

研究マインド支援グラント 報告書

平成27年度 研究マインド支援グラント(若手) 報告書

RNA 結合タンパク質と RNA との結合における RNA メチル化の意義

研究代表者 米田 竜馬 (医学部 ゲノム医学研究センター)

緒 言

RNAもDNAやヒストンと同様にメチル化やアセチル化といった化学修飾を受ける。しかし、その生理的な意義については未解明な部分が多い。最近の研究によりRNAのメチル化がRNAとタンパク質との結合に影響を与え、mRNAの安定性に関与していることが報告された。この考えはRNAエピジェネティクスと呼ばれ、「RNAもDNAやヒストンと同様に、アセチル化やメチル化修飾を受け、これらの修飾が重要な機能を持つ」という概念である¹⁾。

RNAは、5' capとして知られる7-メチルグアノシン(m^7G)の他に、5-メチルシトシン(m^5C)やN6-メチルアデノシン(m^6A)などのメチル化を受けることが知られている。しかし、その機能に関してはようやく報告が増えてきたばかりであり、 m^5C 修飾と m^6A 修飾は、RNA-タンパク質間の結合を変化させることが示されている^{2,3)}。そこで、本研究ではRNAの中でもタンパク質をコードしないlong noncoding RNA (lncRNA)に注目し、そのメチル化/非メチル化により、RNA結合タンパク質との結合がどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

Cyclin D1 (CCND1) 上流領域から転写されるlncRNAに注目して、RNAメチル化がRNA結合タンパク質との結合に及ぼす影響を調べた。CCND1は、細胞周期のG1/S期チェックポイントを制御しており、B細胞リンパ腫、乳がん、肺がん等で過剰発現が報告されている。その上流領域からは、DNA損傷によって誘導されるいくつかのlncRNAが発現している。これらのlncRNAがRNA結合タンパク質Translocated in Liposarcoma (TLS, またはFused in Sarcoma (FUS))と結合し、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)であるCBPのHAT活性を阻害することで、DNA損傷によるCCND1遺伝子の発現を抑制すると考えられている⁴⁾。今回は、発現しているlncRNAの中で最も発現量が高いlncRNA (promoter associated noncoding RNA-D (pncRNA-D))に着目して、pncRNA-DとTLSとの結合におけるRNAメチル化の効果を検証した。

材料・方法

本研究では主にヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞を

用いた。HeLa細胞のRNAを抽出し、 m^5C および m^6A 修飾を認識する抗体を用いたRNA免疫沈降法(RIPアッセイ)により、pncRNA-Dのメチル化部位を同定した。また、放射線の代わりに0.4 MのソルビトールをHeLa細胞に処理することで、pncRNA-Dの発現を誘導し、 m^6A と m^5C という二つのRNAメチル化レベルがどのように変化するか観察した。また m^6A 修飾については認識するタンパク質を同定するため、YTHDF1および2、そしてYTHDC1に対する抗体を用いたRIPアッセイを行った。

結 果

1) pncRNA-Dのメチル化部位の同定

まず、pncRNA-Dの m^5C および m^6A の修飾部位の同定を行った。 m^5C 修飾については、DNAのメチル化部位を同定するときに使用されるbisulfite法を用いた。その結果、 m^5C 修飾はpncRNA-Dの72番目と277番目のシトシンに起こる事がわかった(図1)。 m^6A 修飾に関しては、RRACH (R: A/G, H: G以外) 配列のアデノシンに起こりやすいことが分かっており、中でもGGACU配列のアデノシンに修飾が入ることが多い。pncRNA-Dには467番目のアデノシンがその配列にあたり、抗 m^6A 抗体を用いたRIP後の次世代シーケンサー解析の結果でも、この配列が含まれる断片が多く検出されることから、467番目のアデノシンが m^6A 修飾を受けていると判断した。

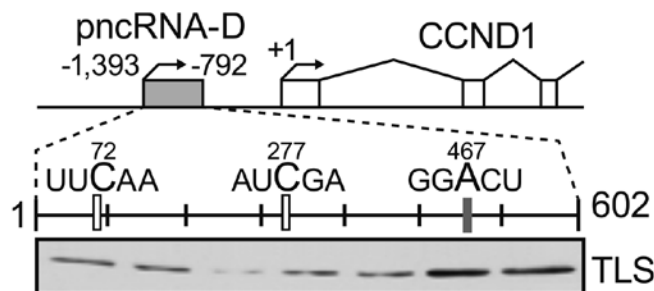


図1. 白いボックスは m^5C 修飾を受けるCを、黒いボックスは m^6A 修飾を受けるAの位置を示している。下にはpncRNA-Dの各断片とTLSとの結合をRNA pull down assay後のwestern blotの結果により検出した。

