



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	CED-4 is an mRNA-binding protein that delivers ced-3 mRNA to ribosomes( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	王, 森星
Report No.(Doctoral Degree)	博士(再生医科学) 甲第1010号
Issue Date	2016-03-16
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/54566">http://hdl.handle.net/20.500.12099/54566</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	王 森 星（中華人民共和国）
学位の種類	博士（再生医科学）
学位授与番号	甲第 1010 号
学位授与日付	平成 28 年 3 月 16 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	CED-4 is an mRNA-binding protein that delivers <i>ced-3</i> mRNA to ribosomes
審査委員	(主査) 教授 小 澤 修 (副査) 教授 森 重 健一郎 教授 國 貞 隆 弘

### 論文内容の要旨

アポトーシスは、組織の恒常性維持および神経変性症や癌など疾患の病態に関与している。線虫においては、発生段階で 1,090 個の体細胞のうち 131 個がアポトーシスにより除かれる。この過程において、*cell death abnormal (ced) -4* [*Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) 相同遺伝子] と *ced-3* 遺伝子が重要である。CED-4 は CED-9 [*B cell lymphoma-2* (Bcl-2) 相同遺伝子] と結合し、細胞内のミトコンドリアに局在する。Egg-laying defective-1 (EGL-1) の発現により CED-9 から CED-4 が遊離し、核膜上において CED-4 が CED-3 (カスパー) を活性化することによりアポトーシスが誘導される。しかし、この CED-4 の細胞内での局在変化については、不明な点が多い。一方、先行知見として、*ced-3* プラスミドを細胞に遺伝子導入した場合、CED-4 の存在により CED-3 タンパク質の発現が有意に増加する結果を得た。

そこで本研究では、CED-3 の活性化機構として、CED-4 の①細胞内局在変化と②CED-3 発現に対する作用について解析した。

#### 【対象と方法】

- ① ced-3 遺伝子存在下での CED-4 の局在：mRFP（単量体赤色タンパク質）遺伝子を融合した *ced-4* プラスミドを構築し、これを細胞に遺伝子導入した。この細胞に更に *ced-3* 遺伝子を導入した際の CED-4 の細胞内局在の変化を、細胞分画法により解析した。
- ② CED-4 と L10a タンパク質の相互作用の解析：60S リボソームタンパク質である L10a 遺伝子に GFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子を融合したプラスミドを構築した。これと mRFP-*ced-4* プラスミドを細胞に遺伝子導入し、その局在を *ced-3* 遺伝子の存在下と非存在下で共焦点顕微鏡を用いて解析した。また、HA (hemagglutinin) を融合した *ced-4*-HA プラスミドを構築し、免疫沈降法により解析した。
- ③ CED-4 タンパク質による CED-3 タンパク質の発現誘導：細胞に *ced-3* 遺伝子を単独であるいは *ced-4* と共に遺伝子導入し、その発現量の変化を解析した。また、無細胞系を用いた、CED-4 の *in vitro* 転写翻訳反応により CED-3 の発現への作用を解析した。
- ④ CED-4 タンパク質と *ced-3* mRNA の相互作用の解析：細胞に *ced-3* 遺伝子を単独で、あるいは CED-4 と共に遺伝子導入し、免疫沈降法および逆転写酵素連鎖反応 (RT-PCR) 法によって、CED-4 タンパク質と *ced-3* mRNA の相互作用を解析した。また、大腸菌で発現させた CED-4 タンパク質および無細胞系 *in vitro* 転写反応により合成した *ced-3* mRNA を用いて直接的な結合について解析した。

## 【結果】

- ① *ced-3* プラスミドの遺伝子導入により、CED-4は小胞体膜を含むミクロソーム分画に主に局在した。
- ② *ced-3* プラスミドの遺伝子導入により、CED-4とL10aとの共局在を共焦点顕微鏡により確認した。また、免疫沈降法にてCED-4とL10aとの結合を認めた。
- ③ 細胞にCED-4はCED-3の発現を誘導したが、*in vitro* 転写翻訳反応においてCED-3発現に対するCED-4の作用を認めなかった。
- ④ 細胞にCED-4タンパク質は*ced-3* mRNAと特異的に結合した。CED-4タンパク質は、*in vitro* 転写反応にて合成した*ced-3* mRNAと直接結合した。

## 【考察】

本研究において、CED-4が*ced-3* mRNA結合タンパク質であるという新規作用を明らかにした。*ced-3* mRNAの存在下では、CED-4タンパク質は小胞体膜などを含む分画に移動する。一方、CED-4にlymphocyte kinaseのN末端側の配列を融合させて強制的に細胞膜に局在させると、CED-3タンパク質の発現誘導を認めなかった。これらの結果から、CED-4の細胞内局在がCED-3の発現および機能に重要であると考えられる。また、CED-4タンパク質は、*ced-3* mRNA存在下においてL10aとの結合が増加したが、*ced-3* mRNAの翻訳への作用は認めなかった。以上のCED-4の細胞内局在変化と*ced-3* mRNAとの特異的結合から、CED-4はRNA結合タンパク質として*ced-3* mRNAをリボソームへ輸送することによりアポトーシスを制御すると考えられた。

## 【結論】

CED-4は*ced-3* mRNAと特異的に結合し、それをリボソームへと運ぶことでCED-3の翻訳を増加させ発現を上昇させる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 王 森星は、CED-4が*ced-3* mRNA結合タンパク質であること、さらにCED-4とリボソームタンパク質であるL10aが結合することを示し、CED-4による新たなCED-3活性化機構を明らかにした。本研究の成果は、神経生物学ならびにアポトーシス研究の進歩、加えて神経変性症や癌に対する治療法の開発に少なからず寄与するものと認める。

---

### [主論文公表誌]

Miaoxing Wang, Masanori Itoh, Shimo Li, Yoko Hida, Kazunori Ohta, Miki Hayakawa, Emika Nishida, Masashi Ueda, Salful Islam, Tana, Toshiyuki Nakagawa : CED-4 is an mRNA-binding protein that delivers *ced-3* mRNA to ribosomes

Biochem Biophys Res Commun 470, 48-53 (2016).