

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860464

研究課題名(和文)死戦期に発現するRBM3の定量および機能解析

研究課題名(英文)One of the functional analysis for RNA-binding motif protein 3 in Vitro

研究代表者

森田 沙斗武(MORITA, SATOMU)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80721894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前より様々な外的影響でRBM3が心筋で発現が変化することを報告してきた。今回、RBM3の細胞内での機能解析を試みた。その結果は、これまで生体内における現象として報告されていた結果とは真逆の結果であった。すなわち、これまでの文献では生体内でRBM3は翻訳を促進する働きを持つとされてきた。しかし、我々が今回行った実験によると、in Vitroでは反対にタンパク合成を阻害する働きを行うことが明らかとなった。その原因としてはmiRNAの存在や、RBM3が翻訳促進している状況において調節因子として働いている可能性が推定される。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that RBM3 in the myocardium using immunohistochemical staining, and the appearance patterns changed by environment of agonal phase. We investigated the function of RBM3 in Vitro. Our results was different from previous in Vivo investigations. Our results from the in Vitro cell-free translation system showed that RBM3 inhibits translation. These findings suggest that the increase in global translation is due to the effect on miRNA processing and that inhibition of translation has little effect in Vivo.

研究分野：法医学

キーワード：RBM3の機能解析 RBM3の翻訳抑制

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで死亡に至る過程、特に環境の違いによって、様々なタンパク質が心筋細胞に発現することを発見し、報告してきた。中でも RBM3(RNA binding motif protein3)の発現は免疫組織化学染色において明確であり、文献上もその役割があまり知られていないことから、機能解析を試みた。

2. 研究の目的

我々の免疫組織化学染色の結果によると RBM3 は特にヒトの陳旧性心筋梗塞巣周囲に高発現することから、血流低下を含めた低酸素に際して発現し細胞に対して何らかの保護作用を持つのではないかと仮説を立てた。特に細胞周期にどのような影響を与えるのか実際に検証を行った。また、免疫組織化学染色では定性は可能であっても定量は不可能であるため、定量化の方法を確立することで、司法解剖症例の死戦期の環境の推定に利用できると考えた。

即ち、(1)RBM3 の細胞周期における役割解析、(2)組織発現 RBM3 の定量化、を目指し計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) RBM3 の細胞周期における役割解析

RBM3 発現系プラスミドの構築 と大量発現

--- *Homo sapiens* 由来 RBM3 の塩基配列情報は NCBI から取得し、NM_006743.4 を利用した。その配列情報から *rbm3* 遺伝子を増幅するために以下のプライマーを作製した;

5'-GGAATTCCATATGTCCTCTGAAGAAG
GAAAGCTC-3' (forward) 、

5'-CGGGATCCCTATC

AGTTGTCATAATTGTCCTCTGTAATTTCC-

3' (reverse)。それぞれのプライマーは、下線部に制限酵素 NdeI と BamHI の認識配列を含んでいる。このプライマーを使って、

rbm3 遺伝子を cDNA から PCR により増幅した。増幅された断片は NdeI と BamHI サイトにより、pET-28a プラスミドにライゲーションにより導入し、pET28a/*rbm3* を作製した。その塩基配列を確認した。大腸菌 BL21(DE3) 株を pET-28a/*rbm3* プラスミドにより形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む 500 ml の LB 培地で 37°C で 1×10^8 cells/ml になるまで培養した。IPTG を終濃度が 40 µg/ml となるよう添加し、さらに 16°C で 16 時間培養した。その後遠心分離により集菌し、-20°C で保存した。

精製 --- 以下の全ての操作は 4°C で行った。*RBM3* の精製は以下の通り行った。*RBM3* を発現させた凍結した細胞 5 g を 50 ml の buffer I [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10 mM Imidazole (pH 8.0)] に懸濁し、氷上で超音波破碎した。細胞破碎液を ~30,000 g で 20 分間遠心し、その上清を収集した。Ni²⁺ を含んだ Ni-NTA アガロースを 10 ml の buffer I で平衡化し、菌体抽出液で懸濁した。その後、樹脂をカラムに詰め、buffer I で洗浄した。さらに、buffer II [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 30 mM imidazole (pH 8.0)] で洗浄し、30 ml の buffer III [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 300 mM imidazole (pH 8.0)] でタンパク質を溶出した。*RBM3* を含む画分に終濃度が 1 M になるまで硫化アンモニウムを加えた。このタンパク質溶液を buffer IV [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 M Ammonium Sulfate] で平衡化した 10 ml の TOYOPEARL-Phenyl カラムに通した。200 ml の buffer IV に硫化アンモニウムを加え、その濃度を 1.0 M から 0 M まで、直線的に減少させ、タンパク質を溶出させた。溶出された *RBM3* を含むタンパク質溶液は 4°C で buffer V [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5% glycerol] に対し透析した。

GFP 発現プラスミドの構築 --- *gfp* 遺伝子増幅のためのプラスミドは以下のように設計した;

