

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19050

研究課題名(和文)新規ノンコーディングRNA、MYMLRによるMYCの制御機構の解明

研究課題名(英文)The understanding of the regulatory mechanisms how MYMLR regulates MYC

研究代表者

梶野 泰祐 (Kajino, Taisuke)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50723673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌において重要な働きをしている転写因子MYCを制御する新規長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)、MYMLRの解析を行った。In vitroの解析ではMYMLR結合タンパク質を網羅的に探索し、また、MYMLRの結合するゲノムDNAを検出するChIRP法を立ち上げると共にMYMLRがMYCのプロモーター領域に結合することを見出し、MYMLRによるMYCの制御の詳細な分子機構の一端を解明した。また、ノックアウトマウスを用いたin vivoの解析では、MYMLRノックアウトマウスを作成し、ラインの樹立と生体におけるMYMLRの重要性について検討した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified the novel long non-coding RNA (lncRNA) MYMLR as a regulator of MYC transcriptional factor in lung cancer. To understand the molecular mechanisms how MYMLR regulates MYC, we performed RNA pull down assay by the usage of BrU-labelled MYMLR and identified MYMLR-binding proteins. In addition, we established ChIRP (Chromatin isolation by RNA purification) assay methods and found that MYMLR bound to MYC promoter. Furthermore, we generated germ line knockout mice of Mym1r and found that Mym1r knockout mice were viable. These results indicated that MYMLR is indispensable for tumor growth but not in normal organs or tissues, suggesting that MYMLR is the potential druggable target for lung cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：MYC lncRNA

1. 研究開始当初の背景

全ゲノム解析が進むにつれ、ゲノム DNA の 70%もの領域が転写されている一方で、タンパク質をコードする RNA は、ほんの 2%しか含まれていないことが明らかになった。しかしながら、肺癌における lncRNA の重要性ならびにその標的遺伝子に関しては不明な点が多く残されている。

研究代表者はこれまでに、MYC の活性を制御する新規 lncRNA、MYMLR (MYC-modulating lncRNA) を同定した。MYMLR は MYC の発現に必須であり、MYC の活性化に重要な働きをしていることを見出した。そのため、MYMLR による MYC の詳細な分子機序並びに生体内における MYMLR の重要性の理解による複雑な癌の機構の解明が必須であった。

2. 研究の目的

近年、lncRNA の研究が進み、Howard Chang や John Rinn らが HOTAIR などの lncRNA の機能を報告し、研究が進みつつある一方で、非常に膨大な lncRNA のそのほとんどの機能は謎に包まれている。さらに、lncRNA はタンパク質や RNA などと結合し、複雑に機能することが知られているため、MYMLR がどのようにして MYC の発現を制御しているのか、その詳細な分子機構の解明を目的とした。

lncRNA と癌との関連は指摘されつつあるが、その機能は多岐にわたり、未だ不明な点が数多く残されている。そこで、invitro の解析により MYMLR による MYC の制御機構の詳細を明らかにすると同時に、MYMLR ノックアウトマウスを作成し、生体内における MYMLR の生理学的役割を検討する。研究代表者はすでに CRISPR システムを用いた MYMLR の全長のノックアウトマウスの作成を既に開始していたため、MYMLR キメラマウスを得ていた。そこでその MYMLR キメラマウスを交配し、MYMLR ノックアウトマウスのラインの樹立を行うと共に、生体内における MYMLR の重要性について検討する。特に、MYMLR の標的遺伝子の一つである MYC は生体において必須であり、MYC ノックアウトマウスは胎性致死の表現型を示すことが知られているため、MYMLR ノッ

クアウトマウスが胎性致死を示すのか、またその場合には発生のどの段階にて MYMLR が機能するかを検討し、肺癌ならびに生体内における MYMLR の機能の全容の解明を目指した。

