

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06941

研究課題名(和文) ABHファミリーを介したRNAエピジェネティクス制御による新たな癌分子機序の提唱

研究課題名(英文) RNA epigenetics regulation by ALKBH family

研究代表者

長谷 拓明 (hase, hiroaki)

大阪大学・薬学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：80779926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ALKBH6ノックダウンHeLa細胞由来200ヌクレオチド以上のRNAとALKBH6カイコリコンビナントタンパク質の反応により1-methylguanine量が増加する結果が得られた。また、ALKBH6と複合体を形成するmRNAの存在が示唆され、ALKBH6はmRNAを標的とし遺伝子発現に影響を与えている可能性が見出された。また、淡明細胞型腎細胞癌部においてALKBH6発現は顕著に増加しており、細胞株を用いたALKBH6ノックダウン実験では増殖、遊走、浸潤能の低下が見られ、ALKBH6が淡明細胞型腎細胞の増悪に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The amount of 1-methylguanine increased by the reaction of ALKBH6 knocked down HeLa cells derived large RNA (>200 nt) and ALKBH6 silk recombinant protein. It was suggested that ALKBH6 and mRNA may form a complex, and was found that ALKBH6 may target mRNA and affect gene expression. In addition, ALKBH6 expression was markedly increased in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), and ALKBH6 knockdown experiment using ccRCC cell line showed a decrease in proliferation, migration and invasion ability. Suggesting that ALKBH6 may contribute to exacerbation of ccRCC cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：エピトランスクリプトミクス ALKBH

### 1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストン蛋白質の修飾によるエピジェネティクス制御が様々な生命現象を制御しているとともに、配列変異が原因と考えられてきた癌細胞の出現にも関わることが明らかにされてきた。一方、RNA も種々のメチル化等修飾の存在が知られているが生物学的意義や制御機構は不明確な点が多い。

当研究室では RNA 脱メチル化能を有する大腸菌蛋白質 AlkB のヒトホモログである AlkB homolog (ALKBH)ファミリーを同定し(図 1)、さらに各種癌組織での高発現と予後不良性との相関性を明らかとてきた。これらの背景より申請者は、RNA メチル化修飾も癌発症や悪性化と関連性を有すると想起するに至った。

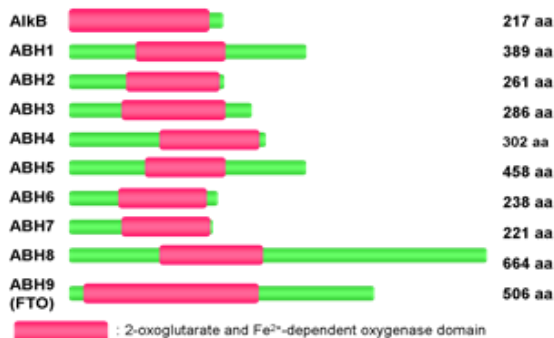


図 1 ALKBH ファミリーの模式図

### 2. 研究の目的

ALKBH ファミリー分子による RNA の脱メチル化制御の解析と癌との関連性解明を目的とする。そして癌細胞においては正常細胞とは異なる RNA エピジェネティクス制御が成されているという独創的研究成果を示す。

### 3. 研究の方法

ALKBH ファミリーノックダウン HeLa の作成: 子宮頸癌細胞株 HeLa に shRNA をレンチウイルスを用いて導入することで、各 ALKBH ファミリーの安定ノックダウン細胞株を樹立。樹立した細胞株における各 ALKBH ファミリーの mRNA レベル発現低下は real-time PCR により定量化して確認した。

RNA メチル化修飾の測定: ALKBH ファミリーノックダウン HeLa より抽出した 200 ヌクレオチド以上の Large RNA と 200 ヌクレオチド以下の Small RNA の各 RNA を nuclease P1、phosphodiesterase、alkaline phosphatase を用いて酵素処理しヌクレオチドにまで分解し、得られたサンプルを ACQUITYUPLC system-タンデム四重極型質量分析計による各塩基のメチル化/非メチル化レベルを定量することで、ALKBH ファミリーノックダウン HeLa 細胞における RNA メチル化変化を検証した。

ALKBH ファミリー会合 RNA の探索: ALKBH フ

ァミリー会合 RNA の探索を目的に以下の検討を行った。細胞内でビオチン化される BioEase タグ融合 ALKBH ファミリー発現ベクターを構築し 293 細胞に一過性に強制発現させ、ストレプトアビジンビーズで Bioease タグ融合 ALKBH ファミリーをプルダウンし、これと 293 細胞由来 Total RNA とを混合させた。そして洗浄操作の後、BioEase タグ融合 ALKBH ファミリーと共沈した RNA について次世代シーケンサーを用いることで配列の同定を行った。次世代シーケンシングの結果より得られた会合候補 mRNA については、BioEase タグ融合 ALKBH ファミリー発現ベクターを 293 細胞、HeLa 細胞に一過性に強制発現させ、ストレプトアビジンビーズでプルダウンし、共沈した RNA を逆転写後 real-time PCR によるバリデーション実験を行った。

癌臨床検体における ALKBH6 発現検討: 淡明細胞型腎細胞癌臨床検体を用いてウエスタンブロットにより ALKBH6 発現の検討を行った。

淡明細胞型腎細胞における ALKBH6 ノックダウン表現型解析: 淡明細胞型腎細胞癌細胞株である 786-0 を用いて ALKBH6 siRNA によるノックダウン実験を行った。増殖性、遊走、浸潤能についての表現型解析を xCelligence システムを用いて検証した。

### 4. 研究成果

①ALKBH ファミリーノックダウン HeLa 細胞を樹立し、この細胞における増殖能について WST-8 を用いた検証を行った。すると ALKBH2、6 ノックダウン HeLa 細胞において増殖能低下が認められた(図 2)。また、遊走能を wound healing assay により検討すると、ALKBH2、3、5、7、8、9 ノックダウン HeLa 細胞において運動性低下が見られた。現時点においてこれら増殖、遊走に関わる分子メカニズムの詳細は明らかではないが、ALKBH ファミリー分子が機能性分子であることを確認できた。

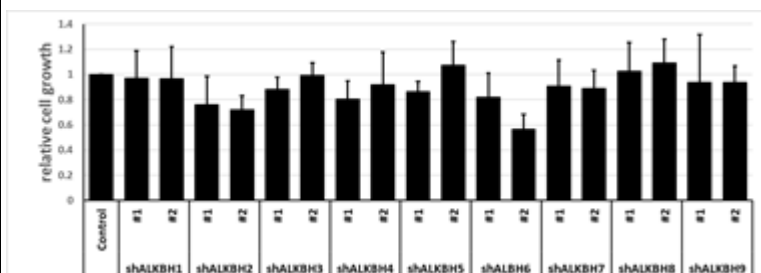


図 2 ALKBH ファミリーノックダウン HeLa 細胞の増殖能比較検討

②ALKBH ファミリーノックダウン HeLa 細胞から 200 ヌクレオチド以上の RNA と 200 ヌクレオチド以下の RNA を分離抽出し、タンデム四重極型質量分析計による各塩基の修飾レベルを定量した。結果、ALKBH1 ノックダウン HeLa 細胞の 200 ヌクレオチド以下 RNA におい

て 5-hydroxymethylcytosine の低下(図 3) 及び、ALKBH6 ノックダウン HeLa 細胞 200 スクレオチド以下 RNA における N6-methyladenosine 量増加が見られた(図 4)。

