

# 博士論文

論文題目 癌細胞における RNA 結合タンパク質 IMP3 の機能解析

氏名 水谷玲菜

# 序論

生物にとって、細胞は生命を司る機関の最小単位であるという考えが古くから提唱されており、私たち人間を含む「生物」というものを理解する上においては細胞の振る舞いや細胞内で起きている現象を解明することが必要不可欠である。細胞の増殖や運動性、細胞死といった細胞の振る舞いは遺伝子発現によって制御されていることから、遺伝子発現制御機構を明らかにすることは非常に重要であると言える。実際に、遺伝子発現制御を解明すべく非常に多くの研究が遂行されてきたが、その中で見出された大きな糸口の一つとして、疾患という「遺伝子発現に異常をきたした状態」の根底にある分子メカニズムに着目したアプローチが挙げられる。私たち人間は、疾患の原因となる分子メカニズムの解明を通じて遺伝子発現制御経路を見出し、さらにメカニズムの理解のみに留まらず、治療へと応用することでその寿命を延ばすことに成功してきた。このような背景から、私は疾患の根底にある分子メカニズム理解という観点に基づいた研究アプローチにより、遺伝子発現制御の解明に貢献したいと考えるに至った。

生物は遺伝情報を DNA から RNA と転写し、さらにタンパク質へと翻訳することで遺伝子発現を行っている。原核生物では、転写と翻訳の場が同じであるためにこの2つの過程が協調して起きていたが、真核生物は核の獲得により、転写と翻訳の場を核と細胞質に分離し、転写と翻訳の2つの過程の間に様々な制御を行うことで(=転写後制御)、ゲノムから多様な mRNA を作り出すことを可能とし、遺伝子発現制御の新たな階層の

存在を提示した。つまり人間を含む真核生物の遺伝子発現制御機構を理解するためには、転写段階での制御や翻訳されたタンパク質の制御だけではなく、転写後制御機構についても明らかにする必要があるが、転写制御や翻訳後制御についての理解が次第に深まってきたのに対し不明な点が多く残されているのが現状である。転写後制御とは即ち RNA の動態制御であり、その中心的な役割を果たす因子として RNA 結合タンパク質が挙げられる。

RNA 結合タンパク質は標的 mRNA に結合し、RNA プロセッシング、修飾、細胞局在制御、翻訳、分解に至るまでの様々なステップに関与し、細胞の種類に応じて特異的に RNA の運命を制御することが分かってきている(Keene, 2007; Moore, 2005)(図 0A)。

真核生物の細胞では 500 種を超える RNA 結合タンパク質の発現が確認されており、RNA recognition motif (RRM)や K homology (KH) domain に代表される RNA 結合ドメインを有している(Cook et al., 2011)。遺伝子発現において重要な役割を果たす RNA 結合タンパク質の異常な発現や欠損は疾患と関連するのではないかと考えられ、これまでに臨床研究が盛んに行なわれ、RNA 結合タンパク質の機能異常が神経変性疾患や癌などの疾患を引き起こすことが明らかになった(Lukong et al., 2008; Musunuru, 2003)。このような臨床研究の成果は疾患データベースに登録されている。疾患データベースのひとつである Malacards database にはおよそ 17,000 のヒトの疾患とそれに関連する遺伝子発現の情報が登録されている(Rappaport et al., 2013)。Malacards

database に登録されている疾患のアノテーション情報を元に、ヒトの全ての疾患の中で RNA 結合タンパク質が有意に濃縮する疾患があるか否か、すなわち RNA 結合タンパク質との関連が統計学的に示される疾患があるか否かについて検討したところ 165 の疾患について RNA 結合タンパク質の有意な濃縮が見られた (Neelamraju et al., 2015)。RNA 結合タンパク質との関連が統計学的に示された疾患には、先行する個別研究の結果と合致するように、様々なタイプのがんや神経変性疾患、代謝異常性疾患などが含まれていた。代表例を挙げると、標的 mRNA の 5' キャップ構造を認識して結合し、翻訳の亢進を通じて腫瘍形成を促進させる eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) などが挙げられる (Lukong et al., 2008; Sonenberg and Hinnebusch, 2007)。しかしながら、eIF4E の様に標的 mRNA および癌の悪性化につながる分子メカニズムが明らかになっている RNA 結合タンパク質は稀であり、癌などの疾患との関連が示されている RNA 結合タンパク質の多くは生理機能が不明なままである。これら疾患との関連が示されている RNA 結合タンパク質の機能の解明は重要な課題となっている。

RNA 結合タンパク質の生理機能を明らかにする上で、標的 mRNA 群 (=RNA 結合タンパク質の制御下にある RNA 群) を同定することは必要不可欠である (Keene, 2007)。

RNA 結合タンパク質と相互作用する RNA を同定するための *in vitro* および *in vivo* の手法が盛んに開発されてきており、特に次世代シーケンサー解析を組み合わせることで

網羅的に RNA 結合タンパク質と相互作用する RNA 群を同定することが近年可能になってきている(Sutandy et al., 2014)。その一例として、RIP-seq (ribonucleoprotein complex immunoprecipitation followed by massive RNA-sequencing)があり、これは特定のタンパク質またはタンパク質複合体と物理的に相互作用する RNA をゲノムワイドに捉えることができる手法である(Zhao et al., 2010)。RIP-seq の利用により、Polycomb repressive complex 2, TDP-43, HuR and Argonaute proteins などの RNA 結合タンパク質と相互作用する RNA 群を同定することに成功している(Bhardwaj et al., 2013; Kanematsu et al., 2014; Mukherjee et al., 2011; Wei et al., 2014)。

疾患との関連が示唆されているにも関わらず、その生理機能の解明には至っていない RNA 結合タンパク質の代表例として、IMP3/IGF2BP3 (Insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein 3)がある。IMP3 は膵臓癌で高発現するタンパク質の大規模スクリーニングで初めて同定された RNA 結合タンパク質である(Mueller-Pillasch et al., 1997)。がん胎児性という特徴を有するタンパク質であり、成人の正常組織ではほとんど発現しないが、子宮頸癌や肺腺癌をはじめとする様々な癌組織での発現が確認されている(Bell et al., 2013; Findeis-Hosey et al., 2010; Wei et al., 2014)。また、IMP3 の高発現とがん患者の予後の悪化に相関があるという報告もなされており、IMP3 は有用な癌の悪性度のマーカータンパク質の候補として着目されてい

る(Yuan et al., 2009)。IMP3 の高発現と癌の悪性化の関係をj知るために、IMP3 を高発現させるトランスジェニックマウスを作出した結果、細胞増殖に伴う膵腺房細胞の異形成が見られ、細胞の形質転換において IMP3 が重要な役割を果たすことが示された(Wagner et al., 2003)。IMP3 は Insulin-like growth factor II messenger RNA-binding protein 3 という名前の通り IGF2 mRNA の結合タンパク質としても知られており、IGF2 mRNA の安定化を介して IGF2 を発現上昇させ細胞増殖を促進させることが報告されていたが、IMP3 による細胞の形質転換には IGF2 の安定化を介した経路は関与していないことが示唆されていた(Jeng et al., 2008)。このように癌の悪性化との関連は強く示されている IMP3 であるが、癌の進行の背景にある分子メカニズムについては不明な点が多く残されたままであった。

IMP3 には異なる遺伝子からコードされる IMP1, IMP2 という相同性の高いファミリータンパク質が存在する(Bell et al., 2013) (図 0-B)。IMP2 は広範な組織での発現が見られているが、IMP1 の発現パターンには IMP3 と同様にかん胎児性という特徴が見られている。IMP ファミリータンパク質の中で、IMP1 については比較的機能解析が進められており、胚繊維芽細胞において beta-actin の局在変化をさせること、また IGF-2 mRNA の翻訳促進や c-myc mRNA の安定化を介して癌の悪性化に関与することが報告されている(Bell et al., 2013; Farina et al., 2003; Stohr et al., 2006)。

癌細胞における IMP3 の機能を明らかにするために、IMP3 がファミリータンパク質の IMP1 と高い相同性を有するタンパク質であるという知見に基づき、IMP1 と同様に標的 mRNA の翻訳制御ならびに RNA 安定化因子としての機能に着目されてきた(Bell et al., 2013)。その結果として、U373 glioma 細胞または K562 leukemia 細胞において IMP3 が IGF-2 mRNA の翻訳促進に関与することが示された(Liao et al., 2005; Suvasini et al., 2011)。また、メカニズムについては不明であるが、IMP3 が CD44 mRNA や PDPN mRNA の安定化に関与していることも明らかとなっていた(Hwang et al., 2012; Vikesaa et al., 2006)。最も新しい知見として、IMP3 は let-7 microRNA の結合を阻害することにより HMGA2 の mRNA 分解を阻害し RNA の安定化に関与していることが報告されている(Jonson et al., 2014)。HMGA2 はがん胎児性のタンパク質であり、HMGA2 の高発現と予後の悪化・生存率の低下の相関があることが分かっている(Fedele et al., 2010)。IMP3 の発現と HMGA2 の高発現に相関が見られる癌組織も複数存在したが、乳癌や大腸癌など様々な癌組織では IMP3 と HMGA2 の発現の相関は見られなかった(Jonson et al., 2014)。このことは、癌化につながる IMP3 の生理機能として、HMGA2 mRNA の安定化だけではなく、他の標的遺伝子または他の制御メカニズムを有することを示唆している。

癌細胞における IMP3 の生理機能に関して、不明な点が多く残されていた原因として、



IMP3 の制御下にある mRNA 群の全貌が同定できていなかったことが挙げられる。また、ファミリータンパク質である IMP1 と相同性が高いという知見から、IMP1 が有する機能である RNA 安定化にしか着目してこなかった点も一因であると考えられる。本研究では癌細胞における RNA 結合タンパク質 IMP3 の機能解明を目的とし、初めに IMP3 の制御下にある標的 mRNA について次世代シーケンサー解析を取り入れたスクリーニングにより網羅的な同定を試みた。そして IMP1 と同様に RNA 安定化が IMP3 の主な機能であるのかについて検証した。さらに新しく同定された IMP3 標的 mRNA に着目し、IMP3 を介した遺伝子発現経路が細胞形質にどのような影響を与えるのかについて検討を行った。

本研究では IMP3 による癌の悪性化の背景にある分子メカニズムの理解を通じて、新たな遺伝子発現制御経路を見出すことに成功したことから、遺伝子発現機構を理解する上で、疾患と関連する RNA 結合タンパク質を解析対象とすること、特に RNA 結合タンパク質の標的 mRNA に焦点を当てた研究を遂行することが有用であることを提唱したい。

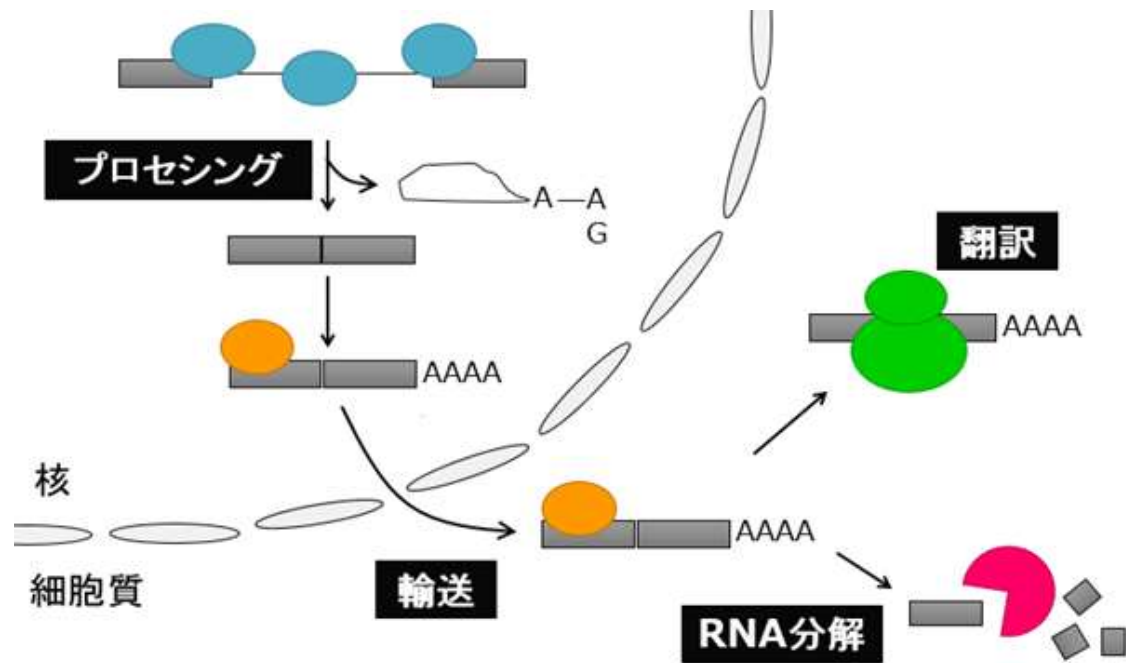
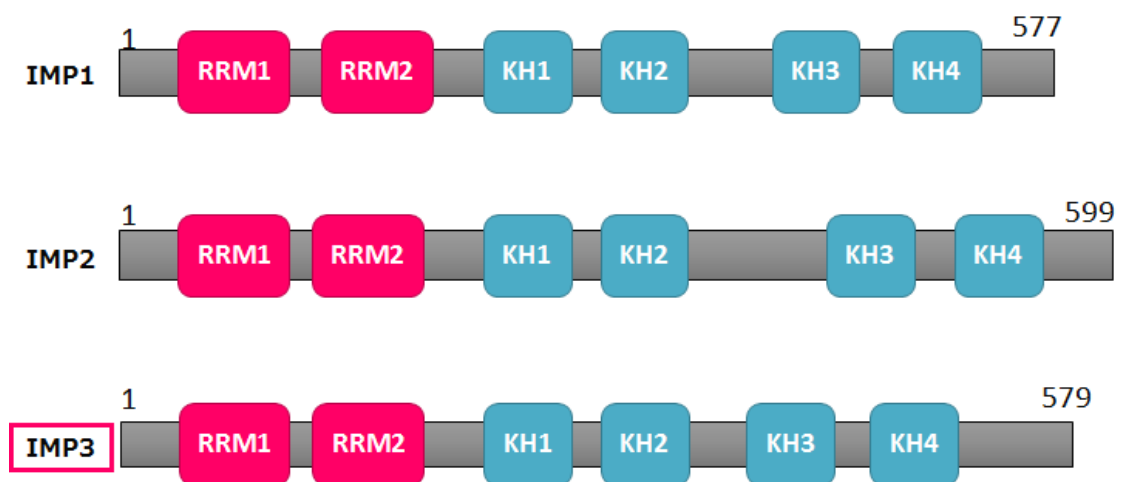


図 0-A. RNA 結合タンパクが担う多様な転写後調節機構

## IMP (IGF2 mRNA-binding protein) ファミリー



※RRM (RNA Recognition Motif)

KH (hnRNP-K Homology domain) : RNA結合ドメイン

図 0-B. IMP ファミリータンパク質の構造の模式図

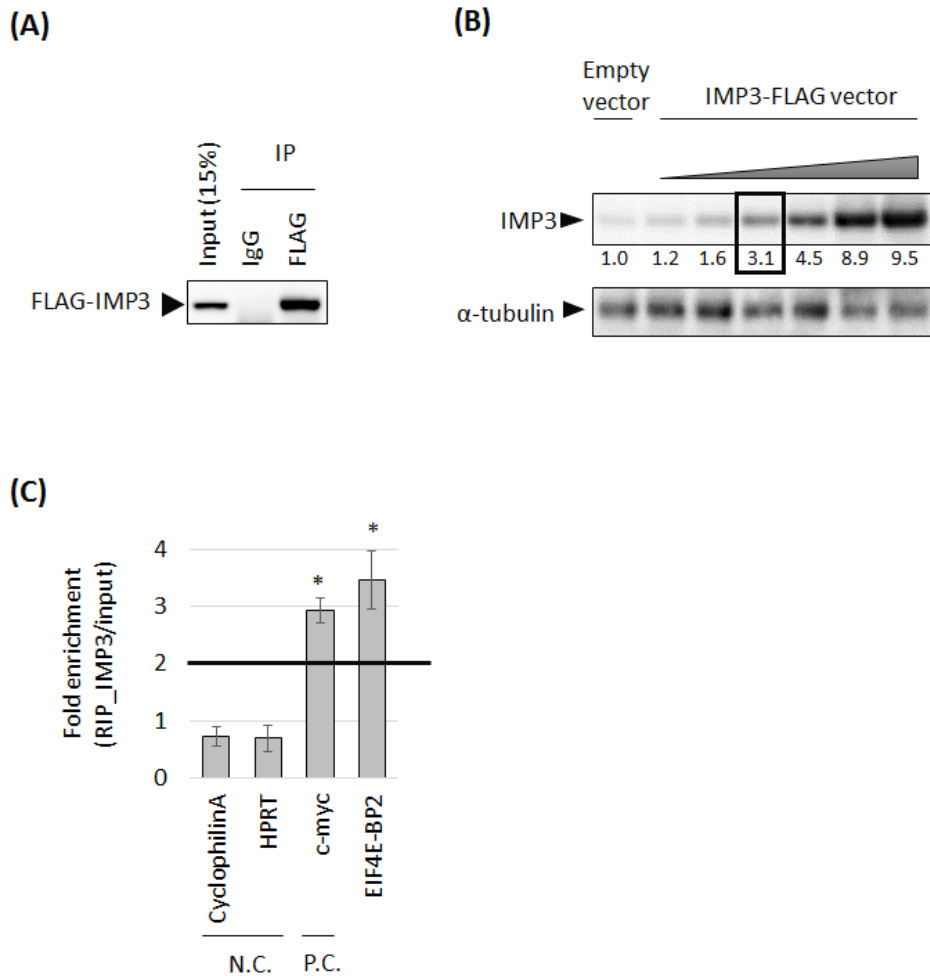
# 本論

## 第1章 IMP3 標的 mRNA の網羅的スクリーニング

### 第1節 IMP3 と結合する RNA 群の網羅的探索

IMP3 は RNA の安定化因子として働くことが予想されているタンパク質である。標的 RNA の安定性が変化すれば発現量も変化するはずであるという考えに基づき、IMP3 によって発現制御を受ける mRNA 群の同定を試みた。

IMP3 により発現制御を受ける RNA 群ならば IMP3 と物理的に相互作用するはずであると考え、RNA 免疫沈降法と次世代シーケンサーを組み合わせた手法である RIP-seq(ribonucleoprotein complex immunoprecipitation followed by massive RNA-sequencing)により、IMP3 結合 RNA の網羅的探索を行った。初めに FLAG タグを有する IMP3(FLAG-IMP3)を一過的に発現させた HeLa TO 細胞の細胞可溶化液を免疫沈降実験に供し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った(図 1A)。FLAG-IMP3 の発現量は内在性 IMP3 と比較して3倍程度の発現量であることをウェスタンブロット法により確認している(図 1B)。抗 FLAG 抗体による免疫沈降の際に共沈した RNA を回収し、次世代シーケンサーによって解析を行った。免疫沈降を行った際にインプット RNA に比べて2倍以上に濃縮された 2,201 の mRNA を IMP3 結合 mRNA であると判断した(図 3A または 3B ベン図の白い円)。RIP-seq で同定された mRNA が内在性 IMP3 と相互作用するのか否かについて検討するために、内在性の IMP3 について RIP 法を行った。抗 IMP3 抗体を用いて免疫沈降を行い共沈する RNA を回収し、RT-qPCR で定量を行ったところ、RIP-seq で同定された IMP3 結合 RNA の濃縮が見られた(図 1C)。以上の結果より、RIP-seq により IMP3 結合 mRNA を同定することができたと判断した。



