

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651215

研究課題名(和文) 核酸修飾酵素を用いた新規原理によるRNA結合タンパク質ターゲットの網羅的同定

研究課題名(英文) Novel method to identify targets for RNA binding protein by using RNA modification enzyme.

研究代表者

熊谷 雄太郎 (Kumagai, Yutaro)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：00528408

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)：本研究においてはRNA内のシトシンを位置特異的に5-メチル化する酵素の酵素活性部位を任意のRNA結合タンパク質に結合することでRNA特異性を与え、bisulfite法により非メチル化シトシンと区別することにより、5-メチル化されたRNAの同定を通してRNA結合タンパク質のターゲットを同定することを目指した。反応条件、酵素発現系の至適化により、一部の培養細胞過剰発現系において本手法が実施可能であることが示唆された。初代培養細胞等においても適用できる修飾酵素の同定を引き続き実施するとともに、当初目標を修正し過剰発現系を用いて種々のRNA結合タンパク質のターゲットの同定を実施している。

研究成果の概要(英文)：In this project, enzymatic active region of an enzyme which position-specifically 5-methylates cytosine in RNA will be fused to RNA binding protein of interest to render the enzyme target specificity. The enzyme will specifically methylate target RNA, which can be distinguished by using bisulfite sequencing. This project aims at identifying targets of RNA binding protein of interest through identification of methylated RNAs by using the method above. By optimizing reaction and expression system of the fusion enzymes, we succeeded to apply the proposed method in certain cell lines when enzyme-fusion proteins are over-expressed. We further continue to search for enzymes which can be used in primary cells, and also plan to identify targets of RNA binding proteins in cell lines.

研究分野：免疫学

キーワード：RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は転写、翻訳のみならず、転写後制御も重要である。近年サイトカイン IL-6 の mRNA 安定性の制御を行う RNA 結合タンパク質 Regnase-1 (Zc3h12a)が同定された。Regnase-1 は IL-6, IL-12p40 といったサイトカインの mRNA 安定性を制御する。一方, Tnf などの mRNA は Zfp36 や HuR といった RNA 結合タンパク質が制御する。しかしながら、これらの RNA 結合タンパク質がどういった特異性をもって RNA に結合するか、またそれがどのように制御されているかは知られていない。

一方, RNA 結合タンパク質のターゲットの網羅的同定を行う方法論が提案されている。RIP-seq 法ではタンパク質に結合する RNA を UV でクロスリンクし、タンパク質-RNA 複合体を目的のタンパク質に特異的な抗体を用いて沈降させ、RNA の配列を次世代シーケンサーで同定する。PAR-CLIP 法は特殊な核酸アナログを導入することで UV クロスリンクを高効率化する。しかしながら、(1)免疫沈降に適した抗体を必要とするため、ノイズが多く、かつ汎用性が少ない、(2)クロスリンクが低効率、非特異的なために大量の細胞を必要とし、実質的に初代培養細胞には使用できない、という点がある。本研究ではこの問題を克服するべく新規原理に基づく RNA 結合タンパク質ターゲット同定法の開発を試みた。

2. 研究の目的

本研究において我々は大腸菌の 16S rRNA のシトシンを位置特異的に 5-メチル化する酵素 RsmB を用いる。この酵素の結晶構造から、RNA 配列結合部位と酵素活性部位とに分割可能なことがわかっており、RNA 結合部位を Zfp36, HuR, Regnase-1 といった RNA 結合タンパク質に交換することで任意の RNA 特異性を与えることができると考えられる。5-メチルシトシンは通常真核生物の mRNA にはほとんどみられず、bisulfite sequencing 法により非メチル化シトシンと区別することができることから、シーケンスの決定によって 5-メチル化された RNA を同定できる。これらを組み合わせることで、bisulfite sequencing を用いたメチル化修飾を受けた RNA の同定を通して、任意の RNA 結合タンパク質のターゲットを同定できると考えられる。この方法論の確立から、次世代シーケンサーを用いた網羅的ターゲット同定を行うことを研究期間内の目的とした。

3. 研究の方法

図 1A に示すように、大腸菌 16S rRNA のメチル化酵素 RsmB は配列特異性を決定する N 末端側 (図中青色で示された部位) とシト

シン 5-メチル化酵素活性を持つ C 末端側 (緑色の部分) にわかれている。

この配列特異性を決定する部位を任意の RNA 結合タンパク質に変え、目的の細胞へと遺伝子を導入する。すると、細胞内でターゲット RNA に結合することで特異的にシトシンを 5-メチル化すると期待される (図 1B)。このようにしてメチル化を受けたターゲット RNA と非ターゲット RNA をあわせて細胞から RNA 調製を行い、処理を加えないものと bisulfite 反応に供するものとに分ける。このとき、メチル化されていないシトシン(C)はウリジン(U)へと変化し、メチル化されているもの(5mC)は変化しない。bisulfite 反応後 cDNA 配列を決定すると、5mC は C として、U へと変化した C は T として記録される。これにより、ターゲット RNA は C->T 変換が起きないもの、非ターゲット RNA は C->T 変換が起こるものとして同定される (図 1C)

