

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06554

研究課題名（和文）抗転移細胞で特異的に発現するタンパク質の分子機序解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of RNA receptor protein in antimetastatic cells

研究代表者

富田 毅 (Tomita, Takeshi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：20302242

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）：ヒト免疫担当細胞のうち、一部のNK細胞は細胞外RNAによって活性化される。この免疫活性化により、NK細胞はがん転移を抑制する抗転移細胞となることが分かっている。細胞外RNAにより抗転移細胞が活性化する分子メカニズムの詳細については分かっていないため、本研究では精製タンパク質を用いた解析を行うこととした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物細胞を用いた実験により、細胞外にRNAを示すとともに、RNAのレセプターとなっているタンパク質（ZC3H12D）を明らかにした。細胞外にはRNAを分解する酵素であるRNアーゼが存在していることから、細胞外にRNAが存在することと、そのRNAが独自の生理機能を持つことは一般的に想定されていなかった。本研究により、細胞外核酸に対する新しい概念を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：Natural Killer cells (NK cells) are part of immune cells in human. It has been reported that sub-population of NK cells are activated by non-vesicular extracellular RNA to combat tumor cells circulating blood vessels. Because the signaling of this activation is not elucidated, this study analyzed the receptor protein-RNA interaction to account for the the detailed molecular mechanisms.

研究分野：生物化学

キーワード：細胞外核酸

1. 研究開始当初の背景

がんの転移は多くの段階からなる。腫瘍原発巣から周辺組織へ浸潤したがん細胞が、最終的に転移先の臓器で再増殖するまでには 100 以上の因子が関与することがこれまでの研究から明らかとなっており、それらの描く全体像は非常に複雑なものである。がん転移を有効に予測・予防する方法は現存しない。このため現在もなお新しい診断・予防法の確立を目指して、がん転移の分子メカニズムを解析する試みが盛んになされている。これらの研究のほとんどは、腫瘍原発巣または血中を循環する腫瘍細胞に直接はたらきかけるものであり、我々の研究グループのように、転移先の臓器の応答に注目したものは少数派である。これまでの基礎研究から、腫瘍原発巣が存在する個体において、転移先の臓器では、転移を有利にするような反応が起こっていることが明らかとなっている。我々の研究グループは、このような転移を有利にするような反応が起こっている状態を、転移前土壌というタームで表現しており、転移前土壌を探知・改善することにより、がん転移を抑制するための手法を探っている。我々の先行研究では、背部にがん組織を移植した担がんマウスにおいて、がん細胞の主な転移先である肺で起こっている一種の炎症様反応が詳細に調べてられてきた。その結果、がん細胞の遠隔臓器への転移を抑制する機能を持つ「抗転移細胞」が肺に存在することが明らかとなった。(Hiratsuka, Tomita et al., EMBO Mol Med, 2018) この細胞の実体は、転移先の臓器に特異的に存在する NK (ナチュラルキラー) 様の免疫担当細胞である。

この抗転移細胞での遺伝子発現解析を行ったところ、亜鉛フィンガータンパク質である ZC3H12D が特異的に発現していることが判明した。このタンパク質の構造や機能にまで踏み込んだ研究はほとんどなされていなかったが、遺伝子レベルの研究からは、がん抑制に関係した遺伝子であることと、同じ遺伝子ファミリーに属する ZC3H12A に炎症反応を制御する機能があることから、がん転移においても何らかの役割を果たしていることが期待された。実際、ZC3H12D をノックアウトしたマウスを用いた実験では、当該 NK 様細胞の抗転移作用が消失していた。そこでさらに ZC3H12D の分子レベルでの詳細な解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、抗転移細胞において重要な役割を果たしていると想定される亜鉛フィンガータンパク質 ZC3H12D の構造と生理機能を明らかにすることを目的としている。精製タンパク質を用いた生化学・分光学的手法による解析のほかに、細胞レベルでの ZC3H12D の機能解析も実行する。細胞レベルでの実験においては、とくに炎症状態での反応に焦点を当てた実験を行うことで、抗転移細胞の基礎的知見を充実させることを目指す。近年、免疫細胞の持つ性質を利用してがん治療に結びつけるという新世代の免疫療法が脚光を浴びている。その流れで、自然免疫担当細胞である NK 細胞も注目されつつある。本研究で対象となっている抗転移細胞が NK 様細胞であることを考えると、抗転移細胞において重要な役割を果たしているタンパク質に関して分子レベルの基礎研究を進めておくことは、将来の臨床応用を考えるうえで非常に重要な意味を持つと考えられる。

3. 研究の方法

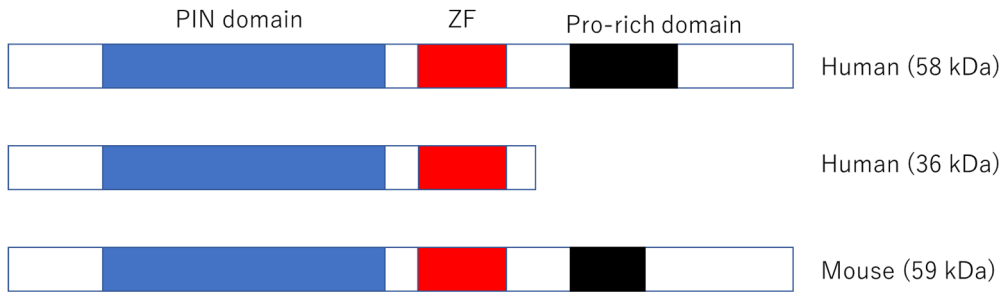


図 1. ヒトおよびマウス ZC3H12D のドメイン構造

ヒト ZC3H12D のトランスクリプトは図 1 に示すような 2 種類のもが知られている。図中上が 58kDa タンパク質をコードする標準的なアイソフォームで、下が 36kDa タンパク質をコードするマイナーなトランスクリプトを示している。両者には PIN ドメインと RNA 結合に關与する亜鉛フィンガー(ZF)が存在する。58kDa タンパク質の C 端側はプロリンを多く含む天然変性領域であると推定されており、この領域と相互作用する分子が数多く存在することが示唆されている。両者を発現ベクターにクローニングし、大腸菌での発現系から精製を試みたが、目的タンパク質を得ることができなかった。大腸菌の菌種・培養条件の最適化、または大腸菌封入体からの精製などの選択肢も十分に可能性があるものとして考えられたが、最終的にヒト培養細胞での発現系から精製タンパク質を得ることとした。ヒト培養細胞(293T)細胞の発現系からは ZC3H12D は可溶性画分に抽出することができた。精製に当たっては、C 末端に FLAG タグをつけた状態で発現させたタンパク質を FLAG 抗体カラムで精製し、さらにイオン交換・ゲルろ過カラムによって精製することとした。精製した ZC3H12D を用いて、タンパク質・核酸との結合を調べた。これに加えて、293T 細胞で一過性に ZC3H12D を発現させた系では、培養上清を FLAG 抗体ビーズと混合し、ビーズを洗浄後プルダウンアッセイに用いることとした。また、動物細胞用発現ベクターに ZC3H12D を組み込んだコンストラクトはヒト・マウス培養細胞株にトランスフェクトし、安定発現株を取得することを試みた。

4. 研究成果

図 1 に示した ZC3H12D のドメイン構造のうち、PIN ドメインと ZF は ZC3H12 ファミリーに共通の要素であり、よく研究されている ZC3H12A と配列類似性が高い。ZC3H12A の研究から PIN ドメインでヘアピン構造をもつ RNA と結合し、その RNA を配列特異的に分解する RNアーゼ活性を持つことが明らかにされている。また ZC3H12B および ZC3H12C の結晶構造解析もなされており、ZF に RNA が結合している立体構造が示されている。したがって、ZC3H12D も RNA を結合することが予想された。36kDa タンパク質と 58kDa の両者を精製したところ、36kDa タンパク質の方が 58kDa タンパク質よりも 10 倍収量が多

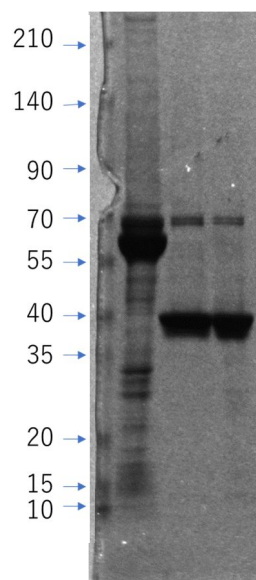


図 2. FLAG カラムで精製した ZC3H12D タンパク質。左端は 58kDa タンパク質を、右の 2 つは 36kDa タンパク質を示す。58kDa タンパク質と結合した状態で溶出されるタンパク質が多く存在する。

多いことが判明した。そのため精製タンパク質を用いる実験では、はじめは 36kDa タンパク質を用いて行い、のちに 58kDa タンパク質で同様の結果が得られるかどうかを確認する方針で行

うこととした。精製 36kDa タンパク質のアミノ基を蛍光標識したのちにイオン交換カラムで精製することにより蛍光標識 ZC3H12D を得た。この蛍光標識 ZC3H12D を用いて、蛍光相関分光法 (FCS・東北大学多元物質科学研究所・高橋研究室) による解析を行った。緩衝液中の ZC3H12D の流体力学的半径を評価したのちに、合成 RNA との結合による構造変化を調べた。合成 RNA としては、動物実験から IL1b-RNA が ZC3H12D 依存的に抗転移細胞を活性化することが示唆されていたので、全長 1500 塩基で構成される IL1b-RNA を用いることとし、コントロールとして Actb-RNA (1500 塩基) を用いることとした。実験結果より、ZC3H12D は IL1b-RNA (1500 塩基) と結合することにより流体力学的半径の増加が見られたが、この増加は Actb-RNA (1500 塩基) の添加によっても同様に観測された。これらのデータは発表論文にに記載されている (Tomita et al., Nat Commun, 2021)。マウス ZC3H12D には 58kDa タイプのトランスクリプトのみが知られており (図 1)、36kDa タイプのトランスクリプトは検出されていない。マウス ZC3H12D を過剰発現させた RAW264.7 細胞に RNA の取り込み実験を行ったところ、IL1b-RNA は取り込んだが、Actb-RNA は取り込まなかった。このことから、ZC3H12D の RNA 結合と細胞内への取り込みには一致しない部分があることが明らかとなった。一方、精製 36kDa-ZC3H12D タンパク質と合成 RNA との結合を電気泳動 (EMSA) で調べたところ、これらのタンパク質は AU リッチエレメントと呼ばれる配列を特異的に結合することが明らかとなった。EMSA で観測された、ZC3H12D-RNA 間の配列特異的結合は 58kDa タンパク質でも同様に観測された。これらの結果から ZC3H12D は RNA を特異的に結合する機能と非特異的に結合する機能を併せ持つことが想定された。このような現象は、p53 タンパク質などにも見られることでありそれほど驚くようなことではない。しかしながら、ZC3H12D の配列特異的 RNA 結合は ZF で行われていることが想定されるのに対し、非特異的結合がどの領域で行われているのかははっきりしない。現在、FCS のデータに配列特異的 RNA 結合がどのように反映されるかを調べるための詳細な解析を行っているところである。これに並行して、異なる手法で ZC3H12D-RNA 間の相互作用を調べる実験も現在進行中である。それらのデータに関する記述は、論文発表後に行う予定である。

次に ZC3H12D と IL6-RNA との結合が検討された。これは ZC3H12A が IL6-RNA の 3'UTR に存在するステムループ構造を特異的に認識することに基づいている。そこで、IL6-RNA のステムループ部位の配列を持つ合成 RNA と精製 ZC3H12D との結合を EMSA で評価した。しかしながら、ZC3H12D とステムループ部位との結合は観測されなかった。ZC3H12A と ZC3H12D の PIN ドメインの配列類似性を考えると、ZC3H12D がステムループ部位と結合することは十分に考えられること、他グループによる先行研究では ZC3H12D がステムループ部位と結合することを示唆するレポーターアッセイのデータなどが示されている。実験条件の違いによって最終結果に大きな違いがみられるようになった可能性もあるが、ZC3H12A と ZC3H12D の配列の違いが RNA 結合選択性に影響を与えている可能性も否定はできない。今後さらに実験を重ね異なる結果が得られた原因について調べていくつもりである。

上述の実験結果に示したように、ZC3H12D が AU リッチエレメントを認識することにより、特定の RNA 結合することができるのは確かなようである。そこで、精製した ZC3H12D を FLAG ビーズ上に結合させ、このビーズを用いてマウス血中からの IL1b-RNA 回収実験を行った。ZC3H12D を結合していない FLAG ビーズをコントロールとして行った実験では、Actb や GAPDH の mRNA はコントロールも ZC3H12D ビーズも同程度に回収されたのに対し、IL1b-

RNA は ZC3H12D で回収されたもののほうが多かった。この結果から、ZC3H12D が RNA を非特異的な結合と特異的な結合をすることを両立させていることを示していると考えている。この結果を踏まえて ZC3H12D が細胞内でどのような RNA と結合しているのかを知るために、ZC3H12D のプルダウン産物の解析を行った。ZC3H12D (36kDa) のコンストラクトをトランスフェクションした 293T 細胞に UV を照射し、タンパク質 RNA 間に共有結合を生じさせたのちに、ZC3H12D を FLAG 抗体ビーズで回収した。ビーズを洗浄後、ビーズ上に残っている RNA を抽出し、次世代シーケンシング (NGS) による解析を行った。FLAG ビーズで回収できた RNA は非常に少量ではあったが、NGS による解析を実行することができた。解析結果から結合 RNA のうち 97% 以上はリボソーム RNA またはリボソームを構成するタンパク質の RNA であり、これらは非特異的な結合によるものであると考えられたが、一部の RNA に関しては、明らかに ZC3H12D によりエンリッチされていると考えられた。これらの遺伝子に関しては同様の実験を繰り返し行い、RNA を調製し、定量 PCR を行うことによりその再現性を確認した。これらの遺伝子の具体的な遺伝子名は論文発表後に明らかにするつもりである。

ZC3H12D は膜結合部位を持たない可溶性タンパク質である。NK 様細胞のフローサイトメトリーによる解析から、通常 ZC3H12D は細胞質に存在しているが、がん細胞からの刺激を受けて細胞表面に移行することと、細胞表面で IL1b-RNA と結合すると細胞核へと移行することが明らかにされている。これらのことから、何らかのタンパク質が ZC3H12D と協同して機能していることが想定されている。そこで上述のプルダウン後にサンプルを SDS-PAGE で分析した。電気泳動後にゲルを CBB 染色したところ、ZC3H12D タンパク質由来ではないタンパク質によると思われるバンドが観測された。これらのバンドを切り抜き、トリプシンなどのプロテアーゼによるゲル内酵素消化を実行したのちに、ペプチド断片をゲルから抽出し、その抽出物を LC-MS/MS により解析した。ペプチド断片の LC-MS/MS のデータが既存のデータベースの値と一致するかどうかを調べ、一致したものが存在した場合にのみ、さらに研究を進めることとした。上記実験よりいくつかの結合タンパク質が同定されており、現在論文発表のための追加実験を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomita Takeshi, Kato Masayoshi, Mishima Taishi, Matsunaga Yuta, Sanjo Hideki, Ito Ken-ichi, Minagawa Kentaro, Matsui Toshimitsu, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Takao Toshifumi, Iwai Noriki, Mino Takashi, Takeuchi Osamu, Maru Yoshiro, Hiratsuka Sachie	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23969-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平塚佐千枝、富田 毅
2. 発表標題 転移前土壌の消失をめざして
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------