## 図 1. IMP3 結合する mRNA の網羅的探索

(A) HeLa TO 細胞に FLAG-IMP3 を一過的に発現させ、マウス IgG 抗体（ネガティブコントロール）または抗 FLAG 抗体で免疫沈降したサンプルについて、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットによる検出を行った。(B) ウェスタンブロット法による FLAG-IMP3 の発現量の評価。FLAG-empty vector をトランスフェクションした際の IMP3 のバンドシグナルに対する相対値を棒の下部に記載している。本研究のトランスフェクション実験は全て、黒棒の条件(相対的なバンドシグナル値=3.1)の条件で行っている。Alpha-tubulin はローディングコントロール。(C) 抗 IMP3 抗体を用いて内在性 IMP3 の免疫沈降を行い、共沈する RNA を回収し、RT-qPCR により IMP3 の免疫沈降に伴う RNA の濃縮率を算出した。ネガティブコントロール(N.C)またはポジティブコントロール(P.C.)には先行研究で IMP3 との結合の有無が報告されている mRNA を使用している。p 値は student's t-test により算出した(\* $p < 0.01$ ,  $n = 4$ )。

## 第2節 IMP3 ノックダウン細胞における遺伝子発現プロファイル解析

2種類の異なる siRNA を用いて (siIMP3\_1, または siIMP3\_2)、IMP3 をノックダウンした HeLa TO 細胞を準備した (図 2)。コントロール細胞または IMP3 ノックダウン細胞から抽出した Total RNA を次世代シーケンサーに供し、mRNA の発現変動プロファイル解析を行った (RNA-seq)。コントロール細胞に比べて IMP3 ノックダウン細胞で 1.5 倍以上に発現減少した mRNA は 128 種 (図 3A のベン図の青色の円)、発現上昇した mRNA は 419 種存在した (図 3B のベン図の赤色の円)。

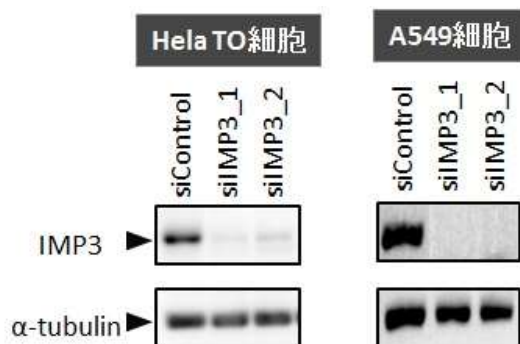


図 2. IMP3 ノックダウン効率の評価

ウェスタンブロット法による、HeLa TO 細胞 (左) または A549 細胞 (右) における IMP3 のノックダウン効率の評価。Alpha-tubulin はローディングコントロールとして使用している。

### 第3節 IMP3 により発現制御を受ける RNA 群の同定

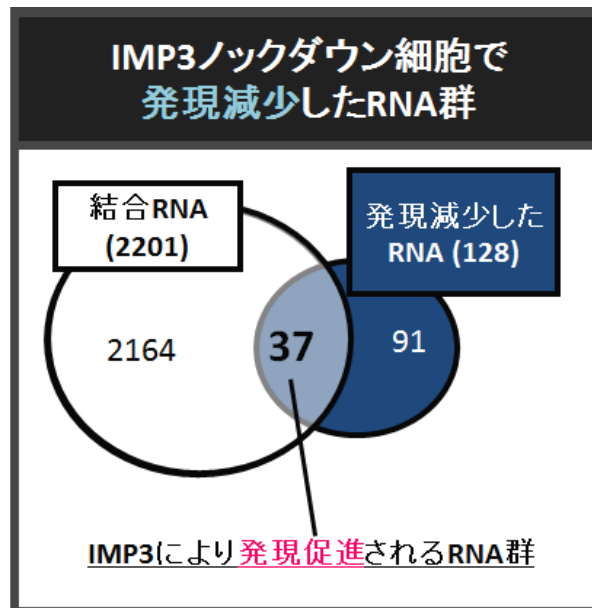
RIP-seq データと RNA-seq データを統合することにより、IMP3 結合 mRNA のうち IMP3 ノックダウン細胞で発現上昇した 37 種を IMP3 により発現促進される mRNA 群 (図 3A のベン図の白い円と青色の円の共通部分)、IMP3 結合 mRNA のうち IMP3 ノックダウン細胞で発現減少した 110 種の mRNA を IMP3 によって発現抑制される mRNA であると判断した (図 3B のベン図の白い円と赤色の円の共通部分)。

IMP3 には異なる遺伝子からコードされるファミリータンパク質である IMP1, IMP2 が存在することが報告されており (Bell et al., 2013)、IMP ファミリータンパク質は相同性が高く、機能も類似していることが予想されていた。そこで IMP3 だけではなく、IMP1, IMP2 の標的 mRNA の網羅的スクリーニングを行った (図 4, 5)。その結果 IMP1 によって発現促進される 130 種の mRNA、発現抑制される 18 種の mRNA が同定された (図 4)。IMP2 によって発現促進される mRNA は 10 種、発現抑制される mRNA は 42 種同定された (図 5)。IMP1 はこれまでに特定の mRNA の安定化因子として働くことが示唆されてきた (Stohr et al., 2006)。その知見と合致するように、今回の標的 mRNA スクリーニングの結果でも発現抑制されている mRNA よりもはるかに多くの mRNA が IMP1 によって発現促進されていることが明らかになった。一方、IMP2 と IMP3 の標的 mRNA 発現促進されるものよりも発現抑制されるものの方が多く見出された。このことから IMP2, IMP3 は RNA 安定化ではなく、RNA 分解において大きな影響を与える因子であることが可能性が考えられる。

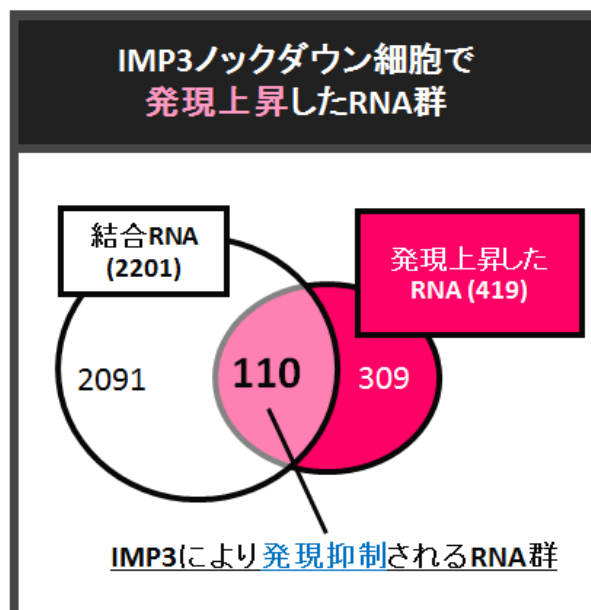
さらに、IMP ファミリータンパク質の標的 mRNA 群の中で共通するものがいくつ存在するのかを調べた (図 6)。その結果、IMP ファミリータンパク質の標的 mRNA の多くは共通していないことが明らかになった。



(A)



(B)



### 図3. IMP3 標的 mRNA スクリーニングの結果

トランスクリプトーム解析により同定された IMP3 標的 mRNA 群。RIP-seq により同定された IMP3 結合 mRNA(白い円)と RNA-seq の結果 IMP3 ノックダウンにより発現変動した mRNA (青色、赤色の円) の数がそれぞれ示されている。(A) IMP3 によって発現促進される (=IMP3 ノックダウンで発現減少する) mRNA 群 (B) IMP3 によ

って発現抑制される（=IMP3 ノックダウンで発現上昇する） mRNA 群。

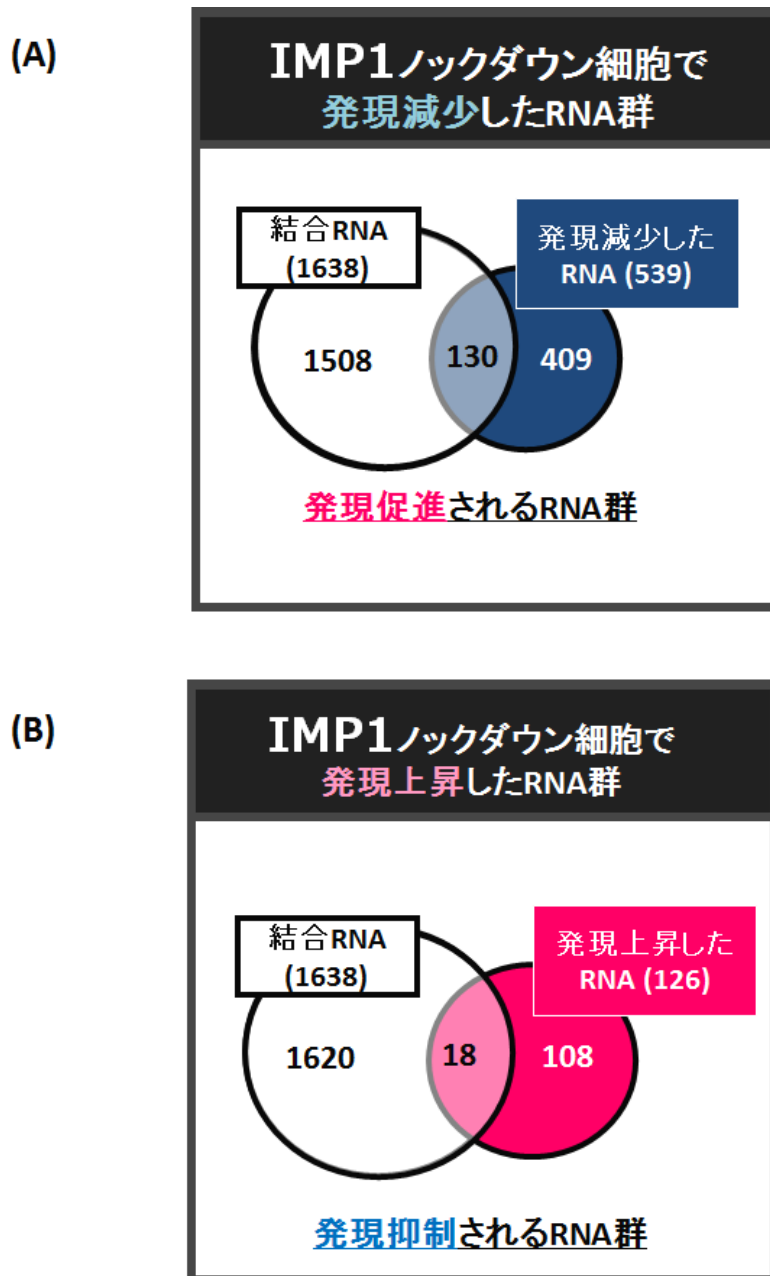
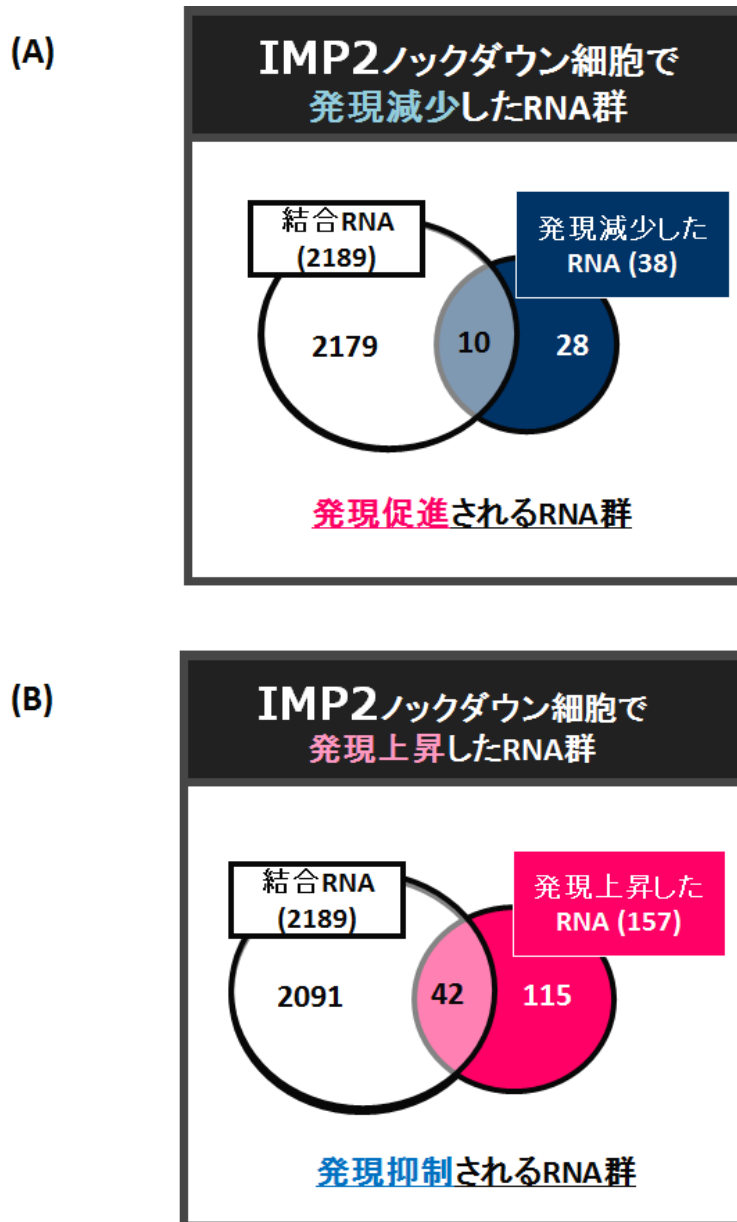


図4. IMP1 標的 mRNA スクリーニングの結果

トランスクリプトーム解析により同定された IMP1 標的 mRNA 群。RIP-seq により同定された IMP1 結合 mRNA(白い円)と RNA-seq の結果 IMP1 ノックダウンにより発現変動した mRNA (青色、赤色の円) の数がそれぞれ示されている。(A) IMP1 によっ

て発現促進される（=IMP1 ノックダウンで発現減少する） mRNA 群 (B) IMP1 によって発現抑制される（=IMP1 ノックダウンで発現上昇する） mRNA 群。

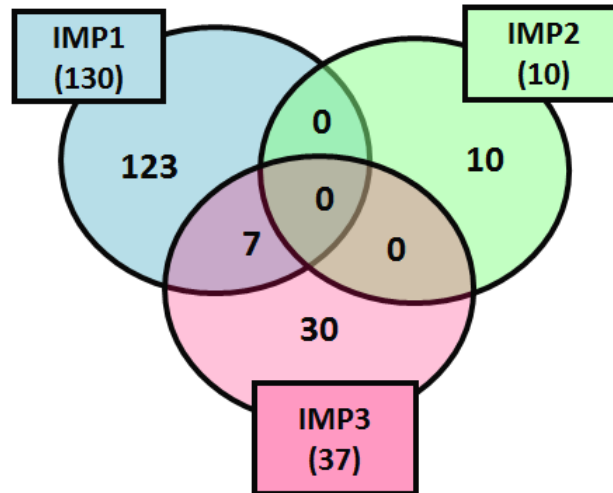


## 図 5. IMP2 標的 mRNA スクリーニングの結果

トランスクリプトーム解析により同定された IMP2 標的 mRNA 群。RIP-seq により同定された IMP2 結合 mRNA(白い円)と RNA-seq の結果 IMP2 ノックダウンにより発現変動した mRNA (青色、赤色の円) の数がそれぞれ示されている。(A) IMP2 によっ

て発現促進される (=IMP2 ノックダウンで発現減少する) mRNA 群 (B) IMP2 によって発現抑制される (=IMP2 ノックダウンで発現上昇する) mRNA 群。

(A) IMPsによって発現促進されるRNA



(B) IMPsによって発現抑制されるRNA

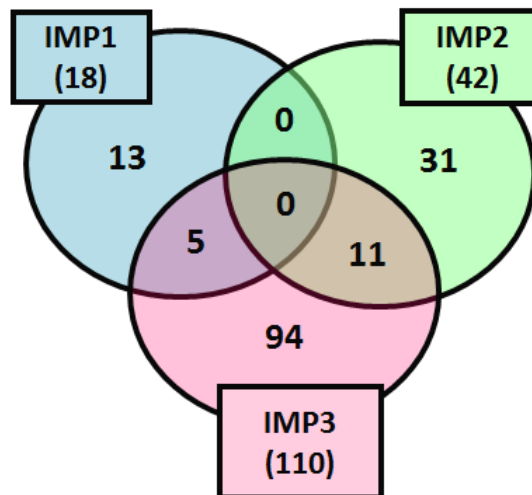


図 6. IMPs 間での標的 mRNA の比較

IMP1 (青), IMP2 (緑)、IMP3 (ピンク) の標的 mRNA の中で共通する mRNA の数をベン図によって示した。(A) IMPs によって発現促進される mRNA 群 (=IMPs に結合し、且つ IMPs ノックダウンで発現減少する mRNA 群)、(B) IMPs によって発現

抑制される mRNA 群 (=IMPs に結合し、且つ IMPs ノックダウンで発現上昇する mRNA 群)。

これまでに IMP3 は IMP1 と同様に RNA の安定化因子として働くと考えられており、先行研究では IMP3 が CD44 mRNA や HMGA2 mRNA の安定化に関与することが報告されていたことから(Jonson et al., 2014; Vikesaa et al., 2006)、標的 mRNA のスクリーニングの結果 IMP3 によって発現促進される mRNA が多く同定されることが期待された。しかし、標的 mRNA スクリーニングの結果、IMP1 と共通する標的 mRNA は少なく、さらに予想に反し多くの mRNA が IMP3 によって発現抑制されていることが明らかになった。この結果より、IMP3 の機能は IMP1 の機能とは独立して考える必要があり、IMP3 が RNA 抑制因子として働くという新たな機能に着目することでこれまでの研究では明らかにすることができなかった IMP3 の癌細胞における生理機能の解明につながるのではないかと考えた。

IMP3 により発現抑制される標的 mRNA の RNA-seq の結果、すなわち IMP3 ノックダウン細胞で発現上昇するという結果は、発現変動が大きかった上位 15 種の mRNA について RT-qPCR により再現性を確認している(図 7A)。また、これら 15 種の IMP3 標的 mRNA の IMP3 ノックダウンによる発現上昇は A549 細胞でも確認された(図 7B)。

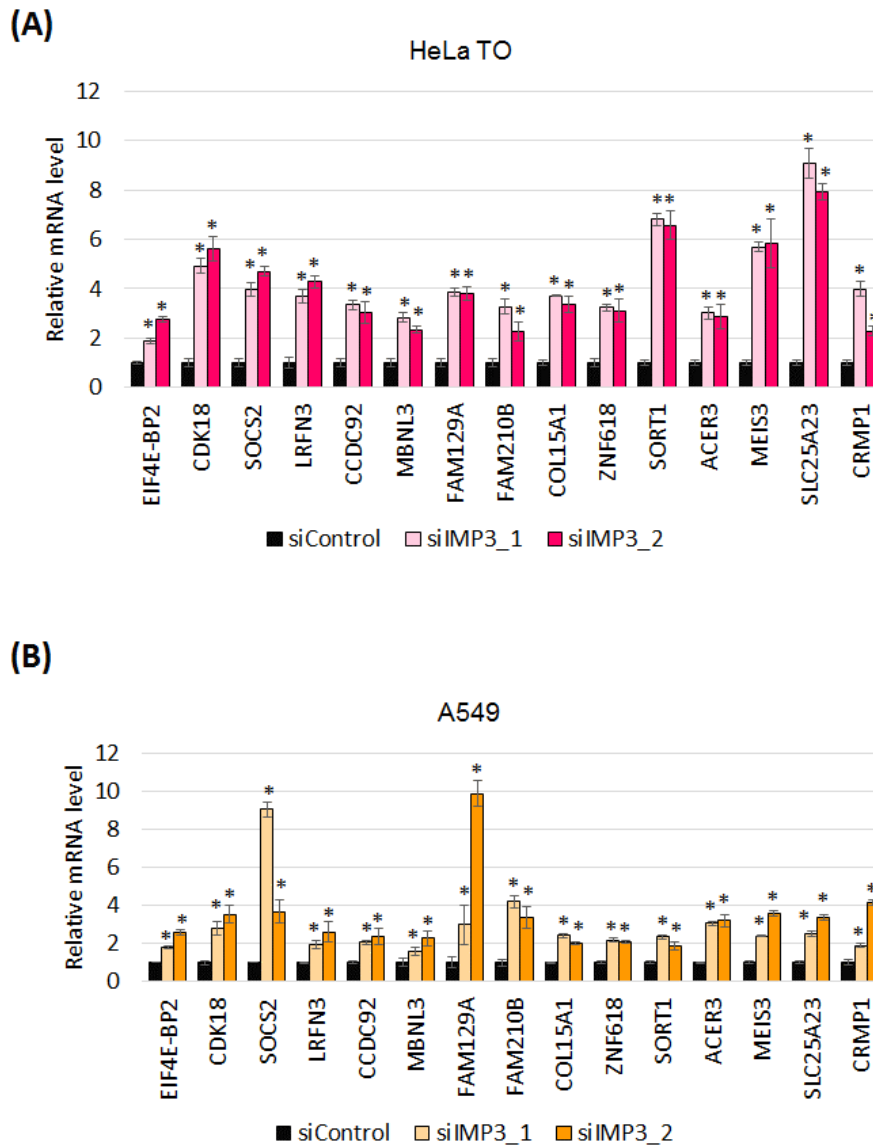


図 7. IMP3 ノックダウン細胞で発現上昇が見られた mRNA

IMP3 標的 mRNA スクリーニングの結果同定された IMP3 によって発現抑制される mRNA 群のうち、RNA-seq の結果 IMP3 ノックダウンによる発現変動が大きかった上位 15 種の mRNA について、RNA-seq 解析の再現性の確認を行った。(A) HeLa TO 細胞および (B) A549 細胞で IMP3 をノックダウンし、Total RNA を回収、RT-qPCR により RNA レベルでの発現量を定量した。値は GAPDH mRNA の発現量でノーマラ

イズしており、p 値は students' t-test により算出した(\* $p < 0.01$ ,  $n = 4$ )。

### 第3節 IMP3 と直接結合する mRNA 群の同定

IMP3 標的 mRNA スクリーニングに使用した手法である RIP 法では、原理上、IMP3 と直接結合する RNA の他に他の因子を介在して IMP3 と間接的に結合する RNA も得られる。IMP3 と直接結合する mRNA の方が IMP3 の寄与率が高いのではないかと考え、次に IMP3 標的 mRNA が IMP3 と直接結合するか否かについて、CLIP 法を用いて検討を行った。CLIP 法は UV 照射することにより RNA とタンパク質をクロスリンクさせた細胞を用いて標的タンパク質と直接相互作用する mRNA を同定する手法である (図 8)。次世代シーケンサー解析の結果同定された IMP3 によって発現抑制される mRNA のうち、IMP3 ノックダウン細胞での発現変動が大きかった上位 15 種について CLIP 法を用いて IMP3 との直接の相互作用の有無について検証した。IMP3 標的 mRNA のうち EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA はポジティブコントロールである c-myc mRNA と同様に IMP3-CLIP による RNA の濃縮が見られたことから、これらは IMP3 に直接結合する mRNA であると判断した(図 9)。



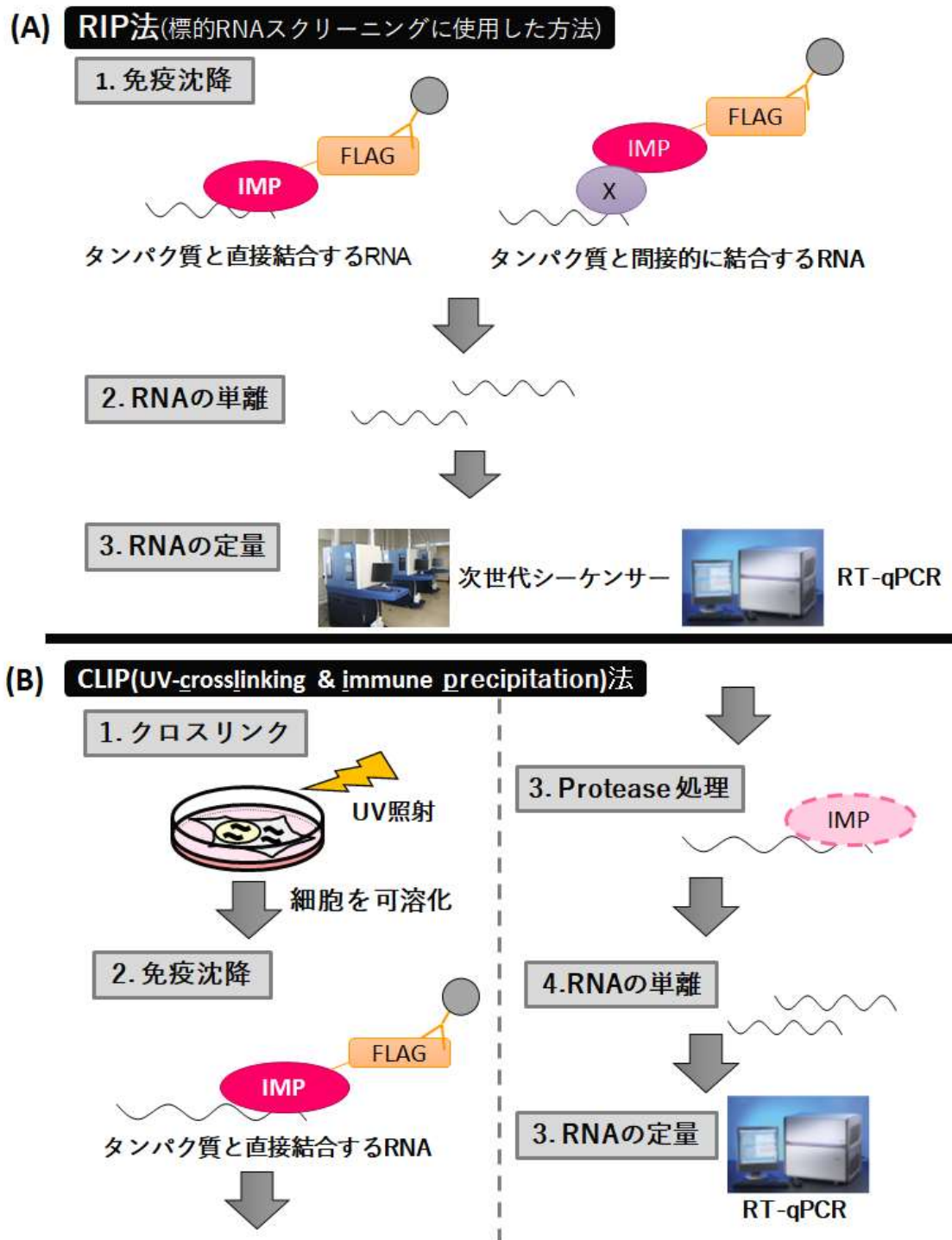
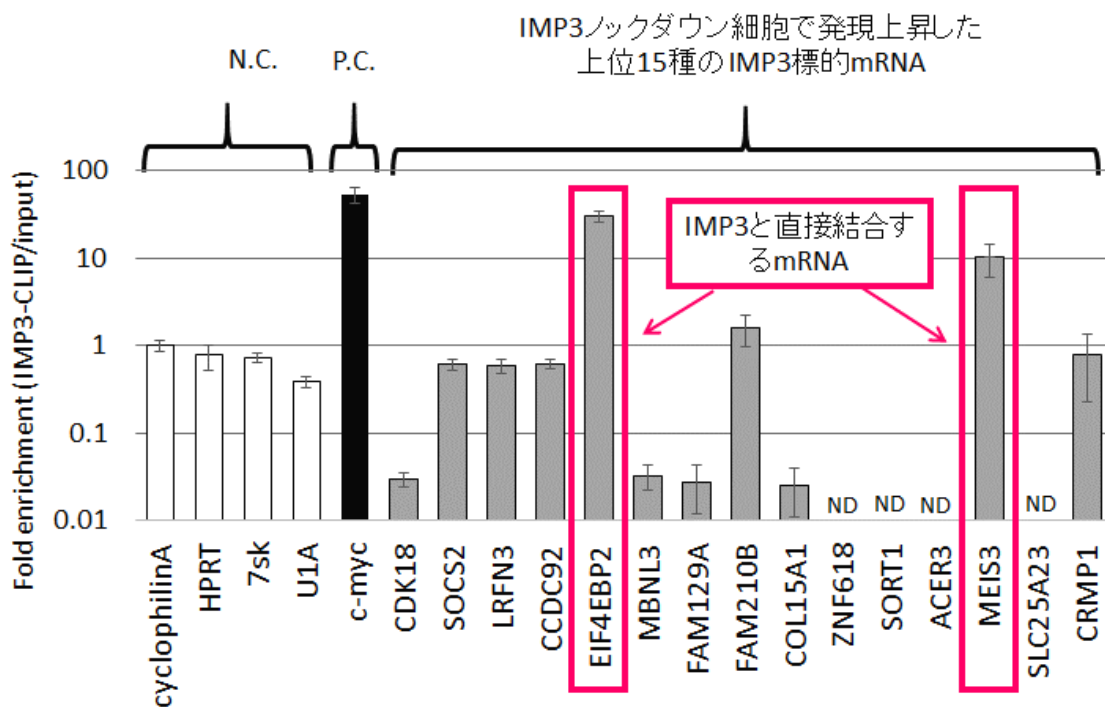


図 8. RIP 法と CLIP 法の違い

(A) RIP法 (IMP3 標的 mRNA スクリーニングに使用した結合 RNA 同定法) と (B) CLIP

法の手順を模式的に示している。



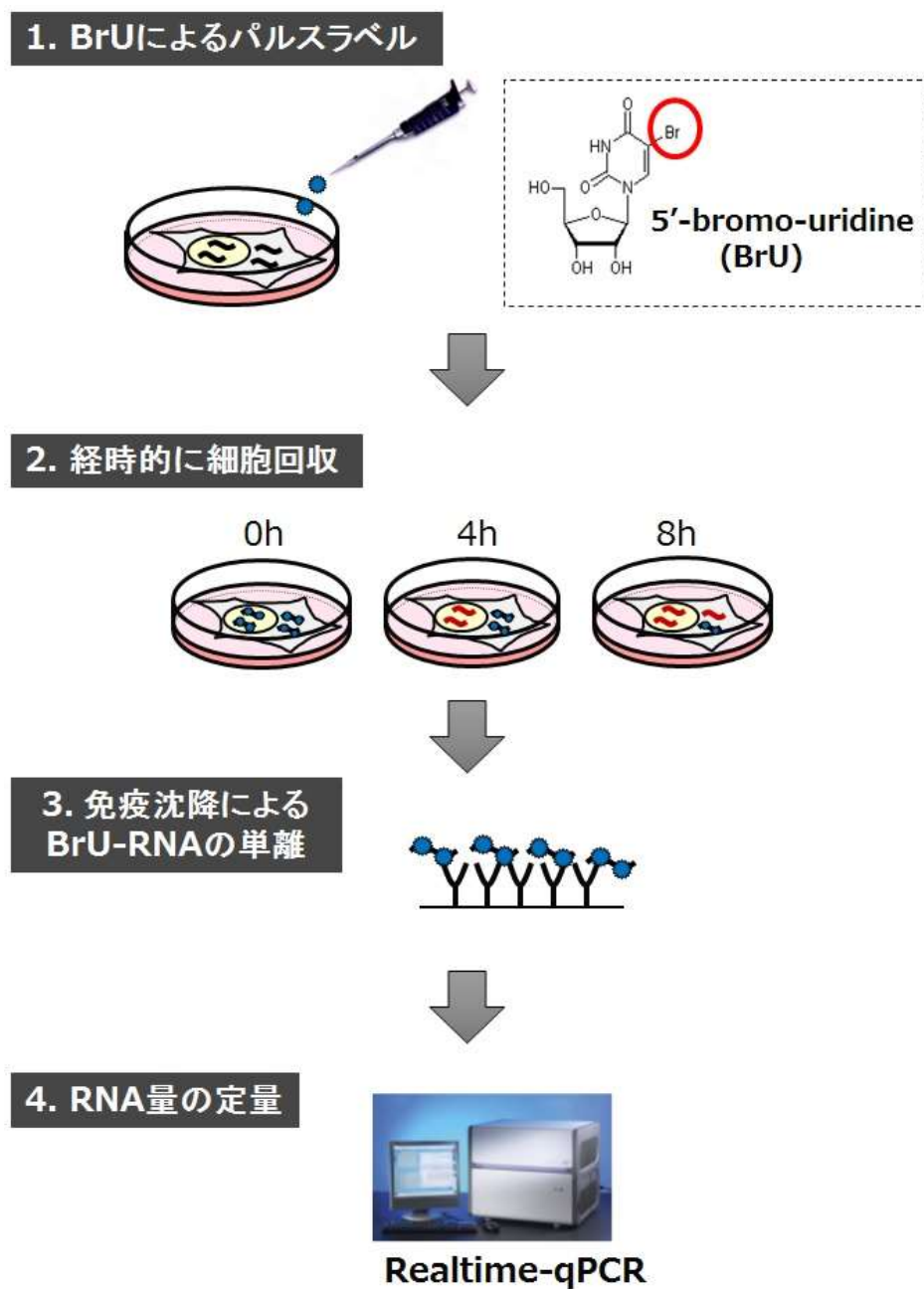
**図 9. IMP3 と標的 mRNA が直接結合するか否かの検討実験**

HeLa TO 細胞に FLAG-IMP3 を発現させ、UV 照射(360nm)によりタンパク質と RNA をクロスリンクさせた後、細胞ライセートを回収した。細胞ライセートは強い変性条件の下、調製された。この細胞ライセートを抗 FLAG 抗体による免疫沈降に供し、共沈した RNA を回収し RT-qPCR による定量を行い input に対する免疫沈降後の RNA の濃縮率を算出した。ネガティブコントロール(N.C)またはポジティブコントロール(P.C.)には先行研究で IMP3 との結合の有無が報告されている mRNA を使用している。

## 第2章 IMP3による標的 mRNA の発現制御機構の解明

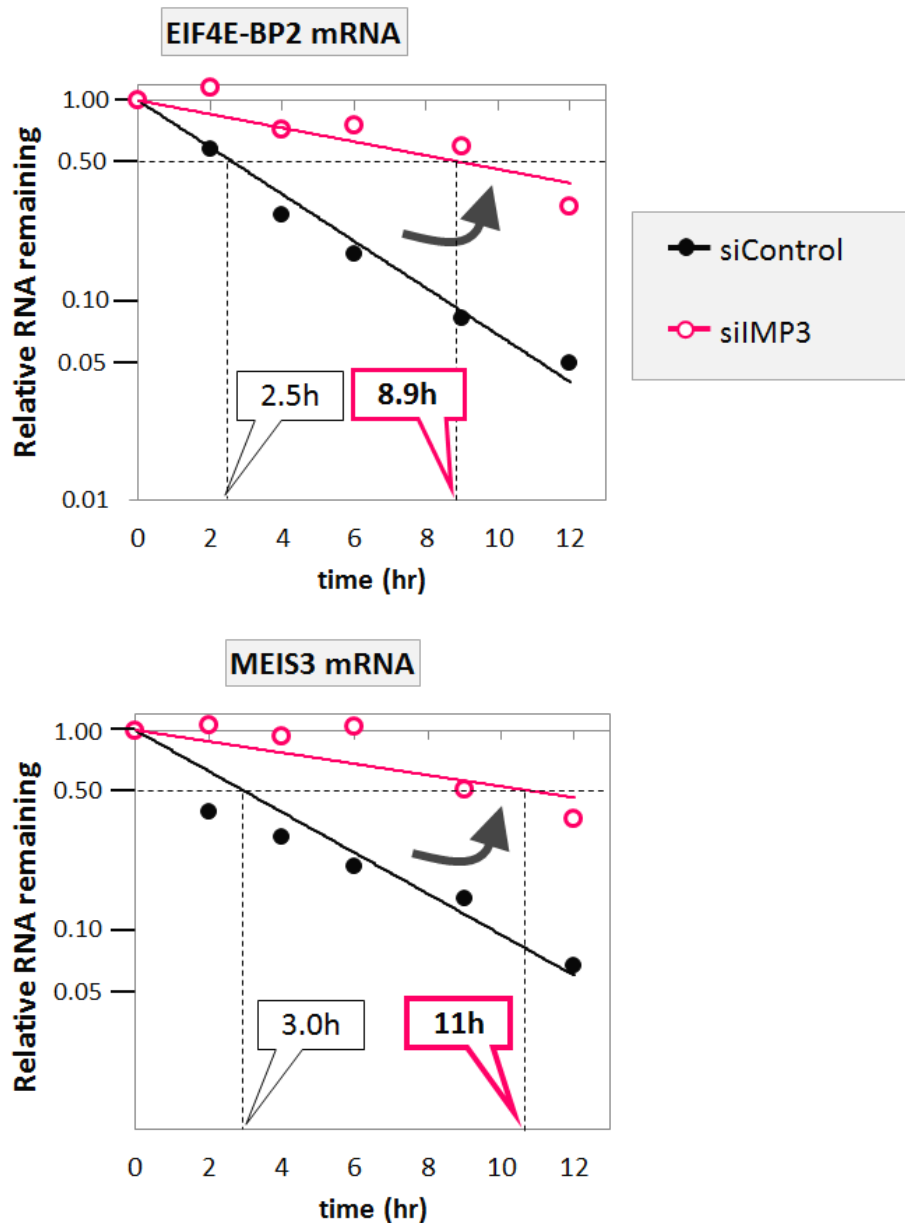
### 第1節 IMP3 標的 mRNA の RNA 分解の測定

第1章の IMP3 標的 mRNA の網羅的スクリーニングの結果、予想に反して IMP3 が多くの mRNA を発現抑制していることが見出された。私は次に、IMP3 がどのようにして標的 mRNA の発現抑制を行っているのかについて解析を行うことにした。RNA の発現量は主に転写と分解のバランスで規定されている。IMP3 が標的 mRNA に結合していることから、転写レベルではなく転写後調節機構である分解レベルで標的 mRNA の分解を制御し、発現抑制を行っているのではないかという仮説を立てた。これを検証するために、当研究室で開発した新規 RNA 分解測定法である BRIC 法 (Tani et al., 2012)を用いて IMP3 標的 mRNA の RNA 分解を測定した。BRIC 法は uridine のアナログである 5'-bromouridine (BrU)を用いて新規合成される RNA をパルスラベルし、BrU 標識された RNA を継時的に回収し、各タイムポイントにおける BrU 標識 RNA 量を RT-qPCR により定量することで RNA の半減期を算出する手法である(図 10)。IMP3 標的 RNA として同定された EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA について BRIC 法を用いてコントロール細胞または IMP3 ノックダウン細胞における RNA の半減期を測定した。コントロール細胞における EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA の半減期はそれぞれ 2.5 時間、3 時間であったのに対し、IMP3 ノックダウン細胞における半減期はそれぞれ 8.9 時間、11 時間であったことから、これら 2 種の mRNA は IMP3 ノックダウンにより RNA の安定化が起きていると判断した(図 11)。



Tani H, et al. *Genome Res.* (2012)

図 10. 転写阻害剤を使用しない新規分解測定法である BRIC 法



**図 11. IMP3 ノックダウンによる IMP3 標的 mRNA 安定性の変化**

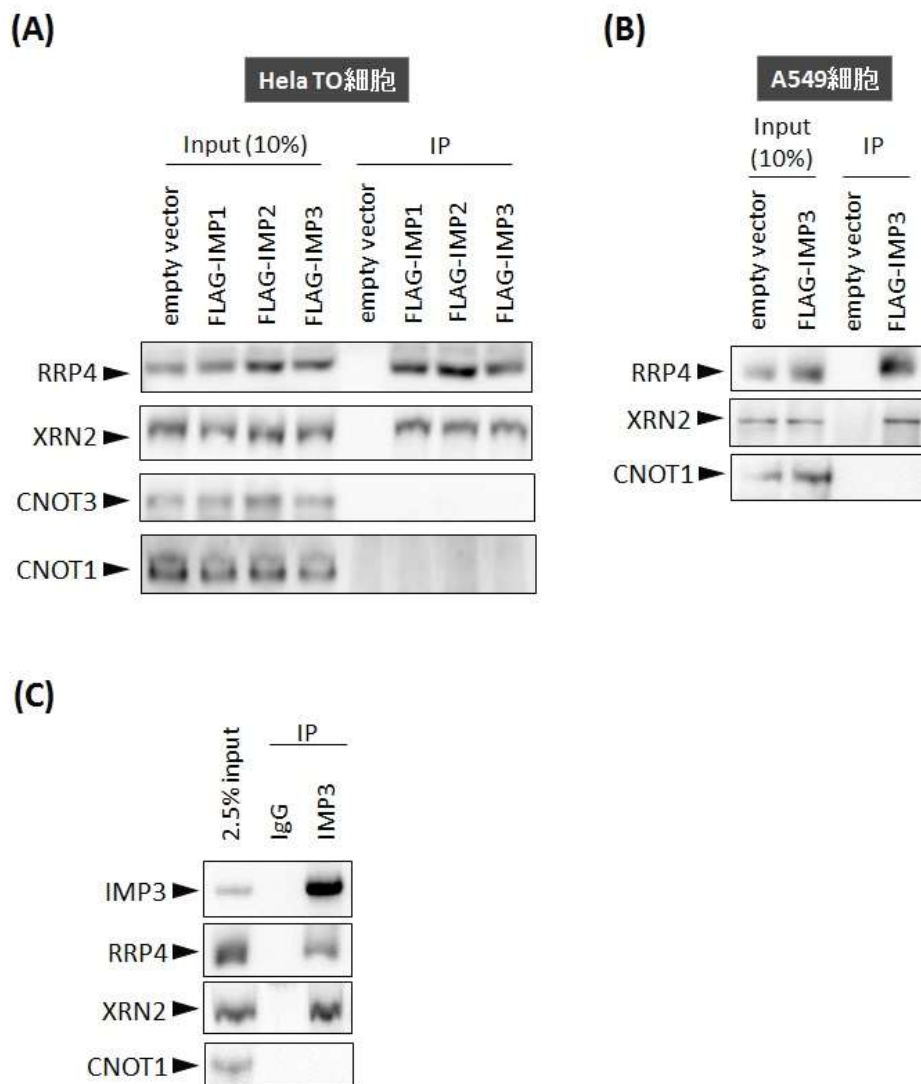
HeLa TO 細胞に siControl または siIMP3 をトランスフェクションし IMP3 標的 mRNA である EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA の分解を BRIC 法により測定した。黒線はコントロール細胞、赤線は IMP3 ノックダウン細胞における RNA 分解曲線を示してい

る。半減期は最小二乗法により算出した。

## 第2節 IMP3 と相互作用する RNA 分解因子の同定

IMP3 ノックダウン細胞における IMP3 標的 mRNA の分解速度の測定の結果から、IMP3 が RNA 分解に関与することが示唆された。しかしながら、IMP3 のアミノ酸配列には RNA 分解ドメインが見出されなかったことから、IMP3 自身には RNA 分解活性がないことが予想される。そこで私は、IMP3 は何らかの RNA 分解因子と相互作用することで標的 mRNA の分解に寄与しているのではないかと考えた。FLAG-IMP3 をトランスフェクションした HeLa TO 細胞の細胞可溶化液を免疫沈降実験に供し、RNase 存在下で抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った時に RNA 分解因子が共沈するか否かについてウェスタンブロット法により検討を行ったところ、RRP4(3'-5' エキソヌクレアーゼ複合体の構成因子のひとつ)、XRN2(5'-3' エキソヌクレアーゼ)の共沈が HeLa TO 細胞、A549 細胞において確認された(図 12A)。この時、CNOT1, CNOT3 (いずれも CCR4-NOT deadenylase 複合体の構成因子)は IMP3 との共沈は見られなかった。A549 細胞の細胞可溶化液を調製し同様の実験を行った結果、A549 細胞においても IMP3 と RRP4,XRN2 との共沈が見られた(図 12B)。内在性 IMP3 が RRP4 や XRN2 と相互作用するか否かを知るために、抗 IMP3 抗体を用いて共免疫沈降実験を行った結果、内在性 IMP3 を免疫沈降した時にも IMP3 と RRP4,XRN2 との共沈が確認された(図 12C)。

以上の結果より、IMP3 と RRP4, XRN2 が物理的に相互作用することが示唆された。



**図 12. IMP3 と RNA 分解因子の物理的な相互作用の有無**

共免疫沈降実験により IMP3 と RNA 分解因子の間に物理的な相互作用が見られるか否かを検討した。(A) HeLa TO 細胞に empty vector または FLAG-IMP を発現させ、細胞可溶化液を RNaseA+RNaseT1 で処理した後、抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、パネルの左側に示している抗体を用いてウェスタンブロットを行った。(B) A549 細胞において、(A) と同様の実験を行った。(C) HeLa 細胞から細胞可溶化液を調整し、RNaseA+RNaseT1 で処理した後、抗 IMP3 抗体で免疫沈降し、パネルの左側に示して



いる抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

IMP3 標的 mRNA の分解において RRP4 と XRN2 のどちらの寄与が大きいのかを明らかにするために、RNA 分解因子をノックダウンした細胞における EIF4E-BP2 mRNA (IMP3 分解標的 mRNA のひとつ)の発現変動の解析を行った。RRP4, XRN2 のシングルノックダウン細胞では EIF4E-BP2 mRNA はほとんど発現変動しなかったが、RRP4+XRN2 のダブルノックダウン細胞では EIF4E-BP2 mRNA の発現量は 2 倍以上に発現上昇した(図 13A)。

さらに、IMP3 シングルノックダウン細胞、IMP3+RRP4 ダブルノックダウン細胞または IMP3+XRN2 ダブルノックダウン細胞における EIF4E-BP2 mRNA の発現量を評価したところ、IMP3 シングルノックダウン細胞と比較してダブルノックダウン細胞でのさらなる発現上昇は見られなかった(図 13B)。これらの結果から、IMP3 は RRP4 や XRN2 を標的 mRNA 上にリクルートして RNA 分解に関与しているということが示唆された。

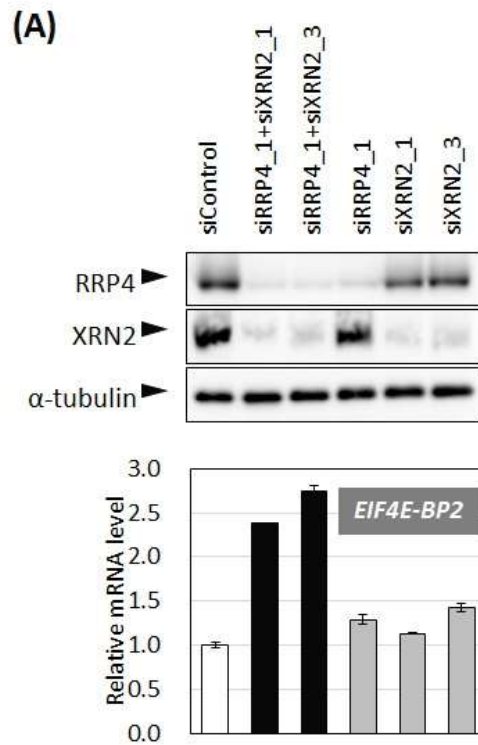


図 13. RNA 分解因子ノックダウン細胞における IMP3 標的 RNA の発現変動

(A) RRP4+XRN2 ダブルノックダウン細胞における EIF4E-BP2 mRNA の発現量を RT-qPCR により定量した。発現量は GAPDH mRNA によってノーマライズしており、エラーバーは 2 回の実験間の実験誤差を示している (下図)。RRP4, XRN2 のタンパク質レベルでの発現量はウェスタンブロットにより確認した。Alpha-tubulin はローディングコントロールとして使用した (上図)。

(B)

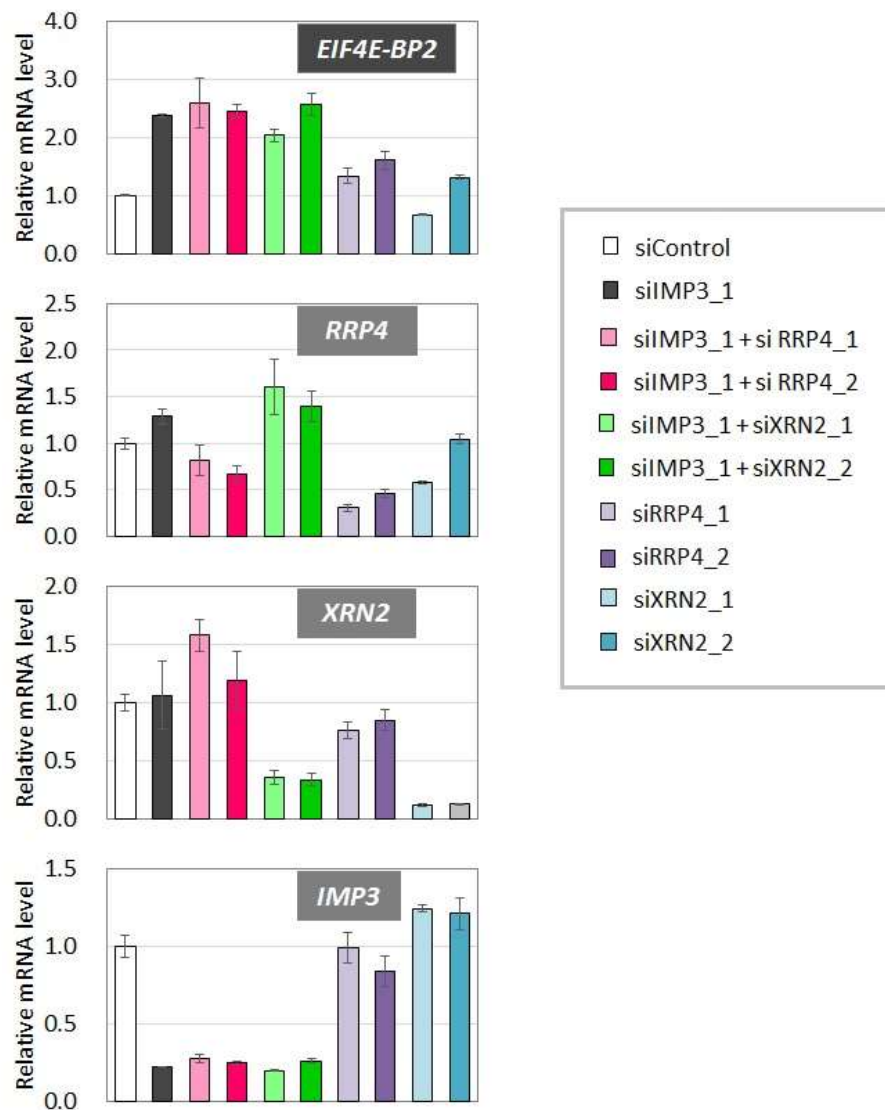
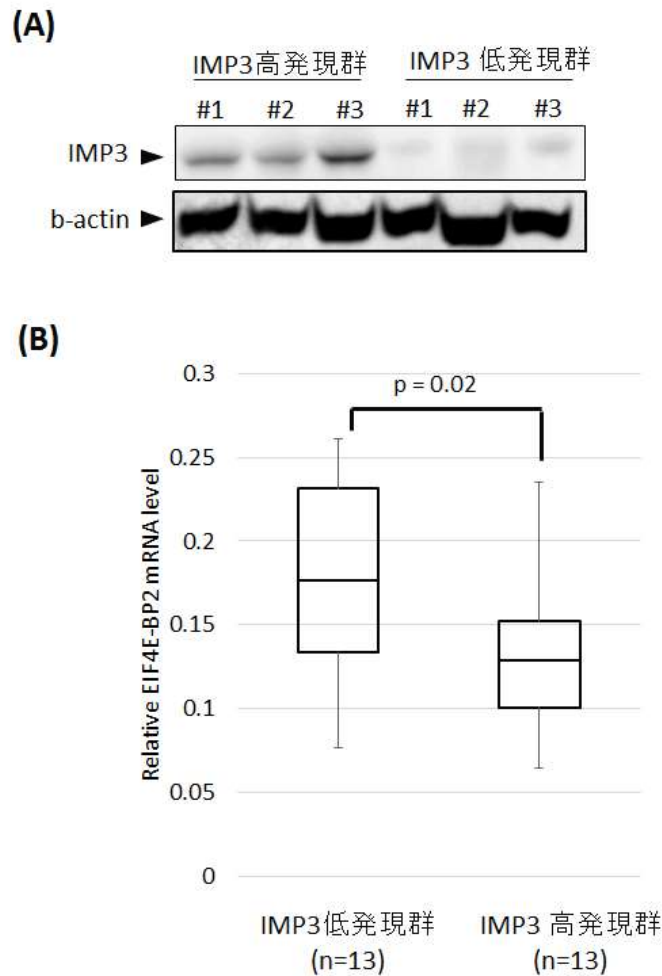


図 13. RNA 分解因子ノックダウン細胞における IMP3 標的 RNA の発現変動

(B) IMP3+RNA 分解因子(RRP4 または XRN2)ダブルノックダウン細胞における EIF4E-BP2 mRNA の発現量を RT-qPCR により定量した (一番上)。IMP3, RRP4, XRN2 のノックダウン効率についても RT-qPCR により確認している (下3つ)。発現量は GAPDH mRNA によってノーマライズしており、エラーバーは2回の実験間の実験誤差を示している。

### 第3章 ヒト臨床癌組織において IMP3 と標的 mRNA の発現量は逆相関する

これまでの実験で示された IMP3 による標的 mRNA の分解が、培養細胞だけでなくヒト臨床癌組織でも成立するか否かについて検討を行った。ヒト肺腺癌組織 27 症例から Total RNA を抽出し IMP3 の mRNA レベルでの発現量を RT-qPCR により定量した。27 症例全ての IMP3 の発現量の中央値と比較して発現量が高いサンプルを IMP3 高発現群、発現量が低いサンプルを IMP3 低発現群とした。IMP3 高発現群、IMP3 低発現群におけるタンパク質レベルでの IMP3 の発現量はウェスタンブロット法により評価しており、IMP3 高発現群組織では低発現群に比べてタンパク質レベルでも IMP3 の発現量が高いことが確認された(図 14A)。これら肺腺癌組織における IMP3 の分解標的 mRNA である EIF4E-BP2 mRNA の発現量を RT-qPCR で定量したところ、IMP3 低発現群に比べて IMP3 高発現群では EIF4E-BP2 mRNA の発現量が有意に低下していた(図 14B)。この結果はヒト肺腺癌組織においても IMP3 が EIF4E-BP2 mRNA の発現抑制をしているという私の仮説をサポートするものであり、標的 mRNA に着目することで IMP3 の癌細胞における機能の理解につながることを期待される。



**図 14 ヒト肺腺癌組織における IMP3 と標的 mRNA の発現量の逆相関**

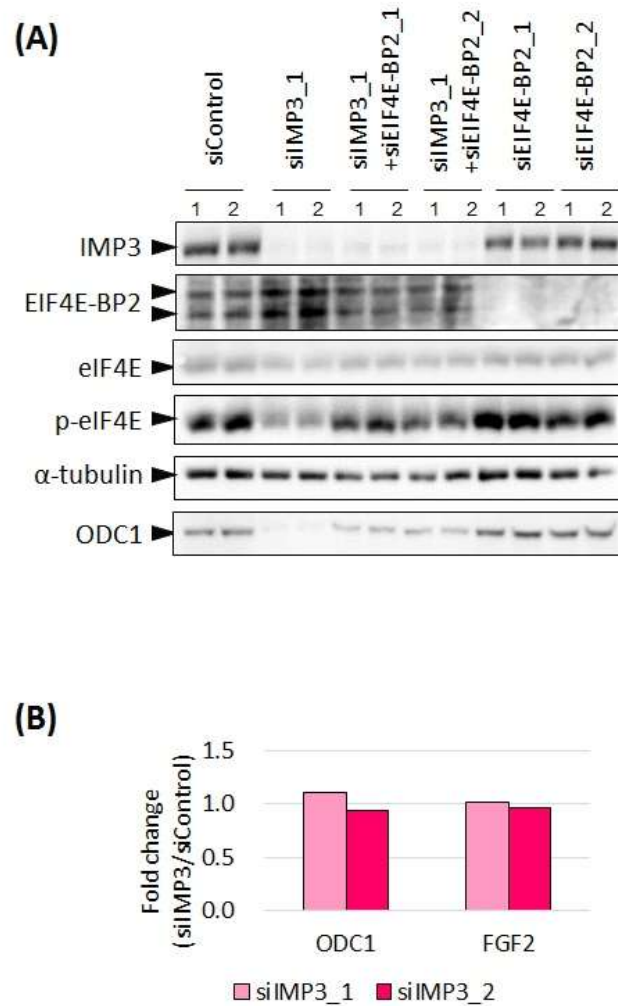
(A) ウェスタンブロットによる、ヒト肺腺癌組織の IMP3 高発現群(左 3 レーン)と IMP3 低発現群(右 2 レーン)における IMP3 の発現量の評価。Beta-actin はローディングコントロールとして使用した。(B) ヒト肺腺癌組織における EIF4E-BP2 mRNA(= IMP3 分解標的 mRNA)の相対的な発現量をボックスプロットにより示した。ヒト肺腺癌組織(n=27)から Total RNA を抽出し、RT-qPCR により IMP3 mRNA, EIF4E-BP2 mRNA の発現量を定量した。RNA の発現量は PGK1 mRNA, beta-actin mRNA の相乗平均地でノーマライズしている。IMP3 mRNA の発現量の中央値を基準にして IMP3 高発現群と IMP 低発現群の 2 群に分けた。P 値はウィルコクソン順位和検定により算

出した。

## 第4章 IMP3はEIF4E-BP2の発現抑制を介してeIF4Eの翻訳活性を促進する

### 第1節 IMP3はEIF4E-BP2の発現抑制を介してリン酸化eIF4Eを発現上昇させる

癌細胞におけるIMP3の生理機能を理解するために、分解標的 mRNA の機能に着目することにした。IMP3の分解標的として同定されたEIF4E-BP2 mRNA からコードされるタンパク質は翻訳開始因子eIF4Eに結合することでeIF4Eを翻訳開始複合体から隔離し、5'キャップ依存的な翻訳を抑制することが報告されている(Richter and Sonenberg, 2005)。eIF4Eは翻訳開始の律速を決定づける因子であり、eIF4Eは翻訳開始複合体を形成した後209番目のセリン残基(S209)のリン酸化を受け、このeIF4EのS209リン酸化が癌化の亢進に寄与することも明らかとなっている(Furic et al., 2010)。また、さまざまな先行研究によりEIF4E-BP2の活性の変化がeIF4Eのリン酸化状態を変化させるということが分かってきている。その一例として、EIF4E-BP2の発現抑制がeIF4Eのリン酸化を引き起こすという報告がある(Müller et al., 2013)。先行研究の報告と私のデータに基づいて、IMP3がEIF4E-BP2の発現抑制を介してeIF4Eを活性化させているのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、IMP3ノックダウン細胞におけるリン酸化eIF4E(S209)の発現量をウェスタンブロットにより評価した結果、IMP3ノックダウン細胞においてリン酸化eIF4Eの発現低下が見られた(図15A, 上から4番目)。IMP3シングルノックダウン細胞で見られたリン酸化eIF4Eの発現低下は、IMP3+EIF4E-BP2ダブルノックダウン細胞で回復が見られた(図15A, 上から4番目)。



## 図 15. IMP3 ノックダウン細胞における eIF4E 活性の変化

(A) HeLa TO 細胞において IMP3, EIF4E-BP2 をノックダウンした時の eIF4E、リン酸化 eIF4E(p-eIF4E), ODC1(= eIF4E によって翻訳制御を受ける因子)の発現量をウェスタンブロットによって確認した。Alpha-tubulin はローディングコントロールとして使用している。(B) IMP3 ノックダウン細胞における、eIF4E 制御下の mRNA の発現変動の有無を RNA-seq の結果より評価した。



## 第2節 IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E 制御下 mRNA の翻訳効率を促進させる

本章第1節で、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E のリン酸化を促進させていることが示唆された。この結果から、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を亢進させている可能性が考えられる。そこで、mRNA の翻訳効率を評価する手法であるポリソームプロファイリング解析により IMP3 シングルノックダウン細胞または IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞における eIF4E 制御下の mRNA の翻訳効率を調べた。ポリソームプロファイリング解析は細胞質画分をショ糖密度勾配遠心により結合するリボソームの数に基づいて mRNA を分画し、各フラクションにおける RNA 量を RT-qPCR により定量することで翻訳効率を調べる手法である(図 16)。eIF4E によって翻訳制御を受けることが報告されている ODC1 mRNA, VEGFA mRNA, FGF2 mRNA(Graff et al., 1997; Kevil et al., 1996; Nathan et al., 1997)はコントロール細胞におけるピーク(図 17 の黒矢印)に比べて IMP3 シングルノックダウン細胞ではピークが重いフラクションから軽いフラクションへと移動した(図 17 のピンク矢印)。IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では軽いフラクションから重いフラクションへとピークが移動していた(図 17 の青色矢印)。この結果は IMP3 ノックダウンで低下した eIF4E 制御下 mRNA の翻訳効率が IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンで回復したことを示している。eIF4E の制御下でない mRNA である alpha-tubulin mRNA の分布はコントロール細胞と IMP3 シングルノックダウン細胞、IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞の間でほとんど変化が見られなかった(図 17)。eIF4E 制御下にある遺伝子のひとつである ODC1 のタンパク質レベルでの変化に

についてもウェスタンブロット法により評価した結果、ポリソームプロファイリング解析の結果と合致するように、コントロール細胞に比べて IMP3 シングルノックダウン細胞では発現低下しており、この発現低下は IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では回復していた(図 15A、一番下の段)。また、RNA-seq の結果から IMP3 ノックダウン細胞における ODC1 の mRNA レベルでの発現変動についても解析した結果、ODC1 の mRNA レベルでの発現変動は見られなかった(図 15B)。

以上の結果は、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を促進していることを示している。

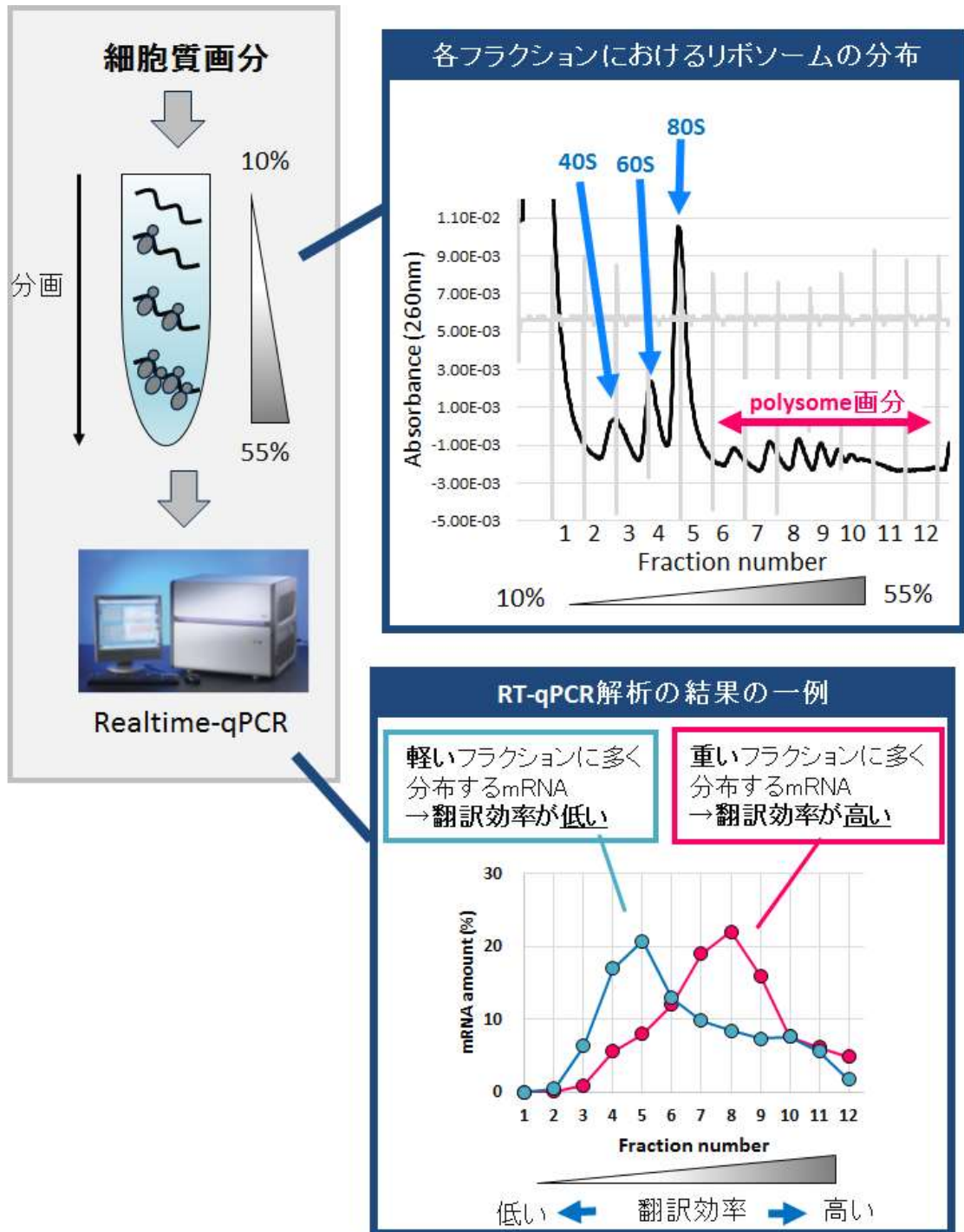
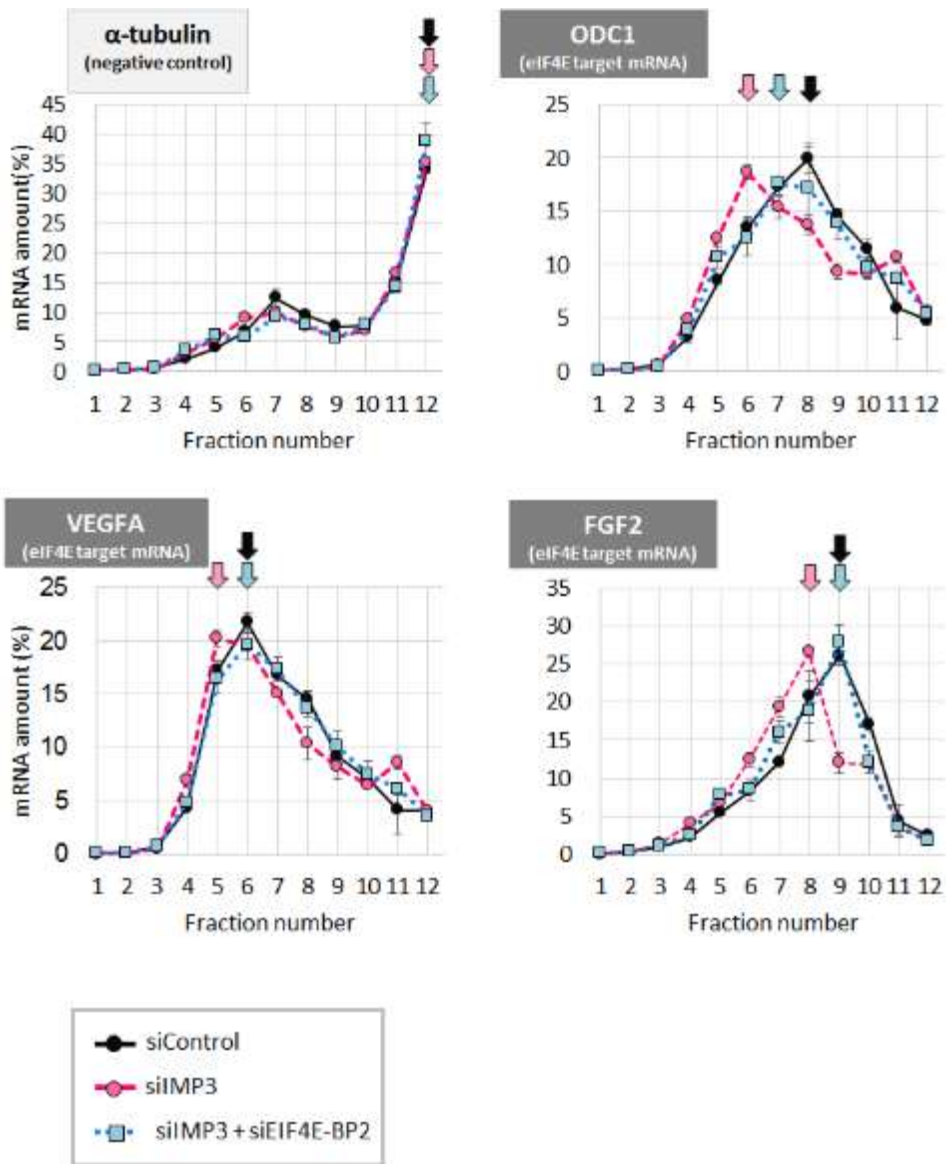


図 16. ポリソームプロファイリング解析の概要



**図 17. IMP3 ノックダウン細胞における eIF4E 制御下の mRNA の翻訳効率の変化**

ポリソームプロファイリング解析により、eIF4E 制御下の mRNA の翻訳効率を調べた。コントロール細胞(黒線), IMP3 シングルノックダウン細胞(赤線), IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞(青線)における eIF4E 制御下 mRNA(ODC1, VEGFA, FGF2) およびネガティブコントロールの alpha-tubulin mRNA の分布を示した。エラーバーは 2 回の実験の実験誤差を示している。

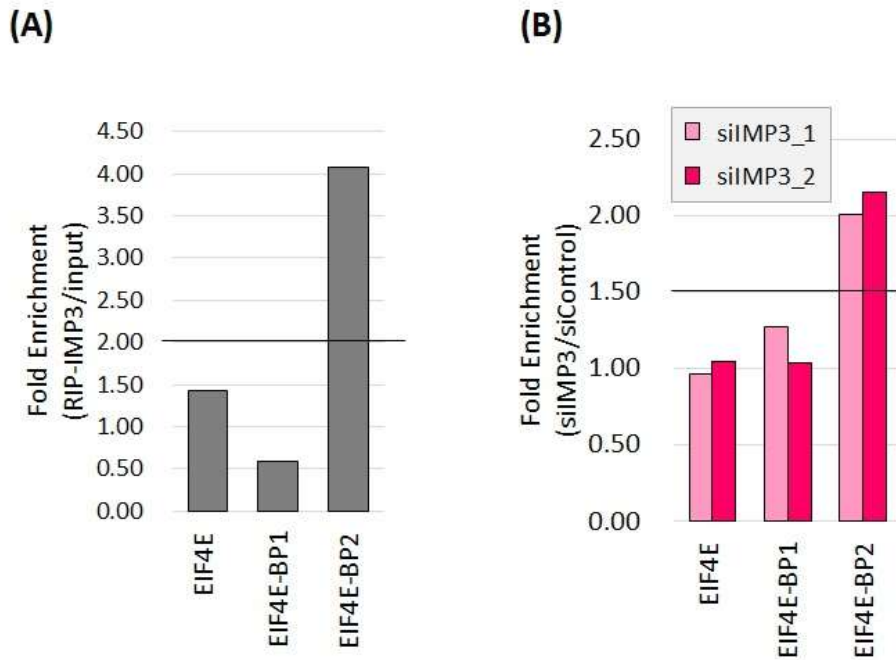
### 第3節 IMP3 は eIF4E を mRNA レベルでは発現制御しない

本章第1節、第2節において IMP3 ノックダウン細胞で eIF4E の翻訳活性の低下が見られ、その翻訳活性の低下が IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞でキャンセルされたことから、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の活性を亢進させていることが示された。

IMP3 が eIF4E を直接制御している可能性を排除するために、IMP3 と eIF4E mRNA の間に物理的な相互作用があるか否かを RIP 法により検証したところ、eIF4E mRNA の濃縮率は IMP3 免疫沈降前後で変化しなかった(図 17A)。IMP3 ノックダウン細胞における eIF4E mRNA の発現変動についても評価した結果、eIF4E mRNA は IMP3 ノックダウン細胞における発現変動が見られなかった(図 17B)。

IMP3 標的である EIF4E-BP2 には異なる遺伝子からコードされる EIF4E-BP1 というファミリータンパク質が存在する。EIF4E-BP1 も EIF4E-BP2 と同様に、eIF4E に結合することで翻訳開始複合体から隔離し、eIF4E の翻訳活性を抑制することが報告されている。IMP3 ノックダウン細胞では EIF4E-BP2 mRNA は発現上昇したが、EIF4E-BP1 mRNA の発現変動は見られなかった(図 17B)。

以上の結果より、IMP3 は EIF4E-BP2 の特異的な発現抑制を介して、eIF4E の翻訳活性を亢進させていることが示唆された。



**図 17. IMP3 は eIF4E mRNA や EIF4E-BP1 mRNA の発現制御には関与しない**

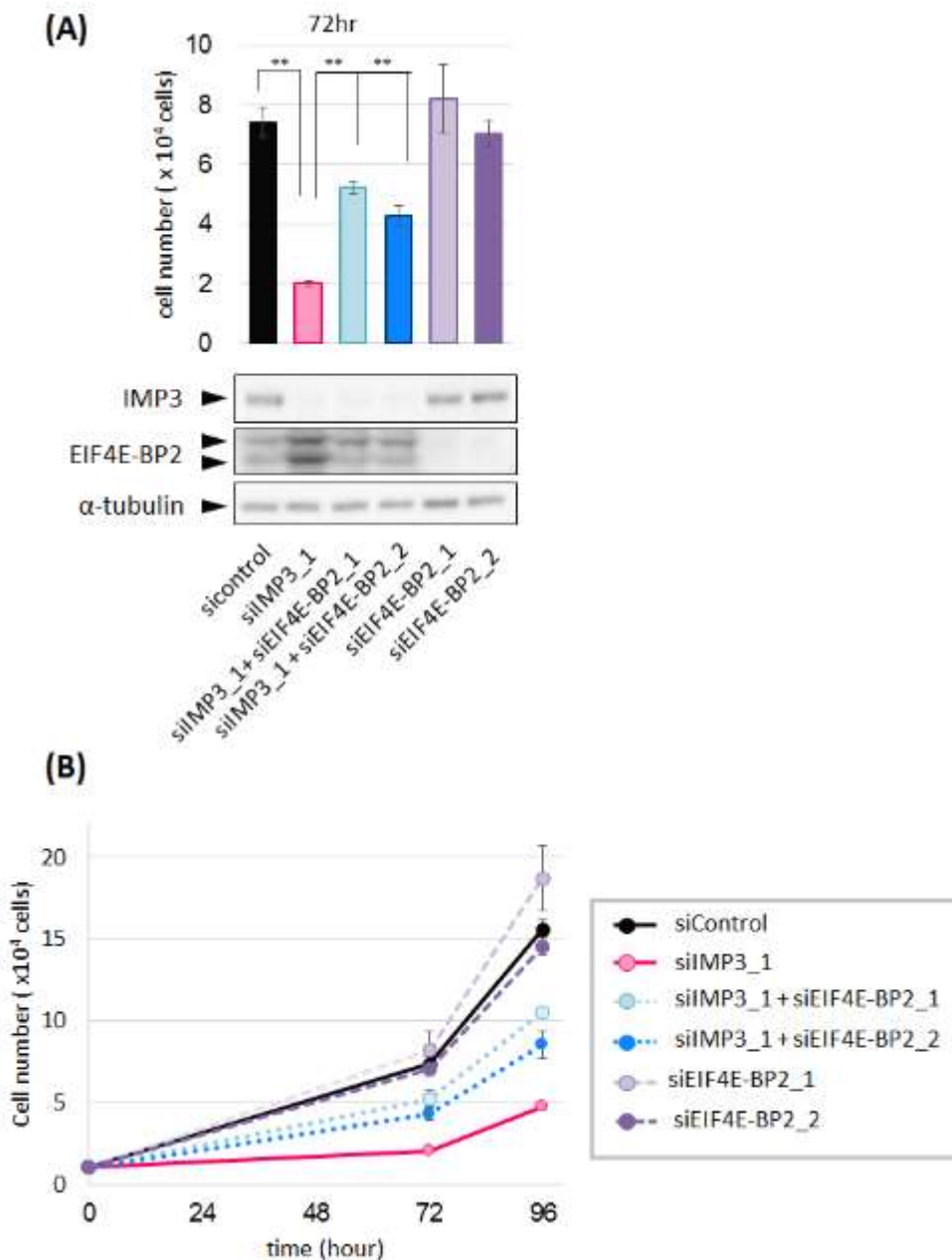
(A) eIF4E mRNA, EIF4E-BP1 mRNA, EIF4E-BP2 mRNA が IMP3 と結合するか否かを RIP-seq により検討した結果。(B) IMP3 ノックダウン細胞における eIF4E mRNA, EIF4E-BP1 mRNA, EIF4E-BP2 mRNA の発現変動を RNA-seq により検討した結果。

## 第5章 IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して細胞増殖を促進する

第4章で IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を亢進させることが示された。EIF4E-BP2 の eIF4E の翻訳活性の抑制を介して細胞増殖の抑制に関与することが知られている(Dowling et al., 2010)。IMP3 は細胞増殖を促進し癌化につながるということが報告されていたが、IMP3 による細胞増殖亢進のメカニズムについては不明な点が多く残されていた。そこで私は IMP3 が細胞増殖抑制因子である EIF4E-BP2 の発現抑制を介して細胞増殖を亢進させているのではないかと考えた。

この考えを検証するために IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンを行った。HeLa TO 細胞(図 19)または A549 細胞(図 20)におけるノックダウン時のタンパク質レベルでの発現量はウェスタンブロット法により評価した。IMP3 シングルノックダウン細胞では EIF4E-BP2 の発現量がコントロール細胞に比べて増加しており IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では EIF4E-BP2 の発現量はコントロールと同程度であった(図 19A, 20A)。

IMP3 シングルノックダウン細胞での生細胞数はコントロール細胞に比べて有意に減少していたのに対し、IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では IMP3 シングルノックダウン細胞で見られた生細胞数の減少が部分的にはあるが有意に回復していた(図 19, 20)。これらの結果より、IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して細胞増殖を亢進させていることが示唆された。



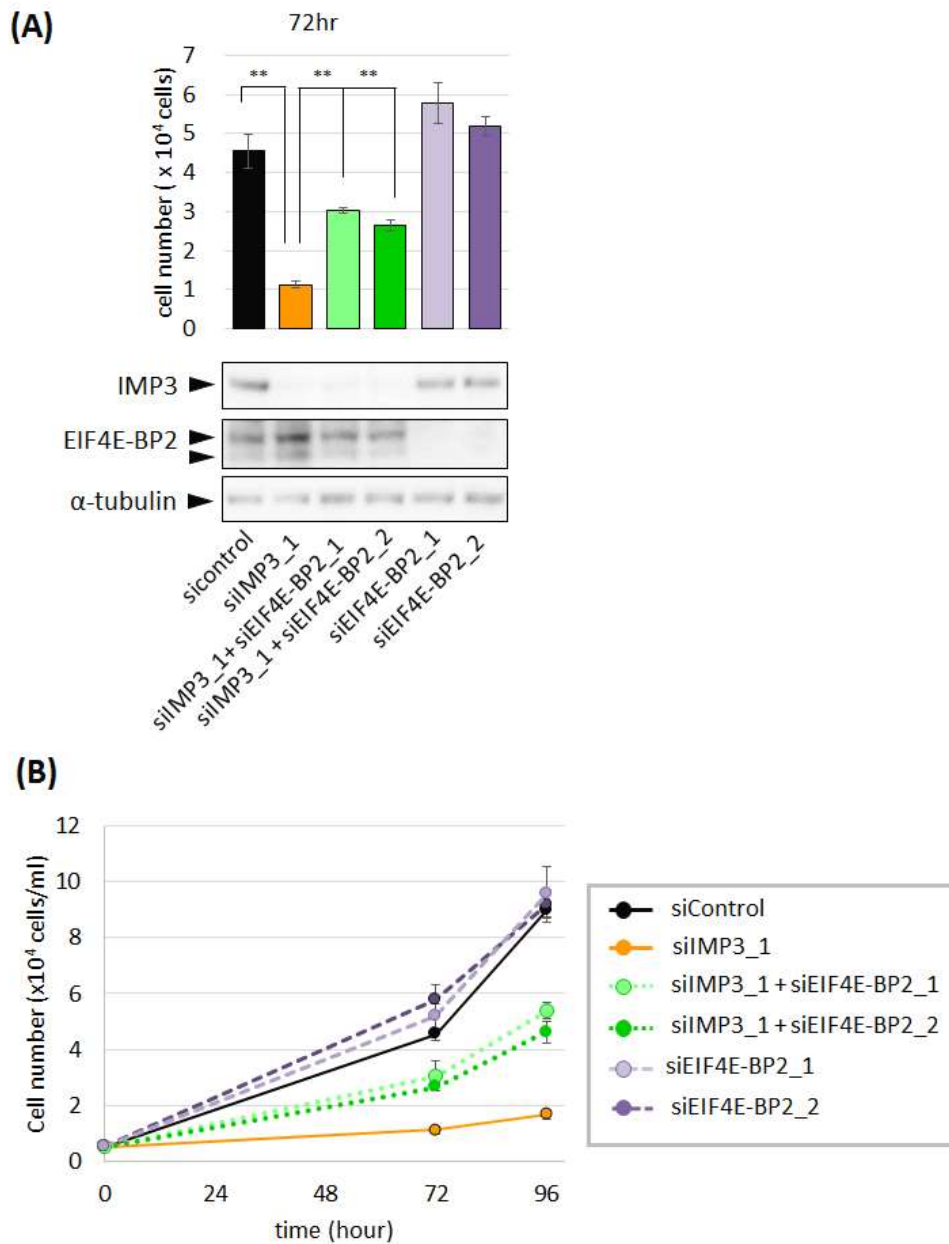
**図 19. IMP3 の EIF4E-BP2 の発現抑制を介した細胞増殖の制御**

(A) HeLa TO 細胞を IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン後 72 時間における生細胞数を auto cell counter (Millipore)により計測した (上図)。IMP3、EIF4EBP2 の発現量はウェスタンブロットにより確認しており alpha-tubulin はローディングコントロールとして使用した (下図)。p 値は student's t-test により算出した (\*\*p<0.01, n=4)。

(B) HeLa TO 細胞に siRNA トランスフェクション後 72 時間、96 時間の生細胞数を



計測した。



**図 20 IMP3 の EIF4E-BP2 の発現抑制を介した細胞増殖の制御**

(A) A549 細胞を IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン後 72 時間における生細胞数を auto cell counter (Millipore)により計測した (上図)。IMP3、EIF4EBP2 の発現量はウェスタンブロットにより確認しており alpha-tubulin はローディングコントロールとして使用した (下図)。p 値は student's t-test により算出した(\*\*p<0.01, n=4)。(B)

A549 細胞に siRNA トランスフェクション後 72 時間、96 時間の生細胞数を計測した。

# 総括と展望

## IMP3 による標的 mRNA の発現制御について

IMP3 がどのようにして癌の悪性化に寄与しているのか、その分子メカニズムを明らかにするために、初めに次世代シーケンサーを用いて IMP3 標的 RNA の網羅的スクリーニングを行った。RIP-seq による IMP3 結合 RNA 探索の結果と、RNA-seq による IMP3 ノックダウン細胞における mRNA 発現変動解析の結果を統合することにより、IMP3 により発現促進される 37 種の mRNA と IMP3 が発現抑制する 110 種の mRNA を同定した。

IMP3 だけではなく、ファミリータンパク質である IMP1, IMP2 についても標的 mRNA スクリーニングを行った結果、IMP1 については RNA 安定化因子として働くという先行研究の報告と合致するように多くの mRNA を発現促進していることが示された。

IMP ファミリータンパク質の中では IMP1 の機能解析が最も進んでおり、その IMP1 が RNA 安定化因子として働くと報告されていたことから IMP1 と相同性の高い IMP2 や IMP3 も同様に RNA 安定化因子として働くと予想されてきた。しかし、網羅的に標的 mRNA スクリーニングを行った結果、IMP ファミリーの標的 mRNA で共通するのはほとんどないということ、IMP1 と異なり IMP2 や IMP3 の標的 mRNA 群の中には発現促進されるものよりも発現上昇されるものの方が多く含まれていることが明らかになった。これらの結果より IMP ファミリータンパク質の機能を理解する上で独立

した機能解析が必要であること、また IMP3 が標的 mRNA の発現制御機構において RNA 安定化とは異なる役割を果たしていることが示唆された。

IMP3 によって発現促進される 37 種の mRNA は、これまでに報告されていた IMP3 の RNA 安定化因子としての機能に合致する標的 mRNA である。一方で、IMP3 によって発現抑制されている 110 種の mRNA はこれまでの知見からは予測されなかった標的 mRNA である。私は IMP3 によって発現抑制されている 110 種の mRNA に着目することが、これまでに明らかにできていなかった癌細胞における IMP3 の生理機能の解明の糸口になるのではないかと考えた。

標的 mRNA スクリーニングの結果同定された 110 種の mRNA は、IMP3 が RNA 分解することによって発現抑制しているのではないかという仮説を立て、RNA の半減期を測定した結果、IMP3 標的 mRNA である EIF4E-BP2 mRNA および MEIS3 mRNA は IMP3 ノックダウン細胞において半減期の延長・RNA の安定化が起きていた。

さらに本研究では、IMP3 が RNA 分解因子である XRN2 や RRP4 と物理的に相互作用し、標的 mRNA 上にリクルートし RNA 分解に関与していることが示唆された。近年の研究により、IMP1 が CCR4-NOT deadenylase 複合体をリクルートして long noncoding RNA である HULC の分解に関与していることが報告されている (Hammerle et al., 2013)。IMP3 は CCR4-NOT deadenylase 複合体とは相互作用せず、RNA 分解因子である XRN2 や RRP4 と相互作用することから IMP1 による RNA 分解

とは異なるメカニズムで RNA 分解に関与していることが示唆されている。

IMP3 を介した RNA 安定性の制御は標的 RNA に依存して安定化と分解という全く異なる機能を果たしていることが明らかになった。しかしながら、なぜ IMP3 が標的 mRNA に応じてこのように相反する機能を果たすことができているのかについては未だに不明なままであり、これを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。RNA 安定性制御における IMP3 の異なる機能を説明する一つの可能性として、RNA 安定化に寄与する場合と RNA 分解に寄与する場合で IMP3 の細胞内局在が変化することが考えられる。IMP3 の細胞内局在が変化することで、それぞれ異なる他のタンパク質と相互作用し、RNA 安定性制御機構において異なる機能を果たしているのかもしれない。この考えをサポートするデータとして、IMP3 が様々な細胞内局在パターンを示すという先行研究の報告が挙げられる (Rivera Vargas et al., 2014)。

## IMP3 の EIF4E-BP2 を介した翻訳機構・細胞増殖の制御について

IMP3 と分解標的 mRNA の発現量の逆相関が培養細胞だけではなく、ヒト臨床癌組織でも確認されたことから(第3章)、標的 mRNA の機能に着目することで癌細胞における IMP3 の生理機能の解明を達成できるのではないかと考えた。

IMP3 分解標的のひとつである EIF4E-BP2 mRNA からコードされるタンパク質は eIF4E の翻訳活性を抑制し、細胞増殖を抑制することが報告されていた(Martineau et al., 2013)。先行研究の知見と私の研究で得られたデータを元に、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性ならびに細胞増殖を促進しているのではないかとこの仮説を立て、検証実験をおこなった。IMP3 単独ノックダウンで見られた eIF4E の翻訳活性の低下は IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンにより回復した(第4章)。また、IMP3 単独ノックダウンで見られた生細胞数の減少も IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンにより回復した(第5章)。これらの結果は IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性ならびに細胞増殖を促進することを示唆している。

eIF4E は翻訳開始複合体の構成の律速となる因子であり、c-myc mRNA や cyclin など癌化促進に関与する一群の mRNA の翻訳を選択的に促進することで癌の進行に寄与することが報告されていた(Topisirovic and Sonenberg, 2011)。この知見と合致するよう

に、様々な種類のヒト癌組織において eIF4E が高頻度で高発現することも示されていた(Bitterman and Polunovsky, 2014)。eIF4E の負の制御因子として、本研究で着目した因子である EIF4E-BP2 とそのファミリータンパク質である EIF4E-BP1 が存在し、5'キャップ依存的な翻訳機構を抑制することで細胞増殖の抑制を引き起こすことが知られていた(Martineau et al., 2013)。また、EIF4E-BP1 の異常な発現または活性化が癌化を抑制すること(Avdulov et al., 2004; Hsieh et al., 2010; She et al., 2010)、EIF4E-BP1/2 を欠損したマウスにおいて肺の腫瘍形成の抑制が見られたことも報告されており(Kim et al., 2009)、これらの知見から EIF4E-BP1, EIF4E-BP2 は共に癌化の抑制因子であると考えられている。先行する研究で eIF4E と EIF4E-BP1 の発現の逆相関および eIF4E と EIF4E-BP2 の発現の逆相関が成立している乳腺腫瘍患者において、EIF4E-BP1, EIF4E-BP2 の発現と乳腺腫瘍患者の生存率の関係を評価したところ、EIF4E-BP1 の発現は乳腺腫瘍患者の生存率に影響を与えなかったのに対し、EIF4E-BP2 高発現群の乳腺腫瘍患者は生存率が高いという結果が得られた。このことは EIF4E-BP2 が EIF4E-BP1 と異なる制御メカニズムを有することが示唆されていた(Coleman et al., 2009)。本研究において、IMP3 が EIF4E-BP2 mRNA に直接結合することと IMP3 ノックダウン細胞では EIF4E-BP2 が発現上昇することを確認したが、IMP3 と EIF4E-BP1 の結合ならびに IMP3 ノックダウン細胞における EIF4E-BP1 mRNA の発現変動は見られなかった。IMP3 が EIF4E-BP2 mRNA を特異的に分解し



発現抑制するという機構が、EIF4E-BP1 と EIF4E-BP2 の間での癌細胞における制御メカニズムの違いを生み出している可能性が考えられる。さらに、本研究では IMP3 が eIF4E mRNA を直接制御しないことも示している。以上の結果より、IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を制御していると考えられる。

第 5 章で示されたように、IMP3 ノックダウンで見られた生細胞数の減少は IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンでは完全には回復しなかった。このことは IMP3 による細胞増殖の促進は EIF4E-BP2 – eIF4E 経路だけでは説明できないことを示唆している。細胞生存の制御因子である MEIS3 を始めとする複数の mRNA が IMP3 によって発現制御されていることが、IMP3 標的 mRNA スクリーニングの結果より明らかとなっている。IMP3 は EIF4E-BP2 – eIF4E 経路以外にも複数の経路の制御を介して細胞増殖の促進に寄与していると考えられる。

## 癌研究における RNA 結合タンパク質の機能解析の重要性について

本研究により、IMP3 が EIF4E-BP2 mRNA を分解に寄与し発現抑制をしていること、そして EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を亢進させ細胞増殖を促進させることが示唆された(図 21)。IMP3 と EIF4E-BP2 mRNA の発現量の逆相関がヒト臨床癌組織でも成立していたことから、IMP3 – EIF4E-BP2 – eIF4E 経路は癌の進行メカニズムにおいて重要な遺伝子発現制御経路である可能性が高い。本研究では、RNA 結合タンパク質の標的 mRNA に着目することで、癌の悪性度マーカーとして着目されていた IMP3 とがん原遺伝子としてよく知られている eIF4E という 2 種のがん関連遺伝子を結びつけることができ、癌細胞の新たな遺伝子発現制御経路の発見に成功した。IMP3 が RNA 分解に関与するという新たな機能と、がん原遺伝子 eIF4E の活性を制御するという新たな遺伝子発現経路を見出すことが出来たのは IMP3 の標的 mRNA に着目して研究を進めた成果である。

IMP3 だけではなく、多くの RNA 結合タンパク質が細胞周期、運動性、アポトーシスの制御を介して癌の進行において大きな影響を与えることが分かってきている(Blackinton and Keene, 2014)。これまでは技術的な面での限界があり、RNA 結合タンパク質の標的 mRNA を同定することが難しかったが、網羅的に標的 mRNA を探索することが可能となったこれからは癌と関連する RNA 結合タンパク質の標的 mRNA に

着目し、タンパク質—タンパク質の相互作用だけでは見出すことが出来なかった新たな遺伝子発現制御経路を見出し、疾患の理解につなげていくことが重要であると考えている（図 22）。癌は一つの原因遺伝子だけで説明ができる疾患ではなく、複雑な遺伝子発現制御ネットワークを理解することが重要である。本研究がその複雑な遺伝子発現機構の解明への新たな糸口となることを願いつつ、本稿を終えたい。

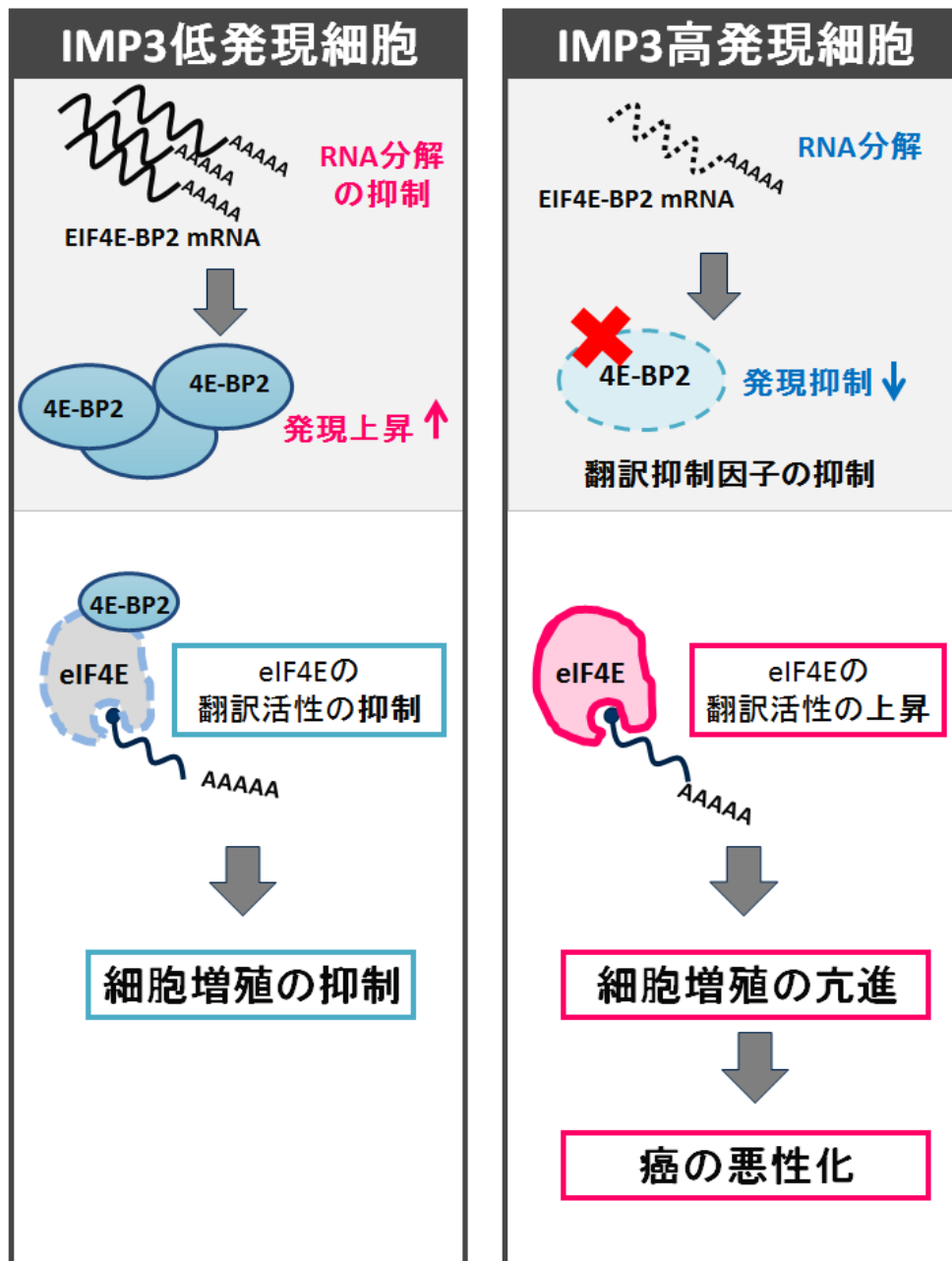
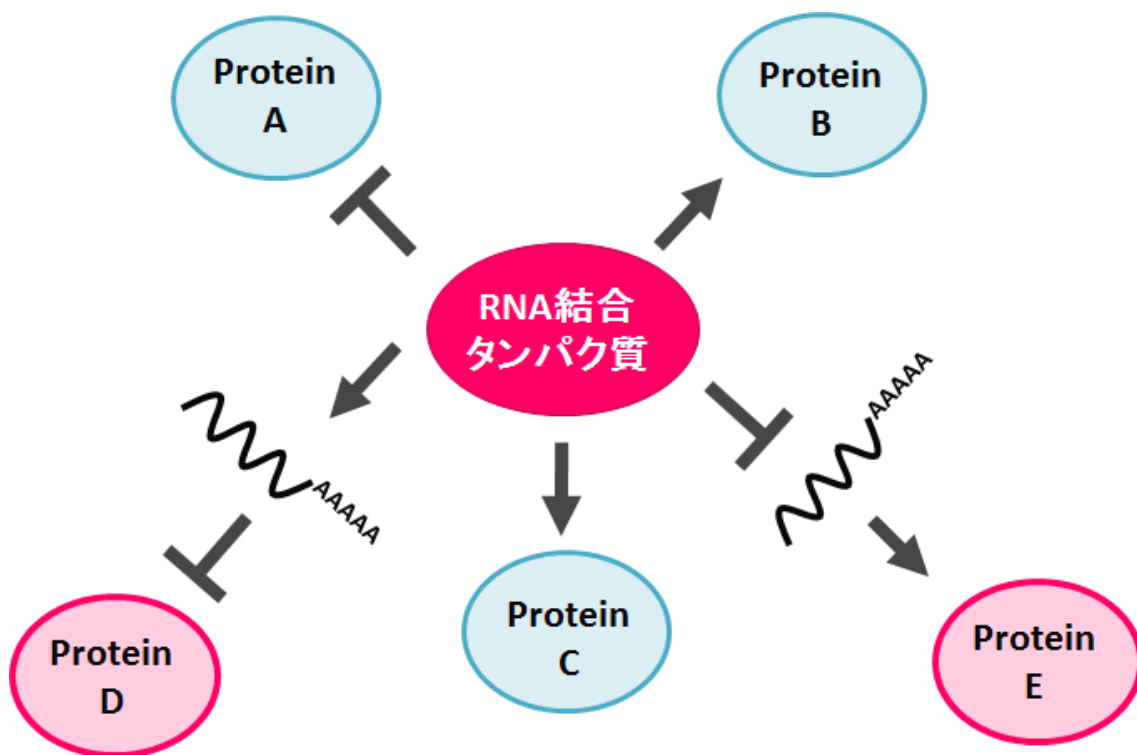


図 21. モデル図 1 (IMP3 による癌の進行メカニズム)

IMP3 低発現細胞（左）では EIF4E-BP2 mRNA の分解を抑制し、翻訳抑制因子 EIF4E-BP2 の発現を上昇させ eIF4E の翻訳活性の低下・細胞増殖の抑制が引き起こす。IMP3 高発現細胞（右）では RNA 分解することで EIF4E-BP2 の発現を抑制し、eIF4E の翻訳活性を上昇・細胞増殖を促進し癌の悪性化に寄与するというモデルを本研究では

提唱している。



RNA結合タンパク質に着目して研究することで、タンパク質-タンパク質の相互作用だけでは発見できなかった、新たな遺伝子発現制御の経路を見出すことができる

図 22. モデル図 2 (RNA 結合タンパク質の研究により明らかにできること)

# 材料と方法

## 1. 細胞培養

HeLa TO 細胞 (Clontech)または A549 細胞 (from Dr. Nobukuni, in FMI) を、37°C 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。培地は 10%FBS (fetal bovine serum)および penisillin/streptomycin 入り DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Wako)を用いた。

## 2. siRNA 処理

siRNA の導入は、Lipofectamine RNAi Max (invitrogen)を用いて行った。以下に 6 ウェルプレートを用いた場合のトランスフェクション法を示す。まず、OPTI-MEM 400ul、siRNA (final concentration = 10nM)、Lopofectamine RNAi Max 4ul の mix をプレートにのせ、その上に細胞 ( $1.2 \times 10^5$  cells diluted in growth medium without antibiotics) を添加し、37°Cで 6 時間培養した (Reverse transfection)。6 時間後、培地を交換しさらに培養を続けた。二日目、Reverse transfection の時と同様に OPTI-MEM, siRNA, Lipofectamine RNAi Max の mix を作り、これを培養中の細胞に添加しインキュベートした (Forward transfection)。24 時間後に培地交換を行い、培養を続けた。

以下に使用した siRNA の配列を示す。

Table 1. siRNA の配列

| Name      | Strand    | Sequence (5'-3')      |
|-----------|-----------|-----------------------|
| siControl | sense     | GTACCTGACTAGTCGCAGAAG |
|           | antisense | TCTGCGACTAGTCAGGTACGG |
| siIMP1_1  | sense     | CCUGGCUGCUGUAGGUCUUUU |



|               |           |                        |
|---------------|-----------|------------------------|
|               | antisense | AAGACCUACAGCAGCCAGGAA  |
| siIMP1_2      | sense     | CGUUGCAAGACCUUACCCUUU  |
|               | antisense | AGGGUAAGGUCUUGCAACGAG  |
| siIMP2_1      | sense     | GGCAAUCGUCUCUGUACAUG   |
|               | antisense | UGUACAGAGACGAUUUGCCAC  |
| siIMP2_2      | sense     | CGCUAGCCAAGAACCUAUAUG  |
|               | antisense | UAUAGGUUCUUGGCUAGCGGA  |
| siIMP3_1      | sense     | AUAAAGUAUACAUUCUCACAG  |
|               | antisense | GUGAGAAUGUAUACUUUAUGC  |
| siIMP3_2      | sense     | AUUAUACAGCGUCAAUUCCUG  |
|               | antisense | GGAAUUGACGCUGUAUAAUCC  |
| siEIF4E-BP2_1 | sense     | UUGUUUACUUCUACUUUGGAG  |
|               | antisense | CCAAAGUAGAAGUAAACAAUU  |
| siEIF4E-BP2_2 | sense     | UCAAACAUAAGAAACUGCAA   |
|               | antisense | GCAGUUUCUUAUGUUUUGAGU  |
| siRRP4_1      | sense     | GUUGAUCUGUGUGAAAGCUUU  |
|               | antisense | AGCUUUCACACAGAUCAACUU  |
| siRRP4_2      | sense     | UUUAUUCUCCAACUUUACCA   |
|               | antisense | GUAAAGUUGGAAGAAUAAAGU  |
| siXRN2_1      | sense     | GAGGAUAAUGUCAGGUUAUGG  |
|               | antisense | AUAACCUGACAUAUAUCCUCUG |
| siXRN2_2      | sense     | GCUAAAUGCCUUCGCUAUUAC  |
|               | antisense | AAUAGCGAAGGCAUUUAGCAA  |

### 3. プラスミドベクターの構築

IMP1, IMP2, IMP3 の ORF は PCR cloning によって得た。HeLa TO 細胞より抽出した total RNA を PrimeScript II 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis kit (TaKaRa)を用いて逆転写して合成した 1 本鎖 cDNA を鋳型として PCR で増幅し、これらを Kpn I , Xba I で切断した pcDNA3 hygro FLAG stop vector (pcDNA3 hygro vector のマルチクローニングサイトの下流に FLAG タグを挿入した plasmid vector) に挿入した。IMP1, IMP2, IMP3 の ORF の配列が NCBI に報告されている配列に一致することをシーケンス解析により確認した(Ref seq accession no. NM\_006546, NM\_006548, and NM\_006547)。

Table 2. PCR クローニング用プライマーの配列

| Name            | Sequence (5'-3')                        |
|-----------------|---|
| Kpn I -IMP1-F   | cggGGTACCGccaccatgaacaagctttacatcggc    |
| IMP1- Xba I -Re | tgcTCTAGActtctccctgcctggg               |
| Kpn I -IMP2-F   | cggGGTACCGccaccatgatgaacaagctttacatcgg  |
| IMP2- Xba I -Re | tgcTCTAGActtgctgcgctgtgagg              |
| Kpn I -IMP3-F   | cggGGTACCGccaccatgaacaaactgtatatcggaacc |
| IMP3- Xba I -Re | tgcTCTAGActtccgtcttgactgaggtg'          |

### 4. RNA 免疫沈降法

**(RIP-seq, ribonucleoprotein complex immunoprecipitation followed by massive RNA-sequencing)**

FLAG タグを C 末端に有する IMP1, IMP2, IMP3 の発現ベクターを Lipofectamine 2000 を用いて HeLa TO 細胞 にトランスフェクションした。次の日にトリプシンを用

いて細胞をはがし、冷やした PBS で洗った。ペレット化した細胞を RIPA バッファー [50mM TRIS-HCl(pH8), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% DOC, 0.5 U/μL RNase inhibitor (Promega), protease inhibitor cocktail (Sigma)] で再懸濁した後、Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio) を用いて超音波処理を行った。細胞懸濁液の遠心上清を抗 FLAG タグ抗体(MBL), normal mouse IgG 抗体 (MBL) により免疫沈降した。抗体は Dynabeads Protein G (Invitrogen) と 4°C で 1 時間インキュベートし、上記の RIPA バッファーで 3 回洗浄してから使用した。細胞懸濁液の遠心上清に抗体と結合させた Dynabeads を混ぜ、4°C で 2 時間転倒混和した。ISOGEN LS (Nippon Gene) を添加し、マニュアルに従って RNA 抽出を行った。RNA の定量は次世代シーケンサーを用いて行った。

## 5. 次世代シーケンサー解析

RNA-seq および RIP-seq の cDNA ライブラリ合成には 100ng 分の RNA を供し、mRNA Seq Sample Preparation Kit (Illumina) を用いてマニュアルに従って行った。HiSeq 2000 (Illumina) により標準プロトコルに従って解析を行い、36 base single-end read RNA-seq タグを得た。蛍光画像は Illumina 社より提供されているパイプラインに従って配列へと加工した。Eland を用いて RNA-seq タグをヒトゲノム(hg19)へとマッピングした。mRNA の exon-exon junction に相当するリードは分断し、UCSC genome browser からダウンロードした Refseq transcriptome にマッピングした。各転写産物の発現量は遺伝子の長さ と sequence read の深さでノーマライズした値である RPKM(reads per kilobase of exon model per million mapped reads)で評価した。解析対象の転写物として RPKM 値が 1 以上のものを対象とした。この解析のシーケンスデータの受入番号は[DDBJ:DRA002815]である。

## 6. Quantitative real time reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

細胞から抽出した total RNA を PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa)を用いて逆転写し、cDNA を得た。この cDNA を鋳型とし、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)を用いて定量 PCR を行った。蛍光のリアルタイム検出には、Thermal Cycler Dice (TaKaRa)を使用した。

PCR 反応条件は以下の通り。

|           |                      |         |
|-----------|----------------------|---------|
| Hold      | 95°C, 30"            | 1cycle  |
| 2step PCR | 95°C, 5" + 60°C, 30" | 40cycle |

mRNA の定量に使用したプライマーの配列は以下の通り。

Table 3. qPCR 解析用プライマーの配列

| Gene Name    | Direction | Sequence (5'-3')         |
|--------------|-----------|--------------------------|
| GAPDH        | Forward   | gcaccgtcaaggctgagaac     |
|              | Reverse   | tggtgaagacgccagtgga      |
| IMP3         | Forward   | cacatcaagcagctttctcg     |
|              | Reverse   | cctctggtggtccagtataa     |
| EIF4E-BP2    | Forward   | gcgagctacctcatgactat     |
|              | Reverse   | tgtcataaatgattcgagttcctc |
| c-myc        | Forward   | caccagcagcagctctga       |
|              | Reverse   | gatccagactctgaccttttgc   |
| cyclophilinA | Forward   | tgctggaccaacacaaat       |
|              | Reverse   | catatgcttgcacatcaa       |
| HPRT         | Forward   | tgacctgatttatttgcatacc   |
|              | Reverse   | cgagcaagacggtcagtcct     |
| 7SK          | Forward   | ggctgatctggctggcta       |
|              | Reverse   | ctctatcggggatggctgt      |
| U1A          | Forward   | tgatcacgaaggtggtttcc     |
|              | Reverse   | gcacatccggagtgaatg       |
| CDK18        | Forward   | gcggaatgagaactgcag       |
|              | Reverse   | ctgtctgttggggagaaggt     |

|              |         |                            |
|--------------|---------|----------------------------|
| SOCS2        | Forward | ggagctcggtcagacagg         |
|              | Reverse | ctaatcaagaaagttccttctggtg  |
| LRFN3        | Forward | gctgatgacatcctcgtctaca     |
|              | Reverse | agcacgcacagatcgtagg        |
| CCDC92       | Forward | cagacaggagacgggacttc       |
|              | Reverse | cagcatttctgtctctttcac      |
| MBNL3        | Forward | ctcaaggcagctcatcatca       |
|              | Reverse | tgatctctttggtatcagttgcag   |
| FAM129A      | Forward | gaactatftaattgaaagatcaaagc |
|              | Reverse | aatggctgcacactctcca        |
| FAM210B      | Forward | ttggcatatfttcatggttg       |
|              | Reverse | gctgccatftttgactgtacc      |
| COL15A1      | Forward | tgatgctgctcgggtctc         |
|              | Reverse | gcgtgaggtccaggtgac         |
| ZNF618       | Forward | gtagaagagaagtggaaacctcag   |
|              | Reverse | tgttctgccgctccttt          |
| SORT1        | Forward | ggcatcattgtggccatt         |
|              | Reverse | ttgaccttctgtctgtggaga      |
| ACER3        | Forward | cttggttctatcttcacatcctt    |
|              | Reverse | tcactggccagattccaaag       |
| MEIS3        | Forward | cccaggcttgacagc            |
|              | Reverse | gccagttcacatttctcaaaga     |
| SLC25A23     | Forward | ggaatfttcccgtatctgc        |
|              | Reverse | ctgttgatctcagagacatcaat    |
| CRMP1        | Forward | cccggagcacctgtacc          |
|              | Reverse | gctggtacctctacacagga       |
| VEGFA        | Forward | gagttaaacgaacgtacttgaga    |
|              | Reverse | tcaggtttctggattaaggactg    |
| FGF2         | Forward | caaaaacgggggcttctt         |
|              | Reverse | tgaagttgtagcttgatgtgagg    |
| ODC1         | Forward | aaaacatgggcgcttacact       |
|              | Reverse | tggaattgctgcatgagttg       |
| alpha-tublin | Forward | cttcgtctccgcatcag          |
|              | Reverse | ttgccaatctggacacca         |

## 7. CLIP

RNA とタンパク質のクロスリンク反応を促進するために、HeLa TO 細胞に 150 $\mu$ M 4'-thio-uridine を添加し、4 時間インキュベートした。冷 PBS で洗浄した細胞に 360 nm の UV 照射を氷上で 10 分間行った。1.5ml チューブに細胞を回収し、ペレット化した後 200 $\mu$ l の lysis buffer [2% SDS, 50 mM Tris-Cl (pH 8), 1 mM EDTA, 1 mM DTT] に再懸濁し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。800 $\mu$ l の dilution buffer [1.25% NP-40, 0.625% sodium deoxycholate, 62.5 mM Tris-Cl (pH 8), 1.75 mM EDTA, 187.5 mM NaCl] を添加し、ピペッティングにより混和した後、Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio) を用いて超音波処理を行った(15 sec, ON and 15 sec, OFF, 4 times)。4 $^{\circ}$ C, 15000rpm で 90 分間遠心し、遠心上清を回収した。免疫沈降反応は上記の RIP 法に記載した方法に従って行った。

## 8. BRIC 法

BRIC 法は、参考文献(Tani et al., 2012)に記載の通り行った。細胞を 150 $\mu$ M 5'-bromo-uridine (BrU) (Wako)の存在下で 24 時間インキュベートした。24 時間後、培地交換を行った後、さらにインキュベートした。培地交換してから 15 分後から 0, 2, 4, 6, 9, 12 時間後に細胞を回収した。それらの細胞から RNAiso Plus (TaKaRa)を用いて Total RNA を抽出した。8 $\mu$ g の BrU 標識した Total RNA を 80 $^{\circ}$ C で 2 分、熱変性させた後に、4 $\mu$ g の抗 BrdU 抗体(clone 2B1, MBL)と結合した Protein G Agarose (Pierce) を添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間転倒混和した。0.1%BSA/PBS(-)で 3 回洗浄した後、ISOGEN LS (Nippon Gene)を添加し、マニュアルに従って RNA 抽出を行った。RNA の定量は qPCR を用いて行った。

## 9. 共免疫沈降法(Co-IP, Co- immunoprecipitation)

HeLa TO 細胞または A549 細胞に FLAG empty vector (ネガティブコントロール)と FLAG-tagged IMP3 vector を Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを行った。24 時間インキュベートした後、冷 PBS で細胞を洗浄し、セルスクレーパーで 1.5 ml に回収した細胞ペレットを CHAPS Lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.3% CHAPS]に再懸濁した。細胞ライセートを 0.01 µg RNaseA and 0.4 unit RNaseT1 で処理し、Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio)を用いて超音波処理を行った(15 sec, ON and 15 sec, OFF, 4 times)。4°C, 15000rpm で 10 分間遠心し、回収した遠心上清を用いて抗 FLAG タグ抗体(MBL)により免疫沈降した。抗体は Dynabeads Protein G (invitrogen)と 4°Cで 1 時間インキュベートし、上記の CHAPS バッファーで 3 回洗浄してから使用した。細胞懸濁液の遠心上清に抗体と結合させた Dynabeads を混ぜ、4°Cで 2 時間転倒混和した。免疫沈降されたタンパク質の評価はウェスタンブロット法により行った。

## 10. ウェスタンブロット法

タンパク質サンプルを 12% SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、泳動したゲルを PVDF メンブレン (Millipore)にトランスファーした。トランスファー後、3% BSA/TBST を用いて室温で 1 時間ブロッキングした後、1 次抗体を用いて反応させた。1 次抗体反応に用いた抗体と反応条件は以下の通り。

### 室温, 1 時間の反応

anti-IGF2BP3(IMP3) rabbit polyclonal antibody (MBL, #RN009P), anti-alpha tubulin rabbit polyclonal antibody (MBL, #PM054), anti-RRP4 rabbit polyclonal antibody (Protein Technology, #14805-1-AP), anti-XRN2 rabbit polyclonal antibody

(Abcam, #ab72181), anti-CNOT1 rabbit polyclonal antibody (Protein Technology, #14276-1-AP), anti-CNOT3 mouse monoclonal antibody (Abnova, #H00004849-M01)

4°C, オーバーナイトの反応

anti-EIF4E-BP2 rabbit antibody (Cell Signaling Technologies, #2845), anti-eIF4E rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling Technologies, #9742) , anti-eIF4E (phospho S209) polyclonal rabbit antibody (Abcam, #ab76256)

1 次抗体反応後、メンブレンを TBST で洗浄し、2 次抗体(Peroxidase labeled anti-rabbit antibody, Millipore, 10000 倍希釈にて使用または Peroxidase labeled anti-mouse antibody, Dako, 2000 倍希釈にて使用)を 1 時間室温で反応させた後、HRP Substrate (Millipore)と反応させ、ImageQuant LAS4000 (Fuji Film)を用いて検出を行った。

## 11. ヒト臨床癌サンプルの採取

本実験はヘルシンキ宣言が言明する諸原則に従って行った。ヒト組織サンプルは国保旭中央病院にて採取された。旭中央病院または東京大学の施設内倫理委員会は日本厚生労働省の倫理指針に則り、本研究でヒト臨床組織を取り扱うことを承認している。臨床研究参加に必要な書面によるインフォームドコンセントは全ての参加者から入手しており、医師によって登録されている。本研究の臨床試験登録番号は 12-5(3)である。

2011 年から 2013 年の間に旭中央病院において、27 人の患者から肺腺癌組織が手術により摘出された。すべての肺腺癌組織を摘出後 5 x 5 x 5 mm のブロックに整形し、速やかに RNA later solution (Life Technologies)に添加し-80°C にて保存した。組織を Tissue Ruptor (QIAGEN)でホモジナイズした後、RNA iso Plus (Takara)により Total RNA を、RIPA buffer を用いてタンパク質をそれぞれ回収した。回収された Total RNA



は RT-qPCR に、タンパク質はウェスタンブロットにそれぞれ供した。

## 12. ポリソームプロファイリング解析

ポリソームプロファイリング解析は、参考文献(Akimitsu et al., 2007)に記載のプロトコルの一部を変更して行った。Si control または si IMP3\_1 をトランスフェクションした HeLa TO 細胞 ( $\sim 5 \times 10^6$  cells per 10cm dish) を 100  $\mu$ g/mL の cycloheximide を含む冷 PBS で 2 回洗い、100  $\mu$ g/ml cycloheximide/PBS(-) を添加し室温で 10 分間インキュベートした。低張性の lysis buffer [100  $\mu$ g/mL cycloheximide, 1 mM dithiothreitol, 200U/mL RNase inhibitor (Promega), 1.5 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris-HCl; pH 7.4, 1% Triton X-100, and 1% deoxycholate] を加えて、プレート上で直接溶解した。その溶解液を回収し、処理した後、抽出液のうち 500  $\mu$ L をショ糖密度勾配層 [10% to 55% in 80 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl; pH 7.4, and 1 mM dithiothreitol] の上部に静置し、4°C, 50,000rpm で 90 分間超遠心した。その勾配層を、Piston Gradient Fractionator (BioComp) を用いて分画した。それぞれの画分から ISOGEN LS (Nippon Gene) を添加し、マニュアルに従って RNA 抽出を行った。RNA の定量は qPCR を用いて行った。

## 13. Cell counting assay

Control, IMP1, IMP3 siRNA を HeLa TO 細胞または A549 細胞にトランスフェクションした 72 時間後または 96 時間後の生細胞数を Scepter 2.0 Cell Counter (Merck Millipore) を用いて計測した。また、Control, IMP1, IMP3 siRNA を HeLa TO 細胞または A549 細胞にトランスフェクションした 72 時間後または 96 時間後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を添加しマニュアルに従って細胞生存率の計測を行った。



## 発表論文

1. Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA.  
**Rena Mizutani**, Naoto Imamachi, Yoshio Suzuki, Hiroshi Yoshida, Naobumi Tochigi, Tadahiro Oonishi, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu.  
*Oncogene* (2015) in press.
2. Identification and Characterization of Novel Genotoxic Stress-Inducible Nuclear Long Noncoding RNAs in Mammalian Cells  
**Rena Mizutani**, Ai Wakamatsu, Noriyuki Tanaka, Hiroshi Yoshida, Naobumi Tochigi, Yoshio Suzuki, Tadahiro Oonishi, Hidenori Tani, Keiko Tano, Kenichi Ijiri, Takao Isogai, Nobuyoshi Akimitsu  
*PLoS One*, 2012;7(4):e34949
3. Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance  
Sho Maekawa, Naoto Imamachi, Takuma Irie, Hidenori Tani, Kyoko Matsumoto, **Rena Mizutani**, Katsutoshi Imamura, Miho Kakeda, Tetsushi Yada, Sumio Sugano, Yutaka Suzuki and Nobuyoshi Akimitsu.  
*BMC Genomics*, 2015;Mar 6;16:154
4. Genome-wide analysis of long noncoding RNA turnover  
Hidenori Tani, Naoto Imamachi, **Rena Mizutani**, Katsutoshi Imamura, Yoendae Kwon, Satoru Miyazaki, Sho Maekawa, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu.  
*Methods in Molecular Biology*, 2015; 1262: 305-20
5. BRIC-seq: a genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells  
Naoto Imamachi, Tani Hidenori, **Rena Mizutani**, Katsutoshi Imamura, Takuma Irie, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu.  
*Methods*, 2014 May 1; 67(1): 55-63

6. Identification of hundreds of novel UPF1 target transcripts by direct determination of whole transcriptome stability  
Hidenori Tani, Naoto Imamachi, Kazi Abdus Salam, **Rena Mizutani**, Kenichi Ijiri, Takuma Irie, Tetsushi Yada, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu.  
*RNA Biology*, 2012 Nov;9(11): 1370-9
  
7. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals  
Hidenori Tani, **Rena Mizutani**, Kazi Abdus Salam, Kekiko Tano, Kenichi Ijiri, Ai wakamatsu, Takao Isogai, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu.  
*Genome Research*, 2012 May;22(5):947-56

## 参考文献

Akimitsu, N., Tanaka, J., and Pelletier, J. (2007). Translation of nonSTOP mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. *Embo j* *26*, 2327-2338.

Avdulov, S., Li, S., Michalek, V., Burrichter, D., Peterson, M., Perlman, D.M., Manivel, J.C., Sonenberg, N., Yee, D., Bitterman, P.B., *et al.* (2004). Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell* *5*, 553-563.

Bell, J.L., Wachter, K., Muhleck, B., Pazaitis, N., Kohn, M., Lederer, M., and Huttelmaier, S. (2013). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci* *70*, 2657-2675.

Bhardwaj, A., Myers, M.P., Buratti, E., and Baralle, F.E. (2013). Characterizing TDP-43 interaction with its RNA targets. *Nucleic Acids Res* *41*, 5062-5074.

Bitterman, P.B., and Polunovsky, V.A. (2014). eIF4E-mediated translational control of cancer incidence. *Biochim Biophys Acta*.

Blackinton, J.G., and Keene, J.D. (2014). Post-transcriptional RNA regulons affecting cell cycle and proliferation. *Semin Cell Dev Biol*.

Coleman, L.J., Peter, M.B., Teall, T.J., Brannan, R.A., Hanby, A.M., Honarpisheh, H., Shaaban, A.M., Smith, L., Speirs, V., Verghese, E.T., *et al.* (2009). Combined analysis of eIF4E and 4E-binding protein expression predicts breast cancer survival and estimates eIF4E activity. *Br J Cancer* *100*, 1393-1399.

Cook, K.B., Kazan, H., Zuberi, K., Morris, Q., and Hughes, T.R. (2011). RBPDB: a database of RNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res* *39*, D301-308.

Dowling, R.J., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B.D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., *et al.* (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science* *328*, 1172-1176.

Farina, K.L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., and Singer, R.H. (2003). Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol* *160*, 77-87.

Fedele, M., Palmieri, D., and Fusco, A. (2010). HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? *Mol Cell Endocrinol* *326*, 19-24.

Findeis-Hosey, J.J., Yang, Q., Spaulding, B.O., Wang, H.L., and Xu, H. (2010). IMP3 expression is correlated with histologic grade of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol* *41*, 477-484.

Furic, L., Rong, L., Larsson, O., Koumakpayi, I.H., Yoshida, K., Brueschke, A., Petroulakis,

E., Robichaud, N., Pollak, M., Gaboury, L.A., *et al.* (2010). eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 14134-14139.

Graff, J.R., De Benedetti, A., Olson, J.W., Tamez, P., Casero, R.A., Jr., and Zimmer, S.G. (1997). Translation of ODC mRNA and polyamine transport are suppressed in ras-transformed CREF cells by depleting translation initiation factor 4E. *Biochem Biophys Res Commun* *240*, 15-20.

Hammerle, M., Gutschner, T., Uckelmann, H., Ozgur, S., Fiskin, E., Gross, M., Skawran, B., Geffers, R., Longerich, T., Breuhahn, K., *et al.* (2013). Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). *Hepatology* *58*, 1703-1712.

Hsieh, A.C., Costa, M., Zollo, O., Davis, C., Feldman, M.E., Testa, J.R., Meyuhas, O., Shokat, K.M., and Ruggero, D. (2010). Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell* *17*, 249-261.

Hwang, Y.S., Xianglan, Z., Park, K.K., and Chung, W.Y. (2012). Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* *33*, 2135-2146.

Jeng, Y.M., Chang, C.C., Hu, F.C., Chou, H.Y., Kao, H.L., Wang, T.H., and Hsu, H.C. (2008). RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression

promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48, 1118-1127.

Jonson, L., Christiansen, J., Hansen, T.V., Vikesa, J., Yamamoto, Y., and Nielsen, F.C. (2014). IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. *Cell Rep* 7, 539-551.

Kanematsu, S., Tanimoto, K., Suzuki, Y., and Sugano, S. (2014). Screening for possible miRNA-mRNA associations in a colon cancer cell line. *Gene* 533, 520-531.

Keene, J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-543.

Kevil, C.G., De Benedetti, A., Payne, D.K., Coe, L.L., Laroux, F.S., and Alexander, J.S. (1996). Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 65, 785-790.

Kim, Y.Y., Von Weymarn, L., Larsson, O., Fan, D., Underwood, J.M., Peterson, M.S., Hecht, S.S., Polunovsky, V.A., and Bitterman, P.B. (2009). Eukaryotic initiation factor 4E binding protein family of proteins: sentinels at a translational control checkpoint in lung tumor defense. *Cancer Res* 69, 8455-8462.

Liao, B., Hu, Y., Herrick, D.J., and Brewer, G. (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of



human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* *280*, 18517-18524.

Lukong, K.E., Chang, K.W., Khandjian, E.W., and Richard, S. (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* *24*, 416-425.

Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C., and Pyronnet, S. (2013). Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* *32*, 671-677.

Moore, M.J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* *309*, 1514-1518.

Mueller-Pillasch, F., Lacher, U., Wallrapp, C., Micha, A., Zimmerhackl, F., Hameister, H., Varga, G., Friess, H., Buchler, M., Beger, H.G., *et al.* (1997). Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* *14*, 2729-2733.

Mukherjee, N., Corcoran, D.L., Nusbaum, J.D., Reid, D.W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Jr., Tuschl, T., Ohler, U., and Keene, J.D. (2011). Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell* *43*, 327-339.

Musunuru, K. (2003). Cell-specific RNA-binding proteins in human disease. *Trends Cardiovasc Med* *13*, 188-195.

Müller, D., Lasfargues, C., El Khawand, S., Alard, A., Schneider, R.J., Bousquet, C.,

Pyronnet, S., and Martineau, Y. (2013). 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation* *1*, e25819.

Nathan, C.O., Carter, P., Liu, L., Li, B.D., Abreo, F., Tudor, A., Zimmer, S.G., and De Benedetti, A. (1997). Elevated expression of eIF4E and FGF-2 isoforms during vascularization of breast carcinomas. *Oncogene* *15*, 1087-1094.

Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S., and Janga, S.C. (2015). The human RBPome: From genes and proteins to human disease. *Journal of proteomics*.

Rappaport, N., Nativ, N., Stelzer, G., Twik, M., Guan-Golan, Y., Stein, T.I., Bahir, I., Belinky, F., Morrey, C.P., Safran, M., *et al.* (2013). MalaCards: an integrated compendium for diseases and their annotation. *Database (Oxford)* *2013*, bat018.

Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* *433*, 477-480.

Rivera Vargas, T., Boudoukha, S., Simon, A., Souidi, M., Cuvellier, S., Pinna, G., and Poleskaya, A. (2014). Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene* *33*, 2866-2875.

She, Q.B., Halilovic, E., Ye, Q., Zhen, W., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Solit, D.B., and Rosen, N. (2010). 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell* *18*, 39-51.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2007). New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* *28*, 721-729.

Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H., and Huttelmaier, S. (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* *175*, 527-534.

Sutandy, F.X., Hsiao, F.S., and Chen, C.S. (2014). High throughput platform to explore RNA-protein interactomes. *Crit Rev Biotechnol*, 1-9.

Suvasini, R., Shruti, B., Thota, B., Shinde, S.V., Friedmann-Morvinski, D., Nawaz, Z., Prasanna, K.V., Thennarasu, K., Hegde, A.S., Arivazhagan, A., *et al.* (2011). Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol Chem* *286*, 25882-25890.

Tani, H., Mizutani, R., Salam, K.A., Tano, K., Ijiri, K., Wakamatsu, A., Isogai, T., Suzuki, Y., and Akimitsu, N. (2012). Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res* *22*, 947-956.

Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2011). mRNA translation and energy metabolism in cancer: the role of the MAPK and mTORC1 pathways. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *76*, 355-367.

Vikesaa, J., Hansen, T.V., Jonson, L., Borup, R., Wewer, U.M., Christiansen, J., and Nielsen, F.C. (2006). RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *Embo j* *25*, 1456-1468.

Wagner, M., Kunsch, S., Duerschmied, D., Beil, M., Adler, G., Mueller, F., and Gress, T.M. (2003). Transgenic overexpression of the oncofetal RNA binding protein KOC leads to remodeling of the exocrine pancreas. *Gastroenterology* *124*, 1901-1914.

Wei, Q., Yan, J., Fu, B., Liu, J., Zhong, L., Yang, Q., and Zhao, T. (2014). IMP3 expression is associated with poor survival in cervical squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* *45*, 2218-2224.

Yuan, R.H., Wang, C.C., Chou, C.C., Chang, K.J., Lee, P.H., and Jeng, Y.M. (2009). Diffuse expression of RNA-binding protein IMP3 predicts high-stage lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* *16*, 1711-1719.

Zhao, J., Ohsumi, T.K., Kung, J.T., Ogawa, Y., Grau, D.J., Sarma, K., Song, J.J., Kingston, R.E., Borowsky, M., and Lee, J.T. (2010). Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell* *40*, 939-953.

## 謝辞

本研究の機会及び素晴らしい実験環境を与えて下さり、貴重な時間を割いて研究について、懇切丁寧に御指導頂きました東京大学アイソトープ総合センター 教授 秋光信佳先生に心から感謝致します。新しいことを発見することの楽しさと難しさや、研究者とはいかにあるべきかということなど、多くのことを御教授頂きました。

そして、東京大学大学院新領域創成科学科 教授 鈴木穰先生には次世代シーケンサー解析を行う上で、様々なご指導いただきました。鈴木先生のご指導・ご協力の下、技術革新の早いトランスクリプトーム解析を本研究に取り入れることができました。心より感謝申し上げます。

さらに、ヒト臨床癌組織を取り扱う上でご指導いただきました、株式会社エム・シー・オー 大西忠博先生、国保旭中央病院 臨床病理科 鈴木良夫先生、吉田裕先生、栃木直文先生に感謝申し上げます。試料の採取から結果の解釈に至るまで、先生方との議論を通じて臨床組織を取り扱う上での注意すべきことを学ぶことが出来ました。

また、私が所属する東京大学アイソトープ総合センター 秋光研究室の先輩、後輩の皆さんには、日々の研究生生活や教室のセミナーでの数々の有意義な御意見、御助言、御批判を頂きました。深くお礼申しあげます。

最後に、私をここまで育てて下さり、精神面でも支えてくれた両親をはじめ、家族に心から感謝します。