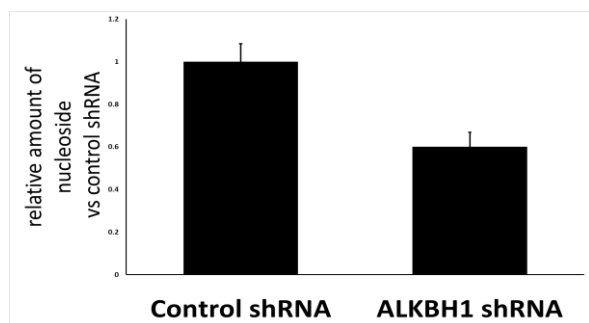


図 3 ALKBH1 ノックダウン HeLa 細胞由来 Small RNA の 5-hydroxymethylcytosine 定量比較

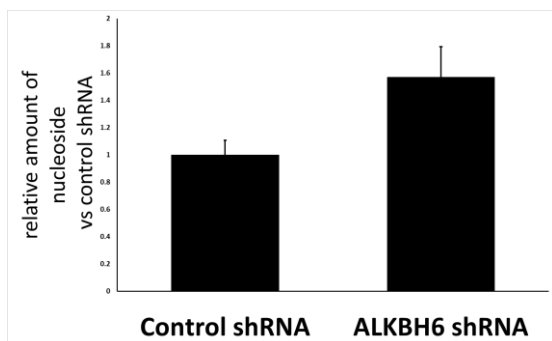


図 4 ALKBH6 ノックダウン HeLa 細胞由来 Small RNA の N6-methyladenosine 定量比較

ALKBH1 についてはすでに tRNA に含まれる 5-methylcytosine の酸化反応を触媒し 5-hydroxymethylcytosine へと変換させる働きがあることが知られている。そして、200 スクレオチド以下 RNA は主として tRNA で構成されていることが知られているため、ALKBH1 ノックダウンにより 200 スクレオチド以下 RNA における 5-hydroxymethylcytosine の低下は妥当な結果であると考えられる。

一方で、ALKBH6 はこれまで機能解析の報告のない機能未知分子である。ALKBH6 のノックダウンによる増殖性低下の表現型解析結果や RNA メチル化レベルの変化が認められた結果は、RNA epigenetics に関する新たな機構の存在を示唆しているものと期待され、意義深いものであると考えられた。そこで以降の検討については ALKBH6 を中心に行うこととした。

③ALKBH6 ノックダウン HeLa 細胞より 200 スクレオチド以上と以下の RNA を抽出しこれらと ALKBH6 カイコリコンビナントタンパク質と反応させた後、質量分析計によって各修飾スクレオチドを定量化し、ALKBH6 酵素活性の

有無を検証した。結果、200 スクレオチド以下の N6-methyladenosine 量に変化はなく 200 スクレオチド以上の RNA に含まれる 1-methylguanosine 量の増加が見られた(図 5)。

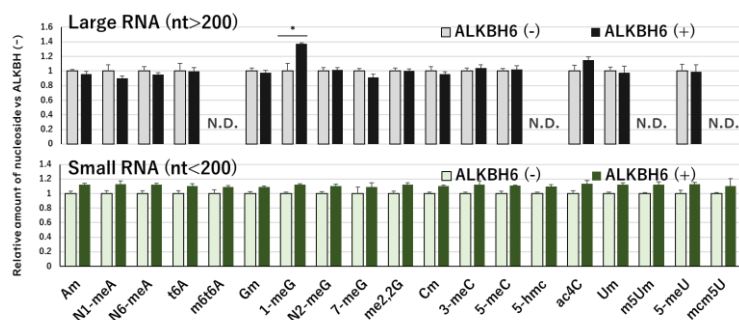


図 5 ALKBH6 カイコリコンビナントタンパク質と反応させた ALKBH6 ノックダウン HeLa 細胞由来 RNA における各種修飾スクレオチドの比較

これらの結果は、ALKBH6 が 200 スクレオチド以上の RNA に含まれるグアニン塩基修飾に関与する可能性を示唆しつつ、ALKBH ノックダウン細胞を用いた検証では必ずしも ALKBH の直接的基質を探索する目的には適さない可能性を示唆しているものと考えられる。この現状を踏まえると RNA の鎖長で分離している方法を変更し、基質となりうる配列を同定する検討が必要であり、基質塩基の探索に加え標的となる RNA の探索が必要であると考えた。

④ALKBH ファミリー会合 RNA の探索実験より、293 細胞において ALKBH6 が ZEB1 mRNA 等と複合体を形成していることが示唆された(図 6)。またこの傾向は HeLa 細胞においても同様のものであった(図 7)。

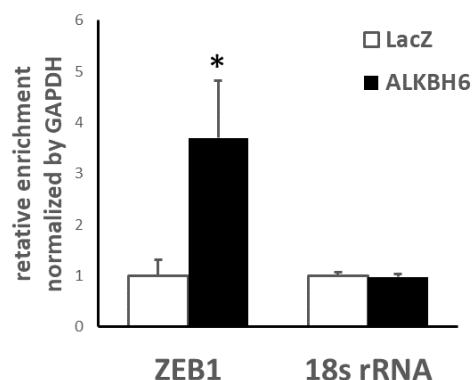


図 6 293 細胞における BioEase タグ融合 ALKBH6 プルダウンサンプル中における ZEB1 mRNA 定量実験

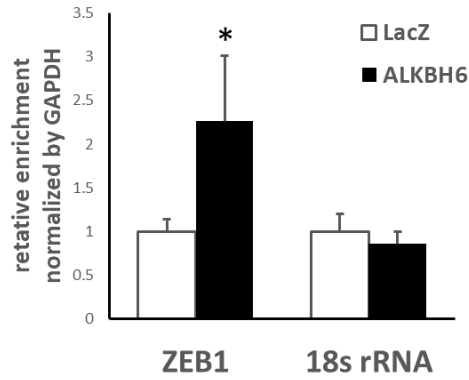


図 7 HeLa 細胞における BioEase タグ融合 ALKBH6 プルダウンサンプル中における ZEB1 mRNA 定量実験

⑤さらに、ZEB1 及び同じく mRNA との複合体形成が示唆された SOX2 は ALKBH6 強制発現によりタンパク質発現量の増加が認められた (図 8)。ALKBH6 が mRNA に会合することでタンパク発現に影響を与えている可能性が示唆された。

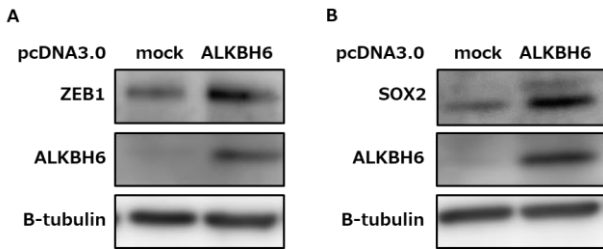


図 8 HeLa 細胞における ALKBH6 強制発現時の(A)ZEB1,(B)SOX2 タンパク質発現

⑥ALKBH6 発現と癌との関連について検討を行った。淡明細胞型腎細胞癌患者計 13 例より得た、非癌部及び癌部の臨床検体からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにより ALKBH6 の発現量を比較検討すると非癌部に比べ癌部において発現増加が認められ、ALKBH6 が淡明細胞型腎細胞癌の癌部において機能していることが示唆された (図 9)。

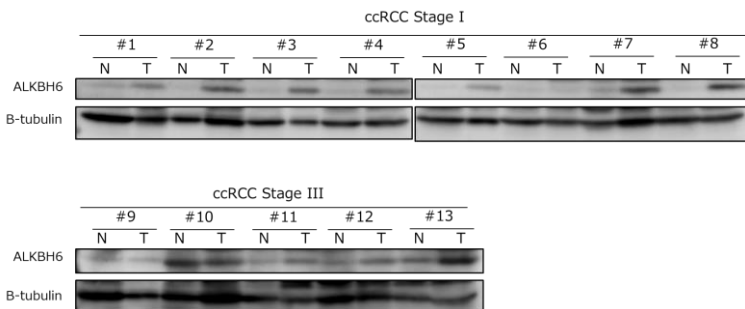


図 9 淡明細胞型腎細胞癌臨床検体を用いた ALKBH6 タンパク質発現確認

⑦RNA 干渉法により淡明細胞型腎細胞癌細胞株である 786-O の ALKBH6 をノックダウンし、その表現型を解析すると増殖性、遊走能、浸潤能の低下が起きた (図 10-12)。

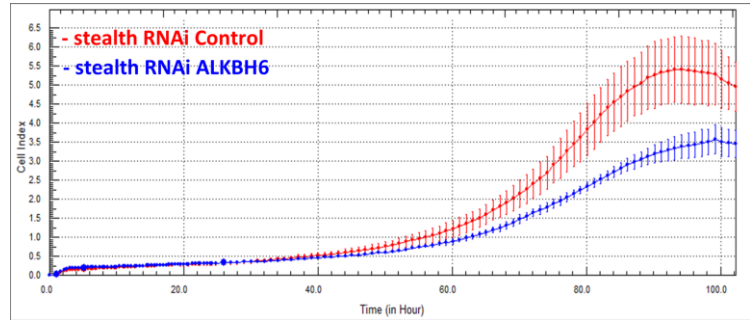


図 10 ALKBH6 ノックダウン 786-O 細胞の増殖能検討実験

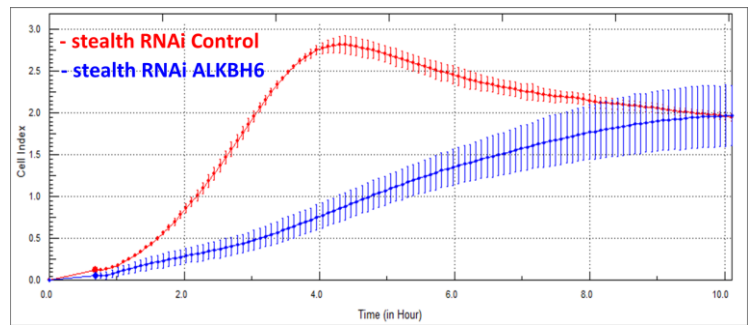


図 11 ALKBH6 ノックダウン 786-O 細胞の遊走能検討実験

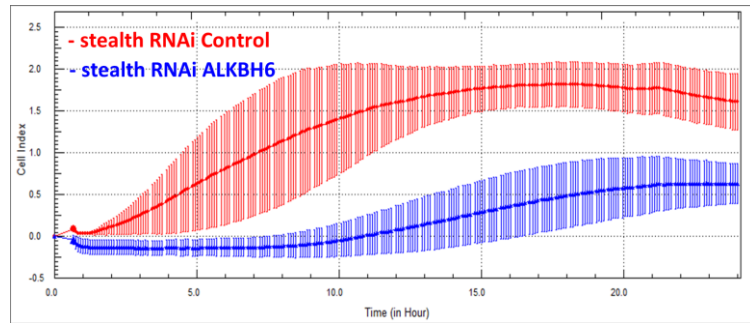


図 12 ALKBH6 ノックダウン 786-O 細胞の浸潤能検討実験

これらの結果から ALKBH6 が RNA 機能制御分子の可能性を有し、淡明細胞型腎細胞癌の増悪に寄与する分子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 3件)

① 第39回日本分子生物学会年会

「RNA epigenetics による生体制御の基盤的研究」

長谷 拓明, 大塩 郁幹, 上田 裕子, 北惠 郁緒里, 西本 愛, 犬伏 智子, 木本 瑞基, 古川 龍彦, 辻川 和丈

② 日本薬学会第137年会

「ALKBH6 による RNA メチル化制御の検討」

長谷拓明、大塩郁幹、上田裕子、木本瑞基、北惠郁緒里、西本愛、犬伏智子、辻川和丈

③ 2017年度生命科学系学会合同年次大会

「タンデム四重極型質量分析計を用いた ALKBH ファミリーによる RNA 修飾制御の検討」長谷拓明、大塩郁幹、上田裕子、北惠郁緒里、西本愛、木本瑞基、犬伏智子、辻川和丈

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷拓明 (Hiroaki Hase)

大阪大学大学院・薬学研究科・特任助教

研究者番号: 80779926

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )