

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18401

研究課題名(和文)新規がん治療標的経路として同定したhypusine経路の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of mechanism of hypusine pathway in cancer

研究代表者

村松 智輝(Muramatsu, Tomoki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：90732553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、現在までにタンパク質翻訳を担うhypusine経路の活性化が、がんの悪性化に寄与することを明らかにしてきた。しかし、hypusine経路の直接の被翻訳遺伝子は不明であることから、eIF5A(翻訳因子)に結合するRNAを同定することを目的とした。RNA-ChIP法を施行した後、RNAシーケンス解析とRT-PCRにより、被翻訳候補遺伝子を抽出した。抽出した被翻訳候補遺伝子に対してKEGGパスウェイ解析を行うと細胞骨格、接着、移動・浸潤に関わる分子が多く存在していることが明らかとなった。また、シーケンス解析データを基にeIF5Aの結合塩基モチーフを決定することを試みた。

研究成果の概要(英文)：Activation of hypusine pathway, which relates to the translation, contributes to malignant phenotype in cancer. However, since direct target genes of hypusine pathway remain unclear, I tried to identify mRNAs which bind to eIF5A, a translational factor, in this study.

As first, I performed RNA-ChIP assay for isolation of mRNAs, which were binding to eIF5A. After that, I analyzed its sequence using ion proton. Next, I and Dr. Tanimoto, a computational scientist, extracted the candidate genes. To evaluate whether the candidate genes bind to eIF5A, I performed RT-PCR using each specific primer of these genes. Then, I found that some candidate genes bound to eIF5A. In addition, to determine the pathways which are regulated by eIF5A, I performed KEGG pathway analysis against extracted candidate genes. As a result, I found that eIF5A might regulate the translation of cytoskeleton and adhesion molecules. Moreover, we tried to identify the binding motif of eIF5A based on RNA sequencing data.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Hypusine経路 がん転移 移動・浸潤 RNA-ChIPシーケンス eIF5A タンパク質翻訳

1. 研究開始当初の背景

がんの悪性化の要因の一つであるがん転移は、複雑かつ多段階のステップによって成立する事象であり、これまでも様々な分子機序が報告されてきた。しかし、この転移の一連の流れを包括的に解析するための有用な *in vitro/ in vivo* 解析モデル系が十分でなく、具体的な解析法には制約があり、転移に関与する分子やシグナル経路の同定は未だ困難である。がん転移の解析において、古典的かつ有用な実験方法として *in vivo selection* が知られている。これは、外来性のがん細胞を移植し、他臓器へ転移した後、転移部位から高転移性の亜株を樹立する方法である。申請者は同手法を用いて、がん転移関連遺伝子の同定を試みた。その結果、高転移性亜株特異的に 19p13.2-p13.13 領域のゲノム増幅を認め同領域内に座位する Deoxyhypusine synthase (DHPS) をがん転移関連遺伝子として同定した (Muramatsu T et al. *Oncogene* 2016)。DHPS は、hypusine 経路を構成する酵素の一つであり、基質である eukaryotic translation initiation factor (eIF5A) を hypusine 化し、活性化させる働きを持つ。Hypusine 化した eIF5A は、翻訳を促進させ、細胞増殖や発生などに関わることが知られている。申請者は、DHPS の過剰発現により、hypusine 経路が活性化し、細胞の移動・浸潤が亢進することを明らかにした。また、マウスの移植実験では DHPS の発現抑制によってリンパ節転移の頻度が減少すること、腫瘍増殖能が低下することを認めた。その分子メカニズムを発現アレイのデータを基に解析した結果、RhoA シグナルの活性化を認め、hypusine 経路を抑制することにより、RhoA のタンパク質発現が減少することを確認した。その際、RhoA の mRNA の発現は変化しなかったことから、hypusine 経路が RhoA の翻訳を制御している可能性が浮き彫りとなった。しかし、実際に eIF5A が RhoA の mRNA に結合し、翻訳を制御しているかどうかは不明である。そこで、申請者は本研究において、eIF5A の被翻訳遺伝子を解析することにより、hypusine 経路の新規がん治療標的遺伝子としての可能性を明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

申請者は、eIF5A を対象に RNA-ChIP 法 (RIP 法) と RNA シークエンス法を組み合わせ、eIF5A の被翻訳遺伝子を同定することならびにその生物学的意義について検討することを目的とした。

また、hypusine 化阻害剤を用いて、プロテオーム解析を行いその結果を上記 RNA シークエンス結果と統合的に解析し、被翻訳遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

eIF5A には、非常に相同性の高い 2 つの



図1 本研究の流れ

isoform (eIF5A1, eIF5A2)が存在しており、それぞれ機能が異なると考えられている。特に eIF5A2 はがん細胞において発現が亢進しており、がんの進展に寄与している可能性が高い。一方、eIF5A1 は、全身に恒常的に発現している遺伝子ではあるが、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の両方の報告がある。以前の申請者らによる報告では、がん遺伝子としての機能を明らかにしている。したがって、申請者は、それぞれの強制発現用コンストラクトを作成し、RIP 法と RNA シークエンス解析を組み合わせ、それぞれの被翻訳遺伝子の同定を試みた。また、RNA シークエンスデータを基にそれぞれの結合配列の決定をも試みた (図1)。

また、hypusine 化阻害剤である (GC7) を用いて、二次元電気泳動を施行して、タンパク質発現の減少したスポットの解析を試みた。

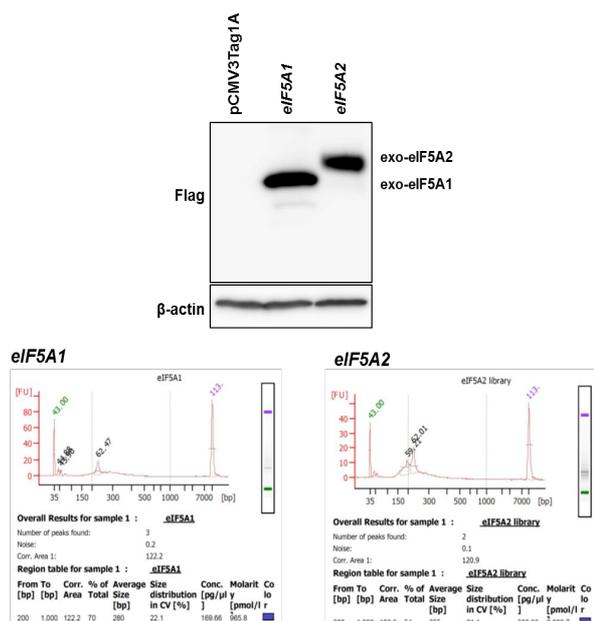


図2 eIF5A1,2強制発現系の構築とバイオアナライザーの結果

4. 研究成果

細胞に eIF5A1,2 それぞれを強制発現し、細胞を固定後、タグ抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降の後、RNA を分離し、超音波処理を行いバイオアナライザーでの検討を行った。超音波の条件設定は、何度も施行し、RNA シークエンス解析へ移行可能な最適な条件を決定した (図 2)。その後、抽出した RNA を cDNA へと合成し、ion proton (Thermo Fisher Scientific) によってシークエンス解析を行った。その際、東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室 谷本幸介先生にご協力をいただき、データ解析を行った。eIF5A は、PPP (プロリン-プロリン-プロリン) もしくは PPG (プロリン-プロリン-グリシン) を持つタンパク質を特異的に翻訳することが知られている。そのため、解析の条件として、上記のモチーフを有することならびに解析リード数が 100 以上のものに絞り込んだ。その結果、eIF5A1, 2 の結合する候補遺伝子を抽出した。その後、抽出した遺伝子が実際に結合するかどうかを確認するため、RIP 法で得た RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、いくつかの遺伝子に関しては結合している可能性があった。しかし、それら遺伝子のタンパク質の発現は、現在検討中であり、eIF5A1, 2 が翻訳に関与しているかどうかは不明である。また、シークエンス解析の結果から、結合塩基モチーフの候補も抽出した。いくつかの特異的なモチーフが抽出されたが、非常に長いモチーフとなってしまうため、条件の再検討が必要である。一方、結合するかどうかは不明であるが、リード数が 100 以上の結合候補遺伝子を KEGG のパスウェイ解析に入力すると、細胞骨格や移動・浸潤に関与する経路が有意差を持って抽出された (図 3)。この結果は、以前、申請者が論文報告した内容と一貫しており、hypusine 経路は細胞骨格や細胞間接着を制御することにより、浸潤・転移に寄与していることが裏付けられた。

eIF5A1

Term	Count	%	PValue
Spliceosome	15	3.080082136	1.11E-05
Focal adhesion	15	3.080082136	0.001620588
Notch signaling pathway	6	1.232032854	0.010300716
Insulin signaling pathway	10	2.05338809	0.014405283
Adherens junction	7	1.437371663	0.021849501

eIF5A2

Term	Count	%	PValue
Spliceosome	30	2.311248074	6.61E-08
Adherens junction	18	1.386748844	6.54E-05
Axon guidance	24	1.848998459	1.28E-04
Notch signaling pathway	13	1.001540832	1.83E-04
Focal adhesion	30	2.311248074	7.97E-04
Endocytosis	25	1.926040062	0.008204369
Regulation of actin cytoskeleton	28	2.157164869	0.008625903
RNA degradation	11	0.847457627	0.011686801
Wnt signaling pathway	21	1.617873652	0.012896294
Lysine degradation	9	0.693374422	0.018832504
Ubiquitin mediated proteolysis	18	1.386748844	0.036772699

図3 eIF5A1,2結合候補遺伝子を用いた KEGGのパスウェイ解析

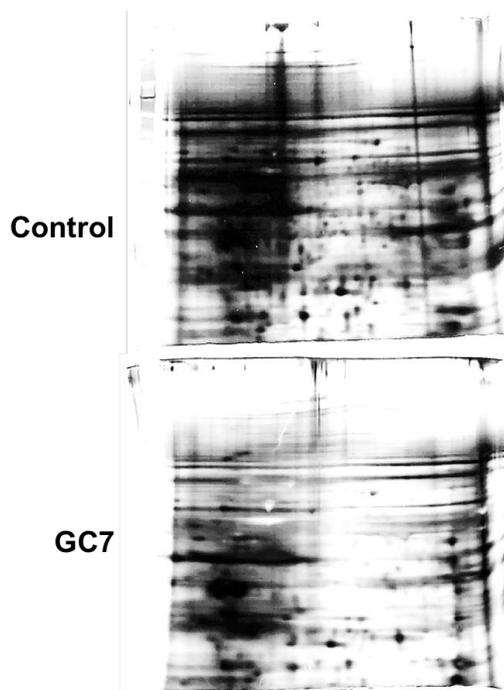


図4 GC7を用いた二次元電気泳動 (上: コントロール 下: GC7処理)

Hypusine 経路に制御されるタンパク質を同定するために hypusine 化阻害剤である GC7 によって処理したタンパク質を用いて、二次元電気泳動を行った。その結果を基に解析を進めているが、現在のところ被翻訳遺伝子の同定には至っていない (図 4)。

本研究において、RNA シークエンス解析まで終了し、eIF5A の被翻訳候補遺伝子の抽出までは完了した。プロテオーム解析については、二次元電気泳動の条件から見直し、hypusine 経路の阻害によって減少するタンパク質の同定を行う必要がある。今後、さらなる検討を重ね eIF5A の被翻訳遺伝子を探索するとともに、がんにおける hypusine 経路の生物学的意義を明らかにすることを目標とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Muramatsu T, Kozaki KI, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J.

The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 査読あり
35(40):5304-5316. 2016
doi: 10.1038/onc.2016.71.

〔学会発表〕(計 1 件)

Muramatsu T, Tanimoto K and Inazawa J. Exploring target genes of eukaryotic initiation factor 5A in cancer using RNA

sequence analysis
AACR Annual Meeting 2016,
2016年4月16~20日 (Ernest N. Morial
Convention Center New Orleans,
Louisiana, USA)

〔図書〕(計1件)
村松智輝、稲澤譲治
株式会社 エヌ・ティー・エス
「次世代がん治療」
2017年6月8日 386頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
東京医科歯科大学プレスリリース
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20160404.pdf>

6. 研究組織
(1)研究代表者
村松 智輝 (Muramatsu Tomoki)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：
90732553