

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501264

研究課題名(和文) 腫瘍特異的なmiRNA成熟過程阻害を誘導するRNA結合タンパク質の探索

研究課題名(英文) Investigation of RNA binding proteins that specifically suppress a miRNA maturation in tumor cells.

研究代表者

安田 純 (Yasuda, Jun)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：00281684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：miRNA 前駆体結合タンパク質および標的miRNA の生理機能の解析として培養細胞株においてmiRNA 前駆体結合タンパク質の発現をsiRNA で抑制した結果、当該miRNA の発現が上昇し、結果としてさらに下流のmiRNA 標的の遺伝子発現が低下するか否かを解析した。さらにゲノム上に存在する同遺伝子のパラログについて対応するヒト腫瘍株などで遺伝子変異などゲノム異常があるか否かを分子遺伝学的に解析した。

研究成果の概要(英文)：I have identified a RNA binding protein which specifically binds to a miRNA precursor in medulloblastoma cells. Suppression of the protein by the use of siRNAs causes the increase of the mature miRNA whose precursor binds to the target protein. I also test if the downstream target genes of the increased miRNA are suppressed by the siRNA treatment for the RNA binding protein. Finally, I analyzed the genomic sequences of the RNA binding proteins in the human tumor cells to test the relationship between the RNA binding proteins and tumorigenesis in human tumor cell lines.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：マイクロRNA 発がん RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

miRNA は遺伝子発現の抑制因子であり、後生生物の細胞分化、組織構築の重要な調節因子であるが、発がん過程においても重要な機能をもつ。miRNA は転写後、核内でDrosha-DGCR8複合体によってヘアピン構造の前駆体として切り出され、さらに前駆体が核外に移行し、Dicer によって細胞質内で切断されるという成熟過程を経て活性化する。この成熟過程を司る遺伝子発現をマウス体内で抑制すると、細胞内の成熟miRNA が減少し、悪性腫瘍が発生する。実際、癌では多くのmiRNA 前駆体が核内に滞留しており、がん細胞では、miRNA の成熟過程が阻害されていることを示す。一方でがん細胞ではmiR-17-92 クラスタや miR-21 などいわゆるOncomir も存在し、マウスにおいてDicer を完全に抑制すると腫瘍発生が低下することから、miRNA のうち一部はがん細胞の悪性形質の維持に必須である。総合すれば、がん化においてがん抑制的miRNA が配列特異的な抑制を受けている可能性がある。近年、特定のmiRNA の成熟過程を調節する各種のタンパク質が単離されているが、miRNA前駆体に直接特異的に結合し、その成熟過程を制御するタンパク質は探索が開始されたばかりであり、今後さらなる研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍特異的に成熟過程が抑制されているmiRNA について、その配列特異的成熟過程抑制機構を担う候補分子としてこれらmiRNA 前駆体に直接結合するタンパク質を同定し、配列特異的なmiRNA 成熟抑制機能の有無を追究する。今回は、マウス髄芽腫発症モデルを材料にして解析する。ソニックヘッジホッグ信号伝達系の抑制因子である*Ptc1* の片側アレル欠損マウス(*Ptc1* ヘテロ接合体マウス)は生後数か月で高率に小脳に髄芽腫を発症する。正常個体では出生直後に小脳皮質の外顆粒層細胞は活発に増殖し、生後三週

間ほどで小脳皮質から消失する。しかし、*Ptc1* 遺伝子のヘテロ接合体マウスでは外顆粒層は残存し、Preneoplastic cell cluster (PNC) を形成する。つまり、髄芽腫は細胞の分化プログラムの異常によって発症する。PNC は *Ptc1* の残存野生型アレルを消失しているが、髄芽腫はこのPNC のうちごく一部から発症するため、その発症にはさらなる遺伝子変異が必要である。細胞分化プログラム調節を担うmiRNA の発現異常の解析のために、miRNA 前駆体に試験管内で結合するタンパク質を液体クロマトグラフィー・質量分析によって網羅的に同定する。これら同定された候補タンパク質が期待する機能(特定のmiRNA の成熟障害)を有することを候補遺伝子の発現ベクター導入によるmiRNA の発現変化、候補タンパク質のmiRNA 前駆体に対する細胞内結合能の配列特異性などの検討によって確認する。さらに成熟過程が阻害されているmiRNA そのもの、もしくはその成熟過程を阻害している候補分子がマウス髄芽腫発症に関連する分子であるか否かを検討する。成熟過程が阻害されているmiRNA について発現ベクターを作成し、マウス髄芽腫細胞株で強制発現し、細胞増殖、細胞遊走能、足場依存性増殖能、細胞分化の変化について観察する。また、成熟過程阻害の候補分子の組み換えタンパク質をマウス髄芽腫細胞に強制発現させ、同様の解析を進める。さらに、これら分子の生理的機能と当該miRNA の成熟阻害との関係を*Ptc1* ヘテロ接合体マウスの発生過程での候補分子の発現動態と成熟miRNA の発現量との相関も検討する。miRNA 前駆体との特異的結合とその機能的関連が確認されたタンパク質については変異を挿入したmiRNA 前駆体と組み換え候補タンパク質との結合能の解析を行い、認識配列を確認する。

最終的にこれらmiRNA 成熟抑制タンパク質が髄芽腫治療のための分子標的たりうるかについて髄芽腫細胞株における候補分子の発現阻

害などを通じて確認する。

3. 研究の方法

(1) miRNA 前駆体結合タンパク質の単離・同定: *Ptc1* ヘテロ接合体マウスで発生する髄芽腫で特異的に成熟が阻害されているmiRNA の前駆体を試験管内で合成し、アダプターDNA を介してアビジンビーズと結合させる(実験系1)。このRNA-DNA-ビーズ複合体をマウス髄芽腫培養細胞株抽出液と混合し、タンパク質複合体とRNA-DNA-ビーズ複合体とを結合させる。ビーズ結合タンパク質をSDS-PAGE で展開し、ゲル中に検出されたタンパク質を液体クロマトグラフィー・質量分析によって網羅的に同定する。系の配列特異性が十分高いことは異なるmiRNA 前駆体に結合するタンパク質のバンドパターンが異なることから明らかである。また、今回は成熟過程が阻害されているmiRNA を実験に用い、EDTA やRNase 阻害剤を反応液中に含有させており、複合体は安定に保持される。

(2) miRNA 前駆体結合タンパク質のmiRNA 成熟過程への影響の確認: 同定されたタンパク質の中から、各miRNA に対して特異的結合するタンパク質をコードするcDNA をクローニングする。これらcDNA と、標的miRNA 前駆体発現ベクターを同

時にマウス細胞(NIH3T3 細胞など)に導入し、共発現させ、細胞内のmiRNA の発現に変化があるか否かを測定する。さらに可能であればマウス髄芽腫由来細胞に安定的にmiRNA 前駆体結合タンパク質のcDNA を導入し、内在性標的miRNAのホストRNA、前駆体、成熟miRNA の3段階で定量し、成熟過程の異常の有無を確認する。

候補miRNA 前駆体結合タンパク質が標的miRNA の成熟過程に影響を及ぼしていないと考えられる場合、実験系1を利用して候補組み換えタンパク質が試験管内で結合しうるかについて検討する。もし単離したタンパク質のRNA に対する結合が既知のmiRNA前駆体結

合タンパク質(LIN28 とLet-7の場合)と比して著しく弱い場合、Co-factor が必要であると考えられるため、候補タンパク質と相互作用する他のタンパク質をマウス髄芽腫細胞抽出液から免疫沈降・質量分析法などによって探索し、同定する。さらに上記実験を新規co-factor を加えた条件で再度解析する。

(3) miRNA 前駆体結合タンパク質発現抑制のmiRNA 成熟過程への影響

同定されたタンパク質のマウス髄芽腫由来培養細胞での発現を、siRNA、shRNA を導入することによって抑制し、内在性の成熟miRNA の発現変化を確認する。前項同様、標的miRNA のホストRNA、前駆体、成熟miRNA の3段階で定量し、成熟過程の異常の有無を確認する。

(4) miRNA 前駆体結合タンパク質および標的miRNA の生理機能

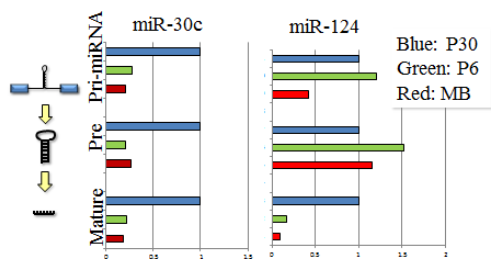
上記miRNA の髄芽腫細胞での生理機能の解析のため、人工的に合成したmiRNA 模倣体もしくは発現ベクターをマウス髄芽腫細胞に導入し、細胞増殖能、細胞運動能、アポトーシス感受性についていかなる影響を及ぼすのか細胞生物学的に解析する。これらのmiRNA 前駆体に結合する候補タンパク質についても同様の解析を行う。

更に、これら成熟阻害を受けている miRNA の候補標的mRNA を生物情報学的に推定し、モデルマウスにおける正常組織と腫瘍組織との発現差や、培養細胞株においてmiRNA 前駆体結合タンパク質の発現をsiRNA で抑制した結果、当該miRNA の発現が上昇し、結果としてさらに下流のmiRNA 標的の遺伝子発現が低下するか否かを解析する。これら正常組織で発現抑制を受けているmiRNA 標的mRNA が、腫瘍発症抑制に対して何らかの貢献している可能性について細胞増殖能やアポトーシス感受性の変化などの細胞生物学的解析を通じて解析する。また、これら同定された分子が協調的に髄芽腫発症過程に影響を及ぼしている場合、単一分子の遺伝子導入実験では生理活性が発

現しない可能性もあるため、必要に応じて複数の候補タンパク質、miRNA を同時に導入することも検討する。

4. 研究成果

マウス髄芽腫において成熟過程が特異的に阻害されている可能性のある miRNA を miRNA のマイクロアレイ解析とメッセンジャー - RNA の発現のマイクロアレイ解析との組み合わせから候補を選択し、30種類程度について前駆体の発現について qPCR を実施、図1のごとく、miR-124 が候補の一つとして選択された。



P30 expression is used as 1 in each class of RNA.
 図1マウス髄芽腫において、miR-124の成熟過程が特異的に阻害されている

さらに、この現象をノーザンブロット法を用いて確認した。この実験にはポリアクリルアミドゲル電気泳動による短鎖 RNA の分離と、それら RNA の電気的プロットングを必要とした。

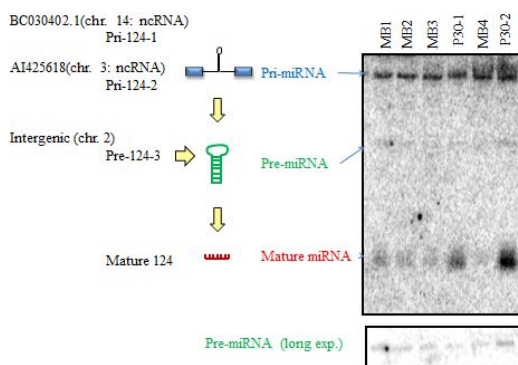


図2マウス髄芽腫でのmiR-124の成熟過程

図1, 2において、元となる mRNA の発現は正常脳組織と髄芽腫細胞においてはほとんど差が認められていないが、成熟 miRNA については正常脳組織において非常に強く発現す

る一方、髄芽腫組織ではその発現が強く抑制されていることが判明した。これらの解析から miR-124 は髄芽腫において特異的にその成熟過程が阻害されていることが示された。

この miR-124 は腫瘍抑制的に機能することや神経細胞の分化過程に重要な役割を果たしていることが先行研究において示唆されており、腫瘍によって特異的に成熟過程が抑制される miRNA として興味深い候補である。

そこで、過去の論文を参考に、この miR-124 の成熟過程を阻害しうる候補タンパク質の単離のために、miR-124 前駆体を試験管内で合成し、更に末端にビオチン化した DNA オリゴマーを会合させることで、ストレプトアビジンビーズによる固層化を実施し、これに髄芽腫組織からのタンパク質抽出液を混合して結合したタンパク質を抽出、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を実施した後に質量分析計による結合タンパク質の同定を実施した。

その結果、複数種類のタンパク質が得られたが、その中で過去の解析結果との重複のないものとして Ebp1 が認められた。この Ebp1 については図3に模式図を示す。

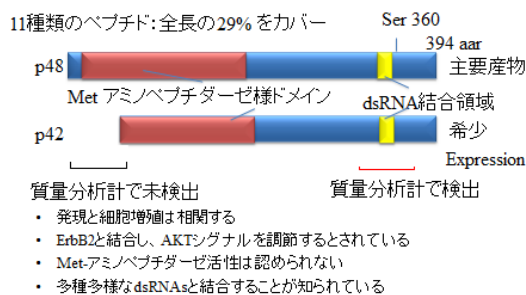


図3Ebp1の模式図と回収ペプチド

この Ebp1 は細胞増殖に伴って発現亢進を示すことが知られており、一方で RNA 結合タンパク質であることから重要な候補タンパク質と考えられた。

Ebp1 タンパク質に Flag タグを付けた組換えタンパク質を強発現し、その細胞抽出液と

miR-124 前駆体 (およびその変異配列) - ストレプトアビジンビーズへの親和性を検出することで検討した (図4)。

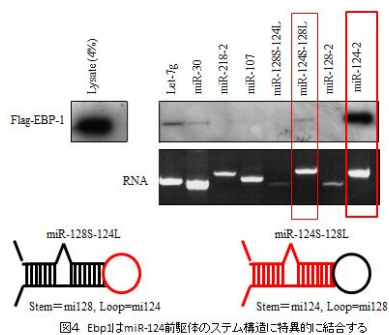


図4 Ebp1がmiR-124前駆体のステム構造に特異的に結合する

この検討から、Ebp1 タンパク質は miR-124 の前駆体に特異的に結合しうること、さらに結合については二本鎖 RNA をなすステム構造に対して特異的な結合を示すことが判明した。そこで次に、このタンパク質が実際に miR-124 の成熟過程を阻害しうるかについて、間接的ではあるが、Ebp1 の発現量を細胞内で調整することによって、内在性の成熟 miR-124 の発現量がどのように変化するかを検討した (図5)。

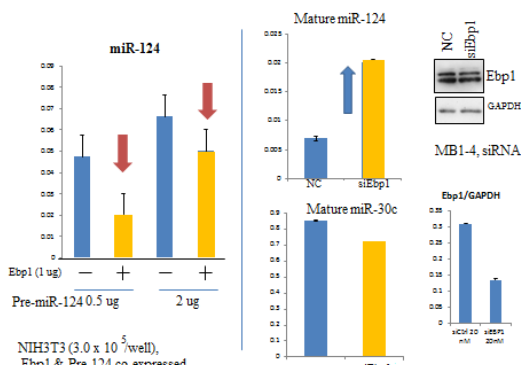


図5 Ebp1の発現の変化がmiR-124成熟型の発現量に与える影響

この結果、miR-124 の発現は Ebp1 の強制発現によって低下し、Ebp1 の siRNA による発現抑制によって増大することが判明した。

この Ebp1 の発現の変化に伴う miR-124 の発現変化がその機能に影響しうるかを、miR-124 の機能を測定しうるルシフェラーゼ

リポーター遺伝子の供与を受けて検討した (図6)。

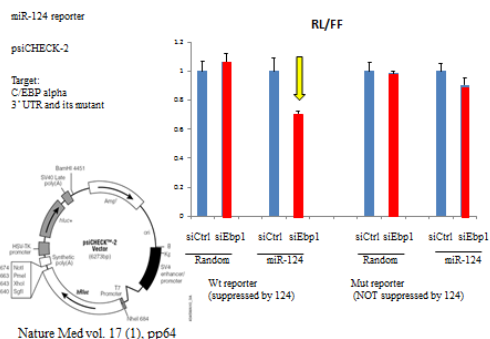


図6 Ebp1の発現の変化がmiR-124の遺伝子発現抑制機能に与える影響

この結果、miR-124 の機能は siEbp1 によって亢進することが示されたので、Ebp1 による miR-124 の成熟過程の調節は生理的意義があると考えられた。

最終的に髄芽腫における Ebp1 の発現の上昇の有無について、Ebp1 の特異的な市販抗体を用いて免疫組織化学的染色を実施し、合わせて、腫瘍組織での RNA 発現も検討した。その結果、確かに腫瘍組織において Ebp1 の発現亢進がタンパク質及び RNA のレベルについて確認された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) The cloning and characterization of specific modifiers of miRNA maturation in the medulloblastoma of the ptc1 heterozygous mice

J. Yasuda, K. Yaginuma, Y. Saiki, Y. Sugitani, C. Obuse, T. Noda

CELL Symposia for Regulatory RNAs 2011 (Chicago: 2011 年 10 月 11 日)

2) Erb3-binding protein 1 (Ebp1) may suppress miR-124 maturation in the Medulloblastoma of the Ptc1 Heterozygous Mice

J. Yasuda, K. Yaginuma, Y. Saiki, Y. Sugitani, C. Obuse, T. Noda

第71回日本癌学会学術総会(札幌 2012年9月21日)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 純 (YASUDA, Jun)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機

構・教授

研究者番号: 00281684

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: