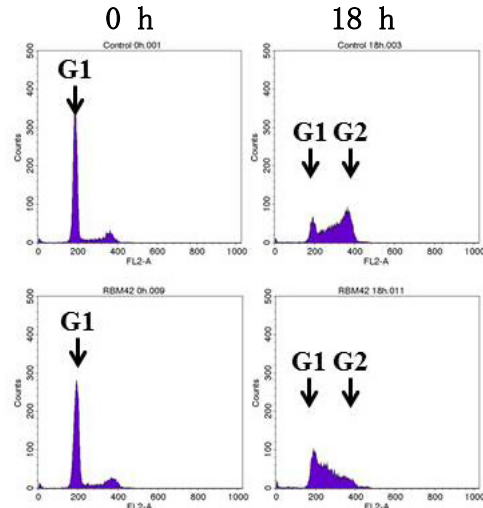


図3 同調からリリース後、0 時間、18 時間後の細胞周期 上段：コントロール細胞 下段：RBM42 ノックダウン細胞

RBM42 ノックダウン細胞の解析結果から、RBM42 は、G1 期から S 期への進行に関与する因子の mRNA に結合して、発現を制御することにより、細胞増殖を正に制御する可能性が示唆された。

(2) hnRNPK の細胞増殖における機能解析

hnRNPK の過剰発現は、がん遺伝子 c-Myc の翻訳を促進することにより、細胞増殖に対して正に作用することが報告されていた。細胞内在性の hnRNPK の機能を検討するために、hnRNPK ノックダウン細胞を作成し、細胞増殖

について解析した。予想どおり、hnRNPK ノックダウン細胞は、細胞増殖が著しく低下した(図4)。しかし、予想に反して、hnRNPK の標的として報告されていた c-Myc の発現量に変化はみられなかった。

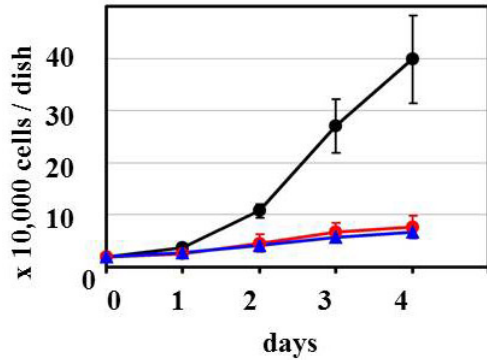


図4
hnRNPK ノックダウンの細胞増殖への影響
黒：コントロール細胞
赤、青：hnRNPK ノックダウン細胞

hnRNPK が RNA 制御を介して細胞増殖を制御することを確認するために、hnRNPK の RNA 結合ドメインに変異を導入した変異型 hnRNPK を作成した。外来の野生型 hnRNPK を導入することにより、hnRNPK ノックダウン細胞の細胞増殖の欠陥は回復したが、RNA 結合能を欠いた変異型 hnRNPK は、hnRNPK ノックダウン細胞の細胞増殖の欠陥を回復できなかったことから、hnRNPK は、c-Myc ではない未知の標的 mRNA を介して、細胞増殖に関与すると考えられた。

hnRNPK ノックダウン細胞の細胞増殖の欠陥が、細胞周期の進行の異常であるか検討した。RBM42 ノックダウン細胞と同様に、hnRNPK ノックダウン細胞は、S 期への移行が顕著に遅延していた(図5)。

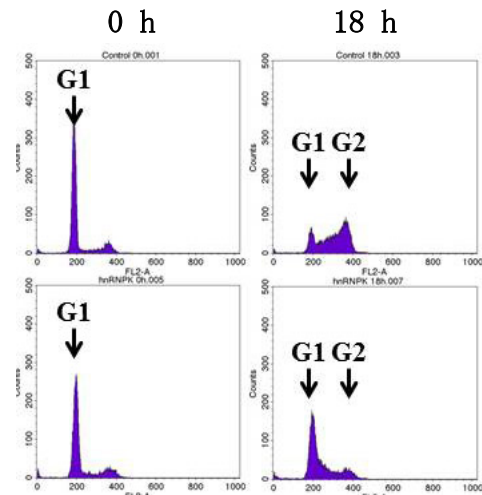


図5
同調からリリース後、0 時間、18 時間後の細胞周期
上段：コントロール細胞
下段：hnRNPK ノックダウン細胞

hnRNPK ノックダウン細胞の細胞周期の欠陥の原因を探るために、hnRNPK ノックダウン細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイ、および、定量 PCR により解析した。G1 期から S 期に關与する遺伝子の発現に着目したところ、hnRNPK ノックダウン細胞では、サイクリン E やサイクリン A などの細胞周期関連因子が 50%程度まで低下していた。さらに、DHFR、TYMS、TK などヌクレオチド代謝に關係する因子、Cdc6、Orc1 などの DNA 複製に關わる因子の発現も顕著に低下していた。これらの G1 期後期から S 期にかけて機能する遺伝子の発現は、転写因子 E2F により正に制御されている。E2F の mRNA 量は、hnRNPK ノックダウン細胞において、低下していた(図6)。

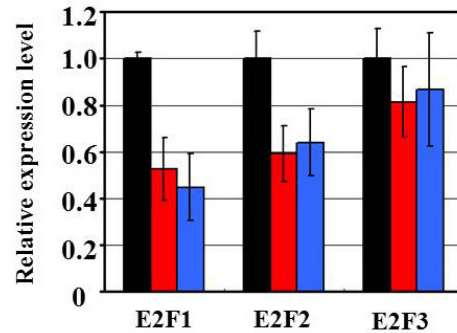


図6 E2F の発現量
黒：コントロール細胞
赤、青：hnRNPK ノックダウン細胞

hnRNPK と E2F1 mRNA との結合について、hnRNPK を免疫沈降し、その免疫沈降物に含まれる RNA を用いて E2F1 遺伝子を増幅するプライマーで RT-PCR かけることにより検討した。野生型 hnRNPK を免疫沈降した場合には、E2F1 mRNA が検出された(図7)。一方、RNA 結合ドメインに変異を導入した変異型 hnRNPK と E2F1 mRNA の結合は検出されなかった。さらに、hnRNPK ノックダウン細胞における E2F の発現低下は、野生型 hnRNPK では回復したが、変異型 hnRNPK では回復しなかった。これらの結果は、hnRNPK が E2F1 mRNA に結合して、mRNA の安定化に寄与することが示唆された。

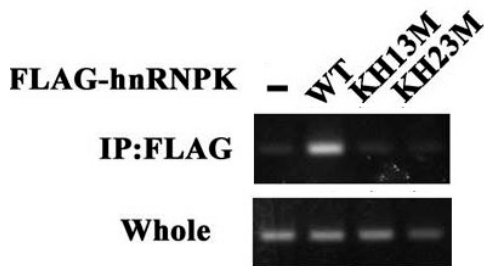


図7 hnRNP K と E2F1 mRNA との結合
WT:野生型
KH13M, KH23M:RNA 結合ドメイン変異型

E2F1 mRNA の減少が mRNA 安定性の低下である可能性を検証した。E2F1 mRNA の半減期を測定した結果、hnRNP K ノックダウン細胞では、コントロール細胞よりも早く E2F1 mRNA が分解されることが明らかになった。hnRNP K が mRNA の 3' UTR を介して E2F1 の発現を制御する可能性について、E2F1 の 3' UTR とルシフェラーゼのキメラ遺伝子を作成して検討した。hnRNP K ノックダウン細胞では、E2F1 の 3' UTR を持つ RNA の発現量は低下していたことから、E2F1 mRNA の 3' UTR を介して hnRNP K は E2F1 の発現を正に制御すると考えられる。

(3) hnRNP K と RBM42 の作用モデル

これまでの過剰発現系を用いた解析から、hnRNP K は、c-Myc を介して細胞増殖を正に制御すると考えられていた。しかし、本研究の結果から、細胞内在性の hnRNP K は、c-Myc の発現に必須ではなく、E2F の発現を介して細胞増殖を正に制御することが明らかになった。E2F1 の 3' UTR には、mRNA の分解に関与する RNA 配列である AU rich (ARE) 配列が存在する。hnRNP K の E2F の発現制御は、3' UTR を介していることから、hnRNP K は、ARE 依存的な mRNA 分解から mRNA を保護しているというモデルが考えられる (図8)。hnRNP K は、CT に富む配列に結合されることが報告されており、ARE 配列に hnRNP K が結合するのか、別の領域に結合するのか不明である。今後、hnRNP K が結合する RNA 配列を同定することにより、詳細な分子メカニズムが明らかになることが期待される。

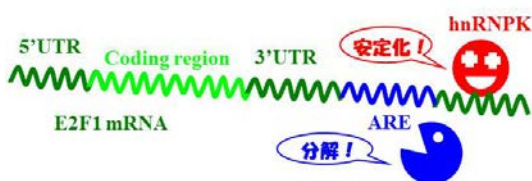


図8 hnRNP K の作用モデル

RBM42 は、hnRNP K と相互作用し、hnRNP K と同様に細胞増殖に必要であることが明らかになった。しかし、RBM42 の作用機序は、hnRNP K と同様であるか不明である。マイクロアレイの解析の結果から、S 期で機能する E2F の標的遺伝子のいくつかについては、発現低下は観察されたが、E2F の発現にはそれほど顕著な発現量の低下は観察されなかった。従って、E2F とは異なる未知の標的遺伝子の発現制御を介して、細胞増殖を制御している可能性が考えられる。今後は、RBM42 の標的遺伝子の同定が重要な課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. Yamaguchi Y, Naiki T, Irie K. (2012) Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation. BBRC in press. Biochem Biophys Res Commun. 417:427-432.

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molcellbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木 隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70420081