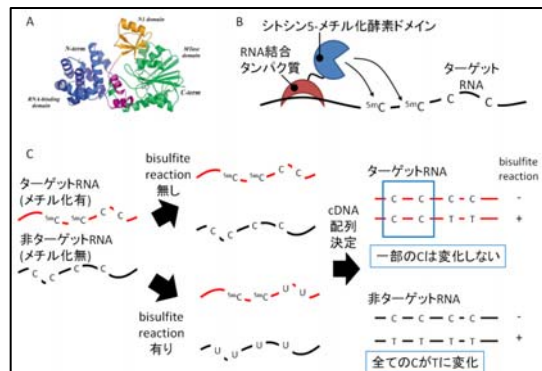


図 1

4. 研究成果

(1) RNA シトシン 5-メチル化酵素への配列特異性の付与とその確認

MS2 バクテリオファージ由来の MS2 カプシドタンパク質は特定の RNA ステムループ構造と結合することが知られている MS2 カプシドタンパク質と RNA シトシン 5-メチル化酵素との融合タンパク質発現系を構築した。また、luciferase 遺伝子の下流に MS2 ステムループを導入し、上記の融合タンパク質と同時に HEK293 細胞に導入、発現させた。36-48 時間後、RNA を細胞から抽出し、bisulfite 反応の後逆転写した。この cDNA を鋳型に MS2 ステムループを中心とした 200bp を PCR 増幅し、PCR 産物を抽出後 DNA シーケンシングに供した (図 2)。

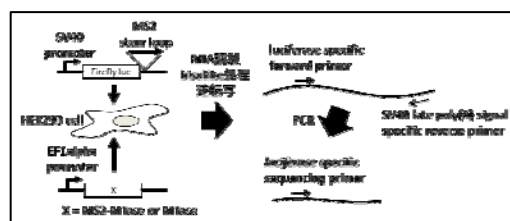


図 2

この際、5-メチル化修飾を受けることがわ

かっているヒト 28S rRNA の C4417 付近を同時にシーケンシングすることで、C->T 変換の割合を見積もり、メチル化修飾の効率を推定した。結果、28S rRNA C4417 の 5-メチル化を 100%とした場合に、大腸菌由来メチル化酵素である RsmB, RlmI がいずれも 20%程度と弱いながらも 5-メチル化を引き起こすことが確認された。

次に、これらの RNA 修飾酵素と Zfp36 融合タンパク質の発現系を構築し、それを HEK293 細胞に導入し、マウス *Tnf* 遺伝子由来 3' UTR を結合した luciferase 遺伝子の mRNA におけるシトシン 5-メチル化を bisulfite 法で確認した。MS2 融合 RNA 修飾酵素による MS2 ステムループを持つ mRNA に対する修飾効率に比べて大きく劣る (28S rRNA C4417 の約 5%) もの、修飾は見られなかった。

(2) マウス胚性繊維芽細胞(MEF)における RNA シトシン 5-メチル化酵素への配列特異性の付与とその確認

上記の Zfp36-メチル化酵素融合タンパク質をマウス胚性繊維芽細胞(MEF)に導入し、内在性 mRNA の修飾を確認することを試みた。bisulfite 法によりシトシンへの修飾を推定した。ヒト 28S rRNA C4417 に対応するマウス 28S rRNA C4099 をコントロールとして bisulfite 法を用いたシーケンシングを行った。すると、マウス 28S rRNA C4099 の 1%以下のメチル化しか見られず、修飾が見られないことが判明した。そこで、MS2 カプシドタンパク質とメチル化酵素の融合タンパク質とともに MS2 ステムループを持った luciferase 遺伝子を導入する上記のシステムを用いて MEF におけるこれらの酵素の活性を推定したところ、この場合においても修飾が見られなかった。抗 MS2 カプシドタンパク質抗体を用いた Western blotting によって融合タンパク質発現の確認を行ったところ、修飾酵素自体が発現していないことが判明した。luciferase タンパク質は Western blotting によりタンパク質の発現が見られたことから、RNA 修飾酵素の発現が MEF では起こらないことが示唆された。

(3)MEF における至適条件の探索、および他の生物種の RNA 修飾酵素の探索

上記の結果を受け、遺伝子導入方法の検討を試みた。MEF においてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、レトロウイルスを用いた導入を試み、Western blotting によりタンパク質の発現を確認したが、融合タンパク質の発現が見られなかった。そこで、大腸菌由来の RNA 修飾酵素に対してコドン最適化を行い、再び RNA 結合タンパク質として MS2 