2) *in vitro* RNAメチル化系の確立

RNAメチル化が実際にpncRNA-DとTLSとの結合に影響を及ぼすかを検証するため、*in vitro* RNAメチル化系の立ち上げを試みた。m⁵C、m⁶Aのメチル化酵素としてそれぞれNSun2と、METTL3および14、WTAPが知られているため、これらのリコンビナントタンパク質を、大腸菌を用いて作製した。メチル化基質であるSAMを加え、RNAのメチル化を試みたが、メチル化を検出できなかった。原因として上記の酵素単体ではなく、複合体として機能していることが予想されたため、現在は細胞にFLAGタグをつけたNSun2とWTAPを発現させ、FLAGタグで複合体そのものを取りきて、メチル化を試みている。

3) RNAメチル化によるTLSとの結合の変化

in vitro RNAメチル化系がうまく機能しなかったため、TLSとpncRNA-Dとの結合にRNAのメチル化が関与しているのかを間接的に調べた。初めにpncRNA-DとTLSとの相互作用におけるソルビトール処理による影響を見るため、TLS抗体を用いたRIPアッセイを行った。その結果、ソルビトール未処理の状態に比べ約2倍、結合が強まることを明らかにした(図2左)。一方で、m⁶A修飾レベルを調べた結果、ソルビトール処理後に著しく低下することが分かった(図2右)。さらに、pncRNA-DとTLSとの結合を詳しく検証した。具体的には、pncRNA-Dを7つの断片に分け、それぞれの断片をビオチン化し、どの断片がTLSと強い相互作用を示すか検討した。その結果、m⁵Cとm⁶A修飾が起こる配列がTLSと強く結合することを明らかにした⁵⁾(図1下)。*in vitro*で合成したビオチン化pncRNA-D断片はメチル化を受けていないため、m⁵Cとm⁶A修飾はpncRNA-DとTLSとの結合を阻害している可能性が考えられる。

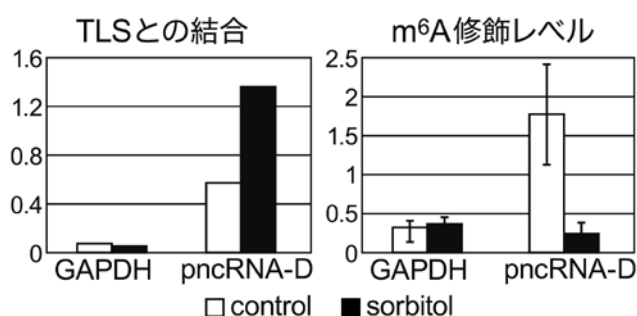


図2. ソルビトール処理後のpncRNA-DとTLSとの結合とm⁶A修飾レベル。

4) m⁶A修飾を認識するタンパク質の同定

m⁶A修飾は認識するタンパク質の違いにより、RNAに及ぼす影響が変わる。現在、認識タンパク質としてYTHDF1、YTHDF2、hnRNP-A2/B1、そしてYTHDC1が知られており、それぞれ翻訳促進、RNA分解、miRNA生成、そしてRNAスプライシングに関与しているとされる。これらのタンパク質のうち、hnRNP-A2/B1を除

く抗体を用いたRIPアッセイを行った結果、pncRNA-Dは主にYTHDC1と結合していることが分かった。しかし、pncRNA-Dはスプライシングを受けていないので、YTHDC1との結合がどのような影響を及ぼしているのかを今後、明らかにしていく。

考 察

上記の結果から間接的にはあるが、RNAメチル化がpncRNA-DとTLSとの結合を阻害している可能性が示唆された。もう一つの可能性として、pncRNA-Dの分解を促進する事によってTLSとの結合を阻害している事も考えられる(図3上)。しかし、ソルビトールや放射線による外部刺激により、pncRNA-Dの発現が強く誘導されると、RNAメチル化レベルは減少し、TLSとpncRNA-Dとの相互作用が強まり、最終的にCCND1の発現が抑制されると予想される(図3下)。

RNAメチル化とがんとの関連については、肺がんの細胞株を用いた研究により、転移の際に起きる上皮間葉転換に置いてMEG3というlncRNAのメチル化が関与していることが報告されている⁶⁾。CCND1も肺がんや乳がんを含む多くのがんで、その過剰発現が報告されていることから、pncRNA-Dのメチル化とがんとの関連も今後明らかに

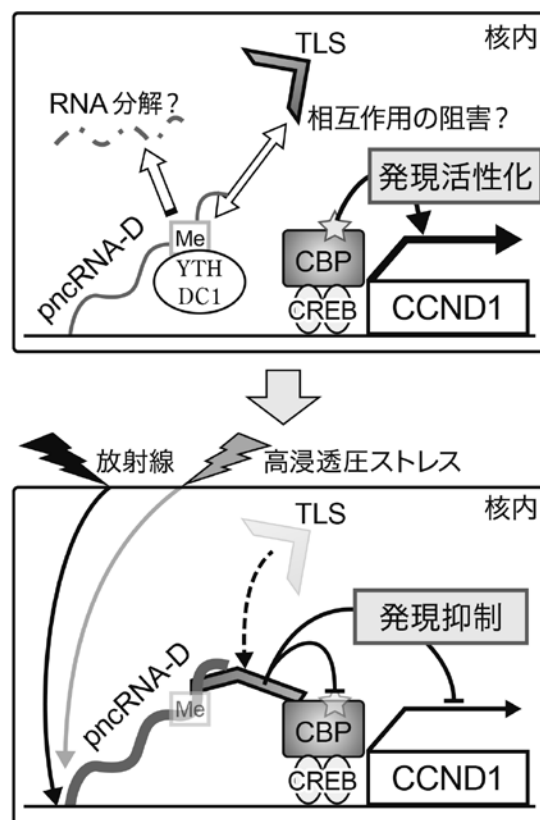


図3. pncRNA-DによるCCND1の発現抑制モデル図。通常時、pncRNA-Dは転写量が低くRNAメチル化レベルも高い(上)。しかし、放射線などによるストレスを受けると、pncRNA-Dの発現が誘導され、メチル化レベルが減少し、最終的にCCND1の発現を抑制する(下)。

していく。CCND1 の過剰発現はがん細胞の増殖異常を介して、予後の悪化につながる事が多く、CCND1 の発現を特異的に低下させる事で、上記のがんにおける治療へと本研究を発展させていく。

謝 辞

この研究は当部門・黒川理樹教授のアドバイスの下に遂行されました。また、HeLa細胞の培養には当部門の上田奈緒美助手にご協力頂き、次世代シーケンサー解析に関してはトランスレーショナルリサーチ部門の平田智子助手、並びに神田将和助教に多大なご協力を頂き、深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nat Chem Biol* 2010; 6(12): 863-5
- 2) Amort T, Soulière MF, Wille A, Jia XY, Fiegl H, Wörle H, et al. Long non-coding RNAs as targets for cytosine methylation. *RNA Biol* 2013; 10(6): 1003-8
- 3) Wang Y, Li Y, Toth JI, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2014; 16(2): 191-8
- 4) Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, et al. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 2008; 454(7200): 126-30
- 5) Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, Kondo K, Nagata T, Katahira M, Kurokawa R. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin

D1. *Cell Biosci* 2016; 6: 4

- 6) Terashima M, Tange S, Ishimura A, Suzuki T. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2016; [Epub ahead of print]

研究成果リスト

論 文

- 1) Yoneda R, Sato Y, Yoshida I, Kawamura S, Kotani T, Kimura AP. A genomic region transcribed into a long noncoding RNA interacts with the Prss42 / Tessp-2 in spermatocytes during mouse spermatogenesis, and its flanking sequences can function as enhancers. *Mol Reprod Dev* 2016; 83(6): 541-57
- 2) Yoneda R, Suzuki S, Mashima T, Kondo K, Nagata T, Katahira M, Kurokawa R. The binding specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA transcribed from the promoter region of cyclin D1. *Cell Biosci* 2016; 6: 4

学会発表

- 1) 米田竜馬, 鈴木志穂, 黒川理樹. The binding between lncRNA transcribed from CCND1 promoter and RNA binding protein TLS, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月, 神戸

著 書

- 1) 米田竜馬, 黒川理樹. ポストゲノム時代に同定された転写活性型lncRNA群-eRNAによる転写活性化のメカニズム. *実験医学増刊* vol.33 No.20: 3274-5, (2015)