

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657132

研究課題名(和文)染色体凝縮異常によって生じる二核四倍体細胞に誘導される新規細胞死の解析

研究課題名(英文)A novel type of cell death in tetraploids with chromosomal aberrations

研究代表者

米原 伸(Yonehara, Shin)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00124503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の凝縮異常が誘導する二核四倍体細胞は、がん化に向かう危険な細胞である。我々は、二核四倍体細胞が新しいプログラムされた細胞死で除去されることをチャイニーズハムスター由来細胞で見いだしていた。様々な解析を可能とするため、この系をヒトやマウス細胞で誘導すること系を確立し、細胞死誘導前後の遺伝子発現プロファイルを取得した。また、この細胞死誘導には、eEF1A1 mRNAのP body (Processing body) への移行によるeEF1A1タンパク質の発現抑制が必要なこと、さらに、このeEF1A1の発現抑制にはCNBPのeEF1A1 mRNAへの結合が必要なことを示した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal chromosomal condensation induces binuclear cells with a genetically unstable tetraploidy known to facilitate aneuploid malignancies. We found such binuclear tetraploid cells to be eliminated by a novel type of programmed cell death in Chinese hamster cells. To enable various analyses of the novel cell death, we established human and mouse cell lines where the novel cell death can be induced, and then obtained exhaustive gene expression profiles from human cells before and after induction of the cell death. We found that induction of the cell death was mediated by down-regulated expression of eEF1A1 protein through accumulation of eEF1A1 mRNA into P bodies (Processing bodies), and the binding of CNBP protein to eEF1A1 mRNA was involved in this process.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞死 二核四倍体細胞 eEF1A1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞死の様態・性質が多様であることが分かってきた。アポトーシスが caspase の活性化によって引き起こされる細胞死であると、その分子機構から定義できるようになった結果、アポトーシスではない新しい細胞死誘導機構、caspase に依存しない細胞死の誘導機構の存在が示され始めている。その結果、様々な生命現象を解釈し、疾患・病態の原因を解明するためには、アポトーシスの実行機構を明らかにするのみでは不十分であり、非アポトーシス細胞死誘導の分子機構を解明し、それを生体内で捕捉すること、さらにその生理的・病理的意義を解明する新たな視点を加えた研究を展開していくことが求められている。

二核四倍体細胞は、染色体が不安定化し細胞のがん化につながると考えられている (Shi, Q et al. *Nature*, 2005; Fujiwara, T et al. *Nature*, 2005)。我々は、細胞分裂時の染色体凝縮の異常によって生じる二核四倍体細胞がアポトーシスではない新規細胞死誘導機構で除去され、この細胞死が普遍的な翻訳伸長因子 eEF1A1 (EF-1 $\alpha$ ) の発現減少によって媒介されることを世界に先駆けて示してきた (小林, 米原 *Cell Death Differ*, 2009)。この研究を進展させるため、様々な細胞における二核四倍体細胞や細胞死の誘導系を確立すること、詳細な分子機構を解明すること、またこの細胞死が生体内で誘導される実態と意義を解明することにより、新規細胞死の実態と生理・病理的意味を明らかにしていく必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

我々は、染色体の凝縮異常が誘導する二核四倍体細胞 (がん化に向かう危険な細胞とされる) が、翻訳伸長因子 eEF1A1 (EF-1 $\alpha$ ) の発現抑制による非アポトーシス細胞死で除去されることを見いだしてきた。この新規細胞死研究の進展をはかるためには、染色体の凝縮異常が誘導する二核四倍体細胞における新規細胞死の誘導系を様々な細胞系で確立し、その分子機構を解明するとともに、生体内でのモニターリングシステムを確立し、生体内での実態と機能を解明する必要がある。そして、この新規細胞死の生理・病理的意味を明らかにしていくことを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 染色体の凝縮異常によって生じる二核四倍体細胞の細胞死を、様々な細胞種に効率よく誘導するシステムを構築する。

(2) この細胞死の原因となる eEF1A1 の発現抑制が mRNA の 5'UTR 配列特異的な P body への移行に媒介されることを明らかにする。

## 4. 研究成果

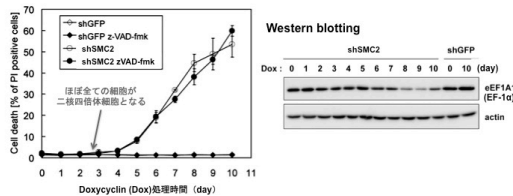
(1) 染色体の凝縮異常によって生じる二核四倍体細胞に細胞死を誘導するシステムの構築

我々は、染色体の凝縮異常によって誘導される二核四倍体細胞(がん化に向かう危険な細胞とされる)が、翻訳伸長因子 eEF1A1 (EF-1 $\alpha$ ) の発現抑制による非アポトーシス細胞死によって除去されることを見いだしてきた。この細胞死を誘導する系として、チャイニーズハムスター由来 CHO 細胞において外来性 CREB を活性化させる系 (CREB-ER 発現細胞を 4OHT 処理する系) を構築してきた。しかし、更に研究を進めるためには遺伝子の全配列やその発現パターンの網羅的解析かが進んでいるヒトやマウスの細胞を用いることが必要であると考えられた。そこで、マウス NIH3T3 細胞、マウス Balb3T3 細胞、ヒト U2OS 細胞、ヒト HeLa 細胞を用いて、同じ細胞死を誘導する系を確立した。これらの細胞では、染色体の凝縮異常が誘導する二核四倍体細胞(がん化に向かう危険な細胞)を誘導することが可能であり、翻訳伸長因子 eEF1A1 (EF-1 $\alpha$ ) の発現抑制による非アポトーシス細胞死で除去されることを確認した。

また、外来性 CREB-ER を 4-OHT 処理によって活性化させて染色体の凝縮異常を誘導する系は生理的な系ではないという問題が存在するので、より生理的な条件に近い系を構築する必要があった。そこで、染色体の凝縮異常を誘導する系として、DNA トポイソメラーゼ II またはコンデンシンのサブユニット SMC2 の発現抑制を薬剤処理によって誘導する系を立ち上げた。具体的には、shRNA の発現を薬剤 (Doxycycline/Dox) 誘導的に発現させる系 (小林, 米原 *Cell Death Differ*, 2009) を用い、DNA トポイソメラーゼ II または SMC2 に特異的な shRNA を発現誘導する系を、HeLa 細胞で構築した。これらの細胞では、Dox 処理後 2-3 日で、ほぼ全ての細胞が二核四倍体となり、その二日後から

死細胞数が増加し続けていった。SMC2 の発現抑制の結果を図 1 に示した。重要なことに、細胞死が認められる時期から eEF1A1 タンパク質の発現抑制が認められた。

図1 HeLa細胞におけるコンデンシンのサブユニットSMC2の誘導的ノックダウン



HeLa細胞においてSMC2の発現を抑制すると、eEF1A1(EF-1α)の発現抑制をともない、zVAD-fmk処理で阻害されない(caspase非依存性の)細胞死を誘導する

このように、CHO 細胞以外のヒトやマウスの細胞においても、染色体の凝縮異常によって誘導される二核四倍体細胞に eEF1A1 の発現抑制を介する非アポトーシス細胞死が引き起こされることを示すことができた。さらに、外来性 CREB-ER の活性化という非生理的な条件ではなく、DNA トポイソメラーゼ II またはコンデンシンのサブユニット SMC2 の発現抑制によって誘導される二核四倍体細胞においても、同様の細胞死が誘導できることを示すことができた。

## (2) eEF1A1 の発現抑制機構の解析

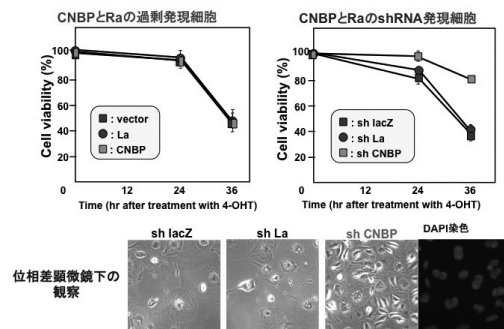
二核四倍体細胞においては eEF1A1 mRNA が P body (Processing body) に集積し eEF1A1 の発現抑制を誘導することを示している(小林、米原 *Cell Death Differ*, 2009)。そこで、この集積を可視化することによって細胞死を検出する方法の開発を進めた。具体的には、eEF1A1 mRNA の P body への移行を支配する配列と強固な RNA 結合タンパク質 L7Ae (齊藤、藤田、井上ら *Nature Commun*, 2011) の結合配列の両方を有する mRNA、L7Ae と split GFP (N 末側)を融合した遺伝子と、P body 構成タンパク質に split GFP (C 末側)をつなげた遺伝子を、二核四倍体を誘導できる細胞に発現させることを試みた。各遺伝子のクローニングを実施し、適度な量の遺伝子発現を誘導するプロモータの確定を終了し、全てを発現する細胞に二核四倍体と eEF1A1 の発現抑制を伴う細胞死を誘導する実験を行っている。

また、新たに作製した SMC2 の発現を Dox 処理で誘導する HeLa 細胞株を用い、二核四倍体細胞誘導時、新規細胞死の誘導時における遺伝子発現プロファイルを取得した。その

結果、核四倍体細胞誘導時に特異的、また新規細胞死の誘導時に特異的な遺伝子発現の誘導と抑制が存在することが明らかとなった。現在、個々の変動する遺伝子の細胞死への関わりについて、shRNA 発現による当該遺伝子の発現抑制実験を遂行することによって解析を進めている。

二核四倍体細胞においては eEF1A1 mRNA が P body に集積するが、この集積には、eEF1A1 mRNA の 5'領域に存在する 5'Top と呼ばれる配列が必要不可欠であることを示している(小林、米原 *Cell Death Differ*, 2009)。そこで、この 5'Top 配列に結合することが試験管内の解析で示されている Ra と CNBP (Cardinali B et al. *Nucleic acids Res*,1993) に注目して解析を行った。具体的には、Ra と CNBP について、過剰発現細胞株と shRNA 発現による発現抑制細胞株を作製し、二核四倍体誘導で引き起こされる細胞死に対する影響を解析した (図 2)。

図2 CNBPはeEF1A1の発現抑制による新規細胞死に必要である



その結果、過剰発現系では二核四倍体細胞に誘導される細胞死には CNBP も Ra の両方において影響は認められなかったが、発現抑制系では、CNBP の発現抑制によって細胞死の抑制が観察された。また、CNBP の発現抑制によって細胞死を阻害したときには、二核の細胞が生き残っていることも確認された。二核四倍体細胞に誘導される新規細胞死には、CNBP が関与することが示された。現時点では、CNBP が eEF1A1 mRNA の 5'Top 配列に結合することによって、eEF1A1 mRNA の P body への移行や eEF1A1 mRNA の分解・翻訳抑制が誘導されると考えており、これらを証明することが重要と考えている。

s 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)

- ① Kikuchi M, Kuroki S, Kayama M, Sakaguchi S, Lee KK and Yonehara S. Protease activity of procaspase-8 is essential for cell survival by inhibiting both apoptotic and nonapoptotic cell death dependent on receptor interacting protein kinase 1 (RIP1) and RIP3. J Boil Chem, Vol.287, 2012. pp.41165-41173. doi: 10.1074/jbc.M112.419747.
- ② Lee KK and Yonehara S. Identification of a mechanism that couples multisite phosphorylation of Yes-Associated Protein (YAP) with transcriptional coactivation and regulation of apoptosis. J Biol Chem, Vol.287, 2012. pp.9568-9578. doi: 10.1074/jbc.M111.296954.
- ③ Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, and Chiba T. Delk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet, Vol.45, 2013. pp.98-103. doi: 10.1038/ng.2481.
- ④ Takahashi S, Futatsugi-Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, Nakanishi K, and Yonehara S. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. Int Immunol, Vol.25, 2013. Pp.287-293. doi: 10.1093/intimm/dxs109.
- ⑤ Fukuoka A, Futatsugi-Yumikura S, Takahashi S, Kazama H, Iyoda T, Yoshimoto T, Inaba K, Nakanishi K, and Yonehara S. Identification of a novel type 2 innate immunocyte with ability to enhance IgE production. Int Immunol, Vo.25, 2013. pp373-382 (Featured article of the month). doi:10.1093/intimm/dxs160.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 米原 伸. 2013. Fas と caspase-8 の新しい生理・病理機能. 第 22 回 日本 Cell Death 学会 学術集会 特別講演 (招待講演) 2013 年 07 月 19 日~2013 年 07 月 20 日. 京都市.

[図書] (計 0 件)

[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

米原研究室ホームページ) : 研究内容や研究業績を記載

[http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/Fas/Home\\_j.htm](http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/Fas/Home_j.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米原 伸 (YONEHARA Shin)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号 : 00124503

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :