

論文の内容の要旨

癌細胞における

RNA 結合タンパク質 IMP3 の機能解析

水谷 玲菜

【序】

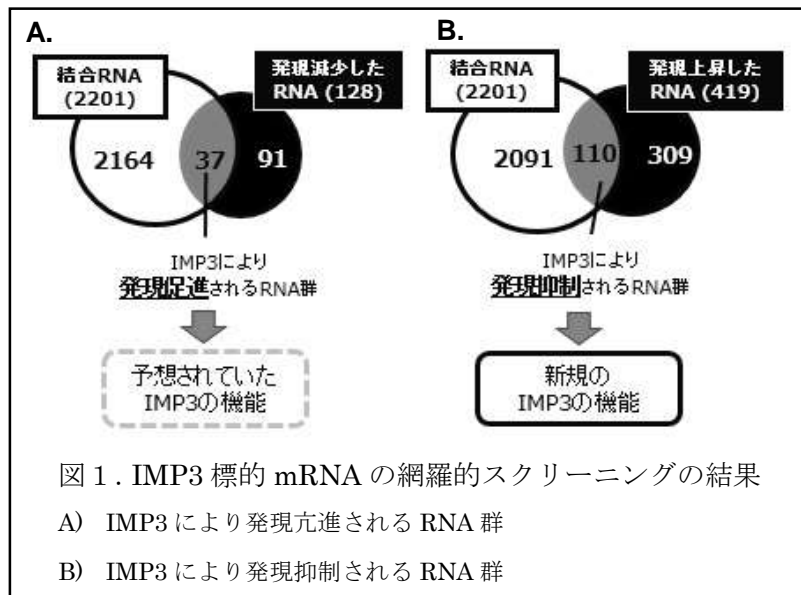
RNA 結合タンパク質は、プロセッシングや細胞内局在、翻訳制御といった遺伝子発現制御の様々なステップにおいて、特定の標的 mRNA と結合することで標的 mRNA の運命を制御している。RNA 結合タンパク質の異常な高発現や欠損は疾患と関連することもわかってきており、RNA 結合タンパク質の機能を理解することは、生命現象を分子レベルで理解するに止まらず医学・薬学の発展にとっても非常に重要である。IMP3 (IGF2 mRNA binding protein 3) は、IGF2 mRNA 結合タンパク質として同定されたがん胎児性の RNA 結合タンパク質であり、異なる遺伝子にコードされる IMP1, IMP2 という 2 種類のアイソフォームが存在する。これらの中では IMP1 の機能解析が最も進んでおり、IMP1 が c-MYC mRNA や CD44 mRNA の mRNA 分解抑制因子 (mRNA 安定化因子) として働くことが知られている。IMP3 は IMP1 との相同性が高いことから、IMP3 も RNA 安定化因子と働くことが予想されてきたが実際に機能解析が行われた例はほとんどない。さかんに行われている臨床研究の結果から IMP3 の発現量と癌患者の予後の悪化に相関があるという報告が多数報告されており、有用な癌の悪性度マーカータンパク質の候補となっているが、IMP3 の癌細胞における機能については不明な点が多く残されている。その理由として IMP3 によって発現制御を受ける標的 RNA 群が同定されていないことが挙げられる。そこで私は IMP3 の標的 RNA 群の同定を行い、機能解析することで癌細胞における IMP3 の機能を明らかにするというを本研究の目的とした。

【結果】

1. IMP3 によって発現制御を受ける RNA 群の網羅的スクリーニング

IMP3 によって発現制御を受けている RNA ならば IMP3 と物理的に相互作用するはずである、という考えに基づき、IMP3 を免疫沈降したときに共沈する RNA 群を次世代シーケンス解析で網羅的に調べた。その結果、2201 種の mRNA が IMP3 と共沈したので、これらを IMP3 結合 mRNA とした。さらに、IMP3 の標的 RNA ならば IMP3 ノックダウンで発現変動するとの考えに基づ

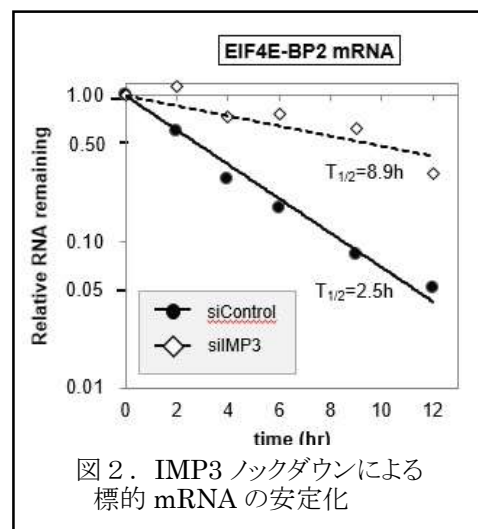
き、次世代シーケンサーを用いて IMP3 ノックダウン細胞における mRNA の発現変動解析を行った。そして、RNA 免疫沈降法の結果と組み合わせることで IMP3 に結合し且つ IMP3 ノックダウン細胞で発現減少した 37 種の mRNA および IMP3 ノックダウン細胞で発現上昇した 110 種の mRNA を IMP3 標的 mRNA 群として同定した (図 1)。これまでは IMP1 と同様に



mRNA の安定化因子であると見なされていたが、予想に反して IMP3 によって発現抑制されている mRNA が多数存在することがわかった。私は IMP3 の新たな機能解明につながると考え、IMP3 によって発現抑制されている 110 種に着目して更なる解析を進めることにした。110 種のうち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 と標的 mRNA が直接相互作用するのか否かを検討したところ EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA が IMP3 と直接結合していることがわかった。

2. IMP3 は標的 mRNA の分解促進に関与している

IMP3 が標的 mRNA の安定性制御に関与するという先行研究の報告があることと EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA が半減期の短い mRNA であることから、IMP3 は標的 mRNA の分解を促進することで発現抑制を行っているのではないかと考え、これを検証した。当研究室で開発した RNA 分解測定法である BRIC (5-BRomo-uridine Immunoprecipitation Chase)法を用いて IMP3 ノックダウン細胞における標的 mRNA の半減期を測定した。BRIC 法とは uridine のアナログにより内在性の RNA をパルスラベルして継時的な RNA 分解を測定する方法である。その結果、IMP3 標的 mRNA である EIF4E-BP2 mRNA, MEIS3 mRNA の半減期は IMP3



ノックダウン細胞で延長していた (図 2)。また、共免疫沈降法により IMP3 と RNA 分解因子の物理的な相互作用の有無を調べたところ IMP3 といくつかの RNA 分解因子との間に物理的に相互作用が確認されたので、IMP3 が RNA 分解因子を標的 mRNA にリクルートすることが示唆された。

3. IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を上昇させている

IMP3 による標的 RNA の発現抑制の生理的意義を理解するために、IMP3 標的 RNA のひとつで

ある EIF4E-BP2 に着目した。EIF4E-BP2 からコードされるタンパク質は翻訳開始に必要な因子である eIF4E に結合し、eIF4E の翻訳活性を抑制することが知られている。eIF4E もがん遺伝子として知られていた。そこで私は IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を上昇させているのではないかとという仮説を立てた。mRNA に結合するリボソームの数によって個々の mRNA の翻訳活性を定量化する手法であるポリソームプロファイリングという手法を用いて IMP3 ノックダウン細胞における eIF4E 制御下にある mRNA の翻訳効率の変化について解析を行った。ショ糖密度勾配遠心法により、コントロール細胞、IMP3 ノックダウン細胞、IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞の細胞質画分から結合するリボソームの数に基づいて mRNA の分画を行い各画分における mRNA 量を定量した結果、eIF4E の制御下にある mRNA である ODC1 mRNA は IMP3 ノックダウンにより重いフラクション(リボソームが多く結合しているフラクション)へとピークがシフトし、IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンでは重いフラクションから軽いフラクション(リボソームの結合が少ないフラクション)へのシフトが見られた。さらにウエスタンブロット法により eIF4E 制御下にある遺伝子である ODC1 のタンパク質レベルでの発現量についても評価したところ、IMP3 ノックダウン細胞において ODC1 の発現量は低下していたが IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では ODC1 の発現量の回復が見られた。

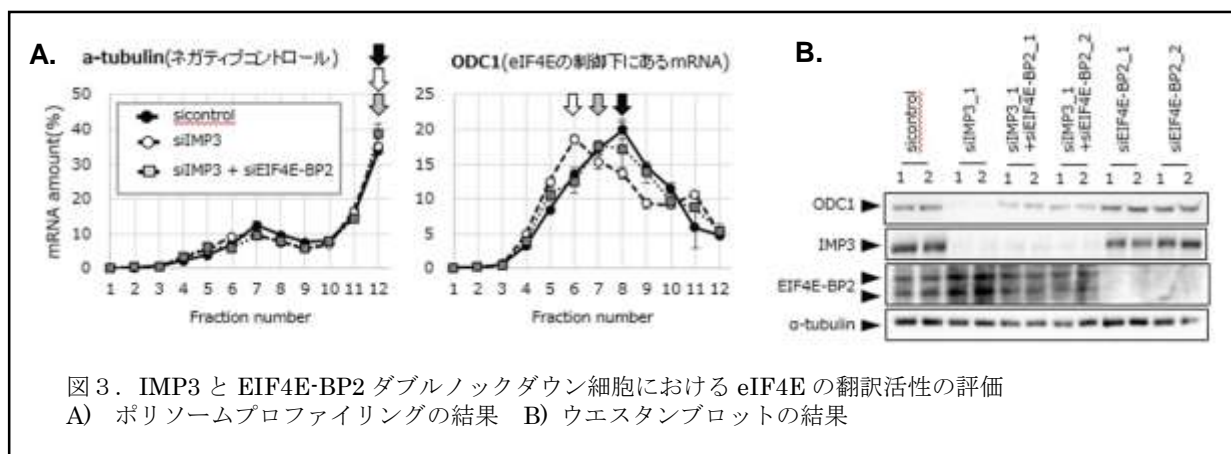


図3. IMP3 と EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞における eIF4E の翻訳活性の評価
A) ポリソームプロファイリングの結果 B) ウエスタンブロットの結果

4. IMP3 は EIF4E-BP2 の発現抑制を介して細胞増殖を促進させている

癌原遺伝子としてもよく知られている eIF4E が細胞増殖を亢進させる因子であること、eIF4E の抑制因子である EIF4E-BP2 は細胞増殖抑制因子であることに着目し、IMP3 が 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。IMP3 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いて生細胞数を数えたところ、IMP3 ノックダウンでは生細胞数の減少が見られたが、IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウン細胞では生細胞数の減少が部分的にはあるが有意に回復した。

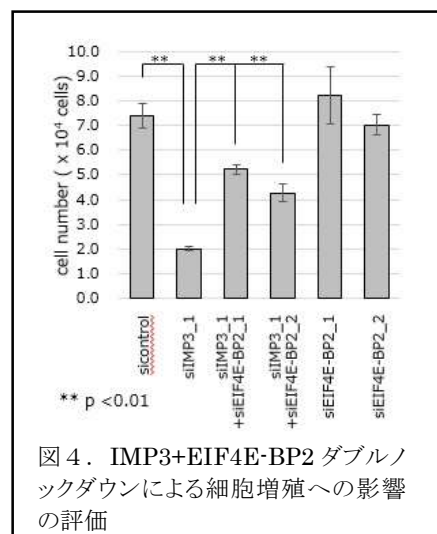
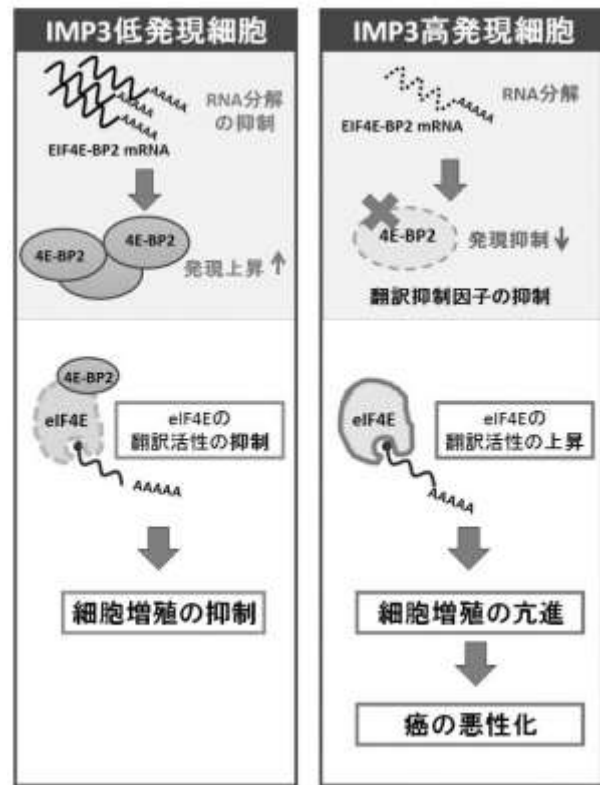


図4. IMP3+EIF4E-BP2 ダブルノックダウンによる細胞増殖への影響の評価

【考察】

これまで IMP3 は RNA の安定化因子として働くと考えられていたが、本研究で網羅的スクリーニングを行った結果、予想に反して 110 種という多くの 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。さらに標的 mRNA である EIF4E-BP2 mRNA や MEIS3 mRNA の分解に関与していることが示唆された。IMP3 が RNA 分解因子としての機能も有するという事は本研究により初めて見出されたことである。また、IMP3 が EIF4E-BP2 の発現抑制を介して eIF4E の翻訳活性を促進し細胞増殖を亢進させているという事が見出された。IMP3 は癌悪性度のマーカータンパク質候補として着目されていた癌関連因子であったが、IMP3 標的 mRNA に着目して解析を行ったことで、癌原遺伝子としてよく知られている eIF4E と IMP3 を関連付けることができ癌細胞における新たな遺伝子発現制御経路を見出すことに成功した。このことは本研究アプローチが癌関連 RNA 結合タンパク質の機能解明に有用であることを示している。



癌の様に RNA 結合タンパク質との関連が強く示唆される疾患のメカニズムを解明するためには、RNA 結合タンパク質の標的 mRNA にも着目して解析することによって、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発見し、理解を深めていくことが重要であると考えられる。

【参考論文】

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.