

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14653

研究課題名(和文) エピトランスクリプトミクス機構の解明 新規癌分子機序の提唱を目指して

研究課題名(英文) Elucidation of epitranscriptomics mechanism

研究代表者

長谷 拓明 (hase, hriaoki)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80779926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ALKBH リコンビナントタンパク質と質量分析を用いた方法により、ALKBH ファミリーの新規基質探索を行った。結果、新たな反応経路としてALKBH4 による200ヌクレオチド以下のRNA (small RNA) に含まれるmchm5U の低下反応、rRNA に対するALKBH1 によるhm5C 生成反応、およびALKBH5 によるrRNAおよびsmall RNA 中のm6A 脱メチル化反応の存在が示唆された。その他、機能未知ファミリー分子であるALKBH6 は腎臓癌にて発現と予後に相関があり、その発現抑制はがん細胞株の増殖を抑制し、スフィンゴシン1リン酸合成経路に関わる事を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA エピトランスクリプトミクスについて新たな制御機構の存在を示すことが出来た。特に、未だRNA に対する酵素活性が報告されていないALKBH4 機能の可能性を示せたことは大きいと思われる。ALKBH4 が制御する可能性の示されたmchm5U はALKBH8 により生成される修飾体であり、エピトランスクリプトミクス制御機構の新たな経路の存在が考えられる。また、ALKBH4 の肺がん患者における予後と発現の相関性を示すデータを保持しており、今後mchm5U の生成経路並びにその反応経路の詳細と癌における機能解析を進め、癌の分子基盤におけるエピトランスクリプトミクスの発展に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：A novel substrate of the ALKBH family was searched by a method using ALKBH recombinant protein and mass spectrometry. As a new reaction pathway, there were suggested that ALKBH4 decrease mchm5U contained in small RNA, hm5C formation reaction of ALKBH1 in rRNA and m6A demethylation reaction of ALKBH5 in rRNA and small RNA. In addition, it was clarified that ALKBH6, a family molecule of unknown function, is associated with the high expression and prognosis in renal cancer, and that the suppression of its expression suppresses the growth of cancer cell lines and is involved in the Sphingosine-1-Phosphate biosynthetic pathway.

研究分野：分子病態学

キーワード：エピトランスクリプトミクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メチル化をはじめとした RNA の転写後修飾に関してはこれまで 100 種を超える存在が知られており、この修飾機構が正常に制御されることにより RNA はその機能を果たしていると推測されている。以前までは、一度施された RNA 修飾は不変的であると考えられてきた。しかし近年一部の RNA 塩基は可逆的な修飾制御を受けることで翻訳やスプライシング、細胞内輸送等が緻密に管理されている事が明らかとなった。この RNA の後天的修飾による遺伝子の翻訳段階の調節機構は「エピトランスクリプトミクス」という新たな概念として最近注目されている。エピトランスクリプトミクス機構は疾患との関連についても検証がなされており、最新の報告によると、癌細胞では RNA に施された特定の修飾の挙動が正常細胞と異なること、RNA 修飾の制御異常が癌細胞特有の形質惹起に寄与している可能性が示唆されている。そして ALKBH ファミリー分子は RNA 脱メチル化反応等を介してエピトランスクリプトミクスに関わり、癌の悪性を誘導することが示されてきている。

このような背景から ALKBH ファミリーの機能解析は分子生物学的にも創薬応用としても非常に重要な課題であると考えた。しかしながらその働きには不明な点が多く、ALKBH ファミリー分子のすべての基質や機能の解明には至っていない。また、100 種を超える RNA 修飾がそれぞれのどのような働きを持ち癌悪性化に寄与し得るのかという点についてはほとんどが未解明である。

### 2. 研究の目的

我々はドリフトタイムイオンモビリティ搭載四重極飛行時間型質量分析計の活用により未知 RNA 修飾を探索し、タンデム四重極型質量分析計を用いることによる修飾ヌクレオシドの定量系を確立している。これら 2 種類の質量分析計を活用することで、精密な RNA 修飾の測定・定量および新規 RNA 修飾の探索解析が可能なエピトランスクリプトミクス研究基盤体制を確立している。この技術基盤をもとに ALKBH により制御される機能未知 RNA 修飾の存在、そしてその修飾を施された RNA がどのような機能を持ち癌の発症や悪性化に結びつくのか、この新規癌分子機序の提唱を目指した。

### 3. 研究の方法

ALKBH ファミリーによるあらたな基質の探索を目的として、がん細胞株より抽出し、精製した 200 ヌクレオチド以上の large RNA および 200 ヌクレオチド以下の small RNA として large RNA からオリゴdT を用いて得た polyA RNA に対し ALKBH カイコリコンビナントタンパク質を反応させ、ヌクレオチドに分解後、修飾体を質量分析装置により検出し定量比較を行った。現在、我々が構築した実験系では 40 種類を超える RNA ヌクレオチドを高感度に同時測定が可能となっている。これを用いて各 ALKBH ファミリーリコンビナントタンパク質との反応前後で量的に変動する修飾 RNA の解析を行った。

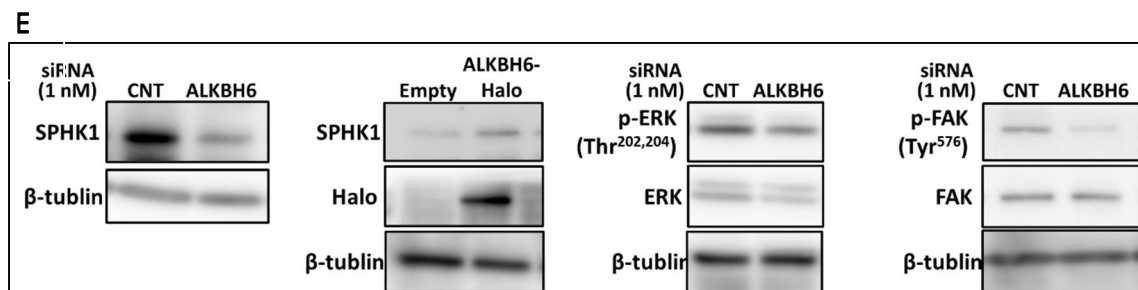
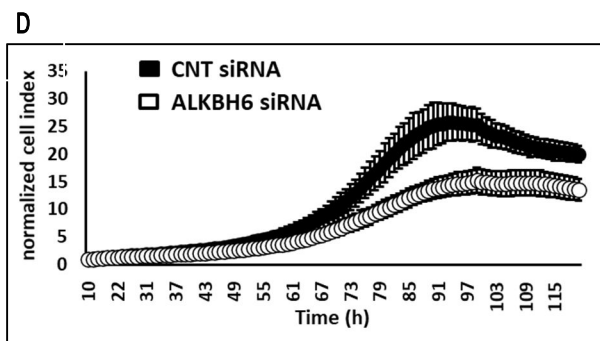
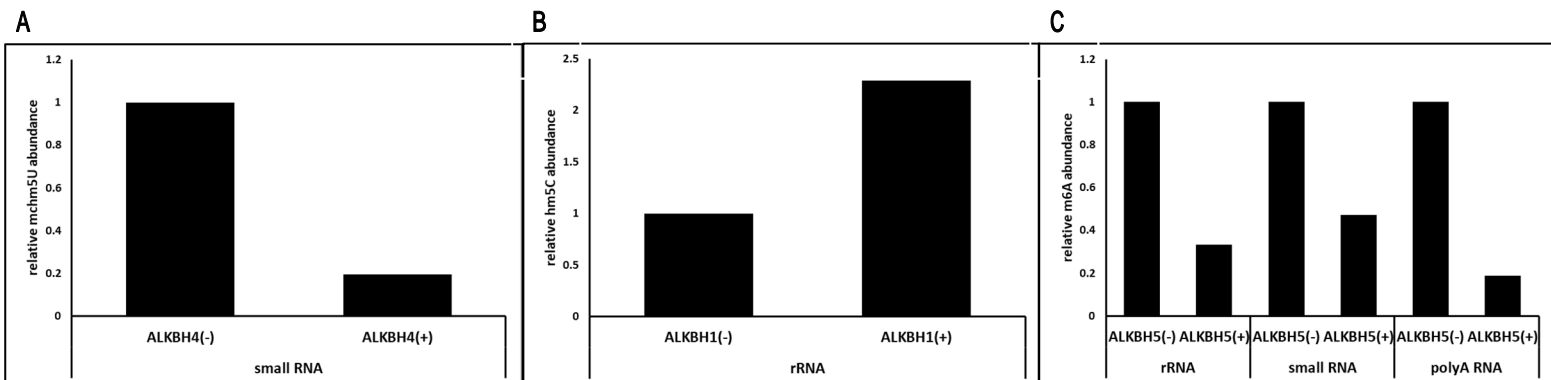
また、ALKBH ファミリーと癌との関連について解析を進めるべく、これまで機能に関する報告がなく、機能未知分子である ALKBH6 に特に焦点を当て、癌における機能解析を試みた。これには公共データベース TCGA のデータより腎臓癌において ALKBH6 の発現が高いほど予後不良であることが示されていたことから、腎臓癌細胞における ALKBH6 ノックダウン実験を行い、その際の増殖性やシグナル解析を実施した。また、質量分析装置を応用しメタボローム解析を行うことで腎臓癌細胞における ALKBH6 機能の詳細な解析を試みた。

### 4. 研究成果

RNA に対する反応が報告されていない ALKBH4 が 200 ヌクレオチド以下の RNA において検出される mcm5U 量を低下させることが示唆された(A)。これまでの mcm5U についての知見は、特定 tRNA のゆらぎ位置に存在しており同じく ALKBH ファミリーの一員である ALKBH8 による mcm5U の酸化反応で生成することが報告されていたが、今回さらなる反応経路の存在を示した。また、これまで tRNA における hm5C 生成を担うとされていた ALKBH1 は rRNA においても hm5C 生成に寄与している可能性が結果として得られた(B)。ならびに、mRNA における m6A 脱メチル化を触媒し mRNA の機能調節に関与する ALKBH5 は mRNA 以外にも rRNA や small RNA においても検出される m6A に対しても脱メチル化している可能性が示された(C)。このように ALKBH リコンビナントタンパク質と質量分析を用いた検討から新たな RNA エピトランスクリプトミクス制御経路の存在を示唆する結果が得られた。特に ALKBH4 については我々の研究室の検討から肺がんにおける高発現と予後不良性が相関することを見出し、今後この修飾反応経路が癌悪性化にどのような機序で関わっているのかを解析していく考えだ。現在、がん細胞やノックアウトマウスを用いて分子病態のおよび生理的機能についての検討を行っている。

一方、腎臓癌細胞における ALKBH6 の機能として、ノックダウンにより増殖能の低下が認められた(D)。この時、FAK シグナルおよび MAPK シグナルの低下が起きており、ALKBH6 がこれらシグナル経路の活性化に寄与することで癌増殖を正に制御している可能性が示唆された。さらにメタボローム解析から Sphingosine 1-phosphate 量が ALKBH6 ノックダウンにより低下し、高発現により増加する結果が得られ、その生合成タンパク質である SPHK1 の発現が ALKBH6 ノックダウンにより低下し、過剰発現により増加することを明らかとした。Sphingosine 1-phosphate は

FAK, MAPK シグナルを含む癌促進的なシグナル活性に関連する分子あることから、ALKBH6 により腎臓癌悪性化機序の一端を解明できたと考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroaki Hase, Mizuki Kimoto, Takahiro Kogaki, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Kentaro Jingushi, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 Functional analysis of the unknown gene ALKBH6 by metabolome analysis using UHPLC / Q-TOF-MS
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroaki Hase, Mizuki Kimoto, Takahiro Kogaki, Yuko Ueda, Kaori Kitae, Kentaro Jingushi, Kazutake Tsujikawa
2. 発表標題 質量分析計を用いたメタボロームおよびエピトランスクリトーム解析による機能未知遺伝子ALKBH6の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----