3. 研究の方法

MYMLR 結合タンパク質の同定には、BrU ラベル化 MYMLR とマスペクトロメトリーを組み合わせて行った。In vitro にて合成した BrU ラベル化 MYMLR あるいは GFP を精製し、細胞質画分あるいは核画分の細胞抽出液を混ぜ、抗 BrU 抗体にてプルダウンを行った後、MYMLR 結合タンパク質を単離・精製してマスペクトロメトリーにより同定した。また、MYMLR と MYMLR 結合タンパク質との結合は、RNA プルダウン法あるいは RNA 免疫沈降法により検証した。

MYMLR の結合するゲノム DNA 領域の同定には ChIRP 法を用いた。細胞をグルタルアルデヒドにて固定したのちに回収し、細胞核画分を精製、その後、ゲノム DNA を超音波破碎し、細胞内在性の MYMLR を、ビオチン化ラベルした MYMLR 相補的プローブを用いてプルダウンした。MYMLR 結合 DNA 領域は、特異的プライマーを用いた PCR 法にて検出した。

MYMLR ノックアウトマウスの樹立には、MYMLR キメラマウスと野生型マウスとの交配により進めた。15匹の雄のキメラマウスと野生型のマウス(雌)と交配し、産仔をジェノタイプングして MYMLR ヘテロノックアウトマウスを得た。マウスの体重は18週齢のマウスを各遺伝子型雌雄共に7-11匹を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) MYMLR 結合タンパク質の同定

lncRNA はタンパク質や DNA あるいは RNA と結合して働くことが知られているため、MYMLR 結合タンパク質の同定を行った。BrU ラベルした MYMLR あるいはネガティブコントロールとして用いた BrU ラベル化 GFP を細胞質および核抽出液を混ぜ、MYMLR をプルダウンした。その後、MYMLR 結合タンパク質を精製し、マスペクトロメトリーによる網羅的な探索を行い、MYMLR と結合する候補タンパ

ク質を同定した。MYMLR 結合候補タンパク質のうち、最もスコアの高かったタンパク質 MBP1 (MYMLR-binding protein 1) と MYMLR との結合について検証したところ、RNA プルダウン法ならびに RNA 免疫沈降法においても MYMLR と MBP1 との結合を確認した (図 1)。

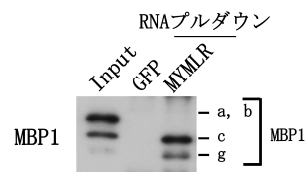


図 1 MYMLRとMBP1との結合

(2) MYMLR と MYC プロモーターの結合

これまでに我々は、MYMLR が MYC の発現を転写レベルにて制御することを明らかにしており、また、MYC は様々な癌種においてプロモーターの活性化やエンハンサーなどによる転写制御を受けること、更には lncRNA のうちいくつかはゲノム DNA に結合して働くことから、MYMLR が特定の DNA 領域と結合し、MYC の転写制御をしている可能性について検討した。MYMLR が結合する DNA 領域を同定するために、細胞内在性の MYMLR をプルダウンする ChIRP 法の確立を行った。肺癌細胞を固定したのちにゲノム DNA を破碎し、アンチセンスオリゴを用いて細胞内在性の MYMLR をプルダウンし、PCR 法にて結合 DNA 領域を検出した。その結果、MYMLR は MYC プロモーター領域と結合することを明らかにし、ChIRP 法の立ち上げに成功した (図 2)。



図 2 MYMLRとMYCプロモーターとの結合

(3) 生体内における MYMLR の重要性

我々は、MYMLR は MYC の発現を制御することにより MYC の転写活性を制御し、癌細胞の増殖を制御していることを明らかにした。また、MYC は細胞の増殖や分化に必須の働きをしており、個体発生において重要な働きをしていることが知られている。そこで in vitro の解析による詳細な MYC 制御機構の解明と並

