



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(要約版(Digest))
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	http://hdl.handle.net/20.500.12099/54566

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。

学位論文要約
Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 1010 号

氏名: 王 淼 星
Full Name Miaoqing Wang,

学位論文題目: CED-4 は mRNA 結合タンパク質であり、CED-3 の mRNA をリボソームへ運搬する
Thesis Title CED-4 is an mRNA-binding protein that delivers *ced-3* mRNA to ribosomes

学位論文要約:
Summary of Thesis

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。