5'-CGGAATTCATGGCTAGCAAAGGAGAA
GAAC-3' (forward) と

5'-GAAGATCTTTATTTGTAGAGCTCATC
CATGCC-3' (reverse)。それぞれのプライマーは下線部に制限酵素 EcoRI と BglII 認識配列を含んでいる。これらのプライマーを使って、pGLO プラスミドから *gfp* 遺伝子を PCR により増幅した。増幅した断片は EcoRI と BglII サイトを利用して、pT7-IRES にライゲーションし、pT7-IRES/*gfp* を構築した。

翻訳阻害の解析 --- 翻訳されたタンパク質の量は FP-8300 (JASCO Corporation) により Green fluorescent protein (GFP) の蛍光を測定し評価した。GFP はタカラバイオ社製の Human Cell-Free Protein Expression System により翻訳させた。GFP の励起波長は 395 nm、蛍光波長は 509 nm とした。GFP の発現方法は、最初の手順で RBM3 溶液を加えることを除き、キットの説明書通りに行った。反応液は 55 μ l で、5 μ l の RBM3 溶液 (0-8.23 μ M) と 2.5 μ l の pT7-IRES/*gfp* 溶液 (268 ng/ μ l) を含んでいる。全ての反応は 32°C で行った。

(2)組織発現 RBM3 の定量化

司法解剖で得られた心筋細胞をホモジェナイズし、同液を用いて RBM3 抗体を用い共免疫沈降法を行い、ウェスタンブロッティングにて定量化することを試みた。

4. 研究成果

(1) RBM3 の細胞周期における役割解析

RBM3 抽出 : N 末端でヒスチジン・タグを含んでいる Recombinant RBM3 タンパク質を E. Coli にて発現を認めた。タンパク質の純度は、SDS-page によって確認した。RBM3 のタンパク質バンドは 20kDa

周囲に確認でき、tagged RBM3 は 19.3kDa であると予測された。

RBM3 によるタンパク合成阻害 : 過去の文献によると、RBM3 は直接リボソームに影響し翻訳を促進するとされている。しかし、低酸素に暴露された細胞は基本的にタンパク合成を抑制すると考えられた。そのため、RBM3 が直接翻訳に影響を及ぼすかどうか調査するため、cell-free translation system を用いて in vitro で翻訳された GFP から蛍光の増加を測定した。その結果、GFP 表現は RBM3 を負荷したもので明らかに抑制された。すなわち、RBM3 が直接リボソームと相互作用し、タンパク発現を抑制することが確認された。

RBM3 のタンパク抑制機序 : RBM3 の濃度によってタンパク発現の抑制が変化するか、様々な濃度の RBM3 を用いて調査を行った。その結果、RBM3 が濃度依存的にタンパク合成を阻害することを証明した。グラフから計算された阻害定数は 62 ± 43 nM であった。

(2) 組織発現 RBM3 の定量化

心筋細胞を慎重にホモジェナイズするように試みたが、バッファーに細胞内容物が溶解する程度のホモジェナイズは不成功に終わった。一般的に RBM3 発現が多いとされ、ホモジェナイズが容易である精巢を用いて、ホモジェナイズを行った所、ウェスタンブロッティングにてわずかな発現を確認することができたが、定量化する程の発現の差は認めなかった。

(3) 結語と考察、今後の展開

これまでの文献では生体内で RBM3 は翻訳を促進する働きを持つとされてきた。しかし、我々が今回行った実験によると、in Vitro では反対にタンパク合成を阻害する働きを行

うことが明らかとなった。また cell-free translation system での結果であり、濃度依存性に抑制したことから、mRNA もしくはリボソームへの直接的な影響があったと考えられる。生体内で逆の結果となるという、交絡因子としては miRNA の存在や、RBM3 が翻訳促進している状況において regulator として働いている可能性が推定される。

RBM3 を共免疫沈降法によって定量化するという試みは、組織をホモジェナイズするという方法に障害を認め、現実化することはできなかった。臨床医学、特に腫瘍医学の世界において RBM3 は予後の予測因子として指摘されており、前立腺癌・膀胱癌・卵巣癌・悪性黒色腫において報告がある。いずれの癌腫でも RBM3 の発現した群では予後がよいという報告である。低酸素状態や冬眠中の動物に発現する

今回我々が証明した細胞周期に対する in Vitro での RBM3 の機能や定量化の試みは、癌浸潤や低酸素及び低温という原始的な環境障害から細胞単位での個体保護を行うメカニズム解明、ストレス因子の評価の一助となると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Rihito Morita, Satomu Morita, Toshihisa Sumi, Katsuji Nishi, Yoshiko Minami and Masahito Hitosugi. Human RNA-binding motif protein 3 inhibits RNA translation *in Vitro*. Rom J Leg Med 25(1) inprinting (2017) 査読あり。
2. S Furukawa, M Kataoka, S Morita, A Uno, M Hitosugi, H Matsumoto, K Nishi. Histochemical Characteristics of Myocardium Obtained from Two huge Cardiomegaly with over 1000g in Weight. SM J Clin Med. 2016; 2(1): 1011-1015. smjournals.com/clinical-medicine/download.php?file...v2... 査読あり
3. K Nishi, S Furukawa, S Morita, M Hitosugi, L Eberle, Expression of RNA binding motif protein 3(RBM3) in the Substantia Nigra might be utilized to distinguish neck compression deaths from other deaths. Rev of Alb Leg Med. 2016, 12, 59-66. 査読あり
4. 奥長 隼, 森田沙斗武, 西 克治, 宇野亜加里, 中川季子, 古川智之, 一杉正仁. 写真画像処理ソフトウェアを用いた小脳顆粒細胞層核密度の検討. 法医病理. 2016; 22(2): 83-86. 査読あり
5. S Morita, S Furukawa, K Nishi, Classification of contraction bands using immunohistochemistry. Am J Forensic Med Pathol. 2015, 36, 23- 26, doi: 10.1097/PAF.000000000000124, 査読あり
6. S Furukawa, S Morita, I Sakaguchi, A Uno, T Nakagawa, M Hitosugi, K Nishi. Evaluation of the Progressed Stage of the Hypoxic and Ischemic Cascade Pathway in the Myocardium using Antibodies against Hypoxic Related Antigens. Journal of Advances in Life and Natural Sciences. 2015; 1 (1): 30-34. <http://nebula.wsimg.com/7e51d053fefecac6237b50c9602f1c9?AccessKeyId=638139448EC3C95C7DBE&disposition=0&lloworigin=1> 査読あり
7. S Furukawa, S Morita, L Wingefeld, M Hitosugi, K Nishi, RBM3 and CIRBP may play an important role as a vasodilator. A preliminary study.

- Review of Alb Leg Med, 2015,11,74-83,
査読あり
8. S Furukawa, S Morita, M Hltosugi, L Wingefeld, K Nishi, Histochemical difference of neurons in Substantia Nigra induces by global brain ischemia/hypoxia, Alb J Med & Helth Sci, 2015, 46, 13-20.
<http://ajmhs.umed.edu.al/> 査読あり
 9. S Morita, S Furukawa, K Nishi
Immunohistochemical evaluation of hypoxia markers in the myocardium. Aust J Forensic Sci 2014
DOI:10.1080/00450618.2014.906653.
査読あり。
 10. Furukawa S, Morita S, Wingefeld L, Matsuda W, Nakagawa T, Sakaguchi I, Takaya A, Nishi K.
Immunohistochemical staining of the brain tissue obtained from a man with multiple focal brain infarctions and different staging. Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 2014, 15(1),
http://www.anilaggrawal.com/ij/vol_015_no_001/papers/paper002.html, 査読あり

[学会発表](計6件)

1. Nishi K, Furukawa S, Morita S, Hltosugi M, Eberle L. Expression of RNA binding motif protein 3 (RBM3) in Substantia Nigra might be utilized to distinguish neck compression deaths from other deaths. 95th Annual Congress of the German Society of Legal Medicine. Rechtsmedizin. 2016; 26: p378, Hidelberg.
2. Nishi K, Furukawa S, Morita S,

- Hltosugi M, Eberle L. Expression of RNA binding motif protein 3 (RBM3) in Substantia Nigra might be utilized to distinguish neck compression deaths from other deaths. 95.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2016; Aug. 30- Sep 3, Hidelberg. Germany.
3. 西 克治, 古川智之, 森田沙斗武, 一杉正仁. 黒質細胞は, 頸部圧迫死や縊死の診断に応用出来るか. 第99次日本法医学会学術全国集会. 2015年6月10日~12日、高知市、高知県.
 4. 奥長 隼、森田 沙斗武、西 克治、宇野 亜加里、中川 希子、古川 智之、一杉 正仁, 写真画像処理ソフトを用いた、心臓突然死例における小脳顆粒細胞層核密度の組織学的検討, 第51回日本医学写真学会総会、2015年7月4日~5日、高松市、香川県.
 5. S Furukawa, S Morita, M Hltosugi, L Wingefeld, K Nishi K. Histochemical findings of neurons in substantia nigra induced by global brain ischemia/hypoxia. 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2015; Sep 12-16, Leipzig, Germany.
 6. S Furukawa, S Morita, H Okunaga, L Wingefeld, K Nishi, Rare forensic pathological findings due to variation of blood vessels in the cranial-cervical legion. 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft fuer Rechtsmedizin. 2014; Sep 11-15, Heringsdorf, Germany.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森田 沙斗武 (MORITA Satomu)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：80721894

(2)研究分担者

(3)連携研究者

森田 理日斗 (MORITA Rihito)
岡山理科大学・理学部・助教
研究者番号：10613268

(4)研究協力者