行して、MYMLR の機能の解析を個体レベルにて開始した。我々は既に CRISPR システムを用いて Mymlr ノックアウトのキメラマウスを 15 匹得ていた。そこで、これらのキメラマウスと野生型マウスをそれぞれ交配したところ、1 匹のキメラマウスのみ生殖細胞への Mymlr ノックアウトが受け継がれていたため、このキメラマウスより Mymlr ヘテロノックアウトマウスを樹立し、ライン化を行った。Mymlr ノックアウトマウスのラインを確立させた後、Mymlr ヘテロノックアウトマウスを交配させ、Mymlr の個体発生・分化における重要性について検討した。すると、Mymlr ホモノックアウトマウスは生存しており、十分交配を重ねても雌雄共にメンデルの法則に基づく割合にて産仔を得た (表 1)。

	雄 (匹)	雌 (匹)	計 (匹)
Mymlr +/+	62	48	110
+/-	92	95	187
-/-	44	65	109
計 (匹)	198	208	406

表 1 Mymlrノックアウトマウスの出生率

また、Mymlr の成体における影響を調べるために、18 週齢時におけるマウスの体重を測定したが、野生型と比較しても大きな差異は認められなかった (図 3)。

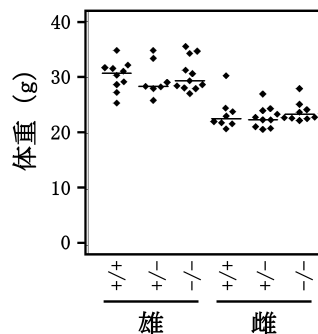


図 3 Mymlrノックアウトマウスの体重

本研究においては、培養細胞を用いた in vitro の解析より、MYMLR 結合タンパク質の同定と MYMLR が MYC のプロモーターへ結合することを見出し、MYMLR による MYC の制御の詳細な分子機構の解明に迫る一方、生体における MYMLR の重要性に関しては、標的遺伝子の MYC のノックアウトマウスの表現型と異なり、MYMLR ノックアウトマウスが生存しているという結果を得た。今後は、MYMLR の各種

組織等を各種マーカー遺伝子や病理学的に解析することにより、生体内における MYMLR の機能に迫ると共に、癌細胞における MYMLR の機能をより詳細に明らかにしていく予定である。

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 2件)

Griesing S, Kajino T, Tai MC, Liu Z, Nakatochi M, Shimada Y, Suzuki M, Takahashi T. Thyroid transcription factor-1-regulated microRNA-532-5p targets KRAS and MKL2 oncogenes and induces apoptosis in lung adenocarcinoma cells. Cancer Sci. 2017 Jul;108(7):1394-1404. doi: 10.1111/cas.13271. 査読有

Liu Z, Yanagisawa K, Griesing S, Iwai M, Kano K, Hotta N, Kajino T, Suzuki M, Takahashi T. TTF-1/NKX2-1 binds to DDB1 and confers replication stress resistance to lung adenocarcinomas. Oncogene. 2017 Jun 29;36(26):3740-3748. doi: 10.1038/onc.2016.524. 査読有

[学会発表](計 2件)

Taisuke Kajino, Teppei Shimamura, Shuyi Gong, Kiyoshi Yanagisawa, Masahiro Nakatochi, Sebastian Griesing, Yukako Shimada, Keiko Kano, Motoshi Suzuki, Satoru Miyano, Takashi Takahashi Divergent lncRNA MYMLR regulates MYC by eliciting DNA looping and promoter-enhancer interaction Keystone Symposia, DNA and RNA Methylation, 2018年 バンクーバー、カナダ

梶野泰祐、島村徹平、Shuyi Gong、柳澤聖、中枋昌弘、Sebastian Griesing、島田友香子、加納圭子、宮野悟、高橋隆 システム生物学的探索を通じた MYC を制御する新規 lncRNA MYMLR の同定と機能の解明 第76回日本癌学会学術総会 2017年 横浜

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0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 0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
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/molcar/jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶野 泰祐 (TAISUKE KAJINO)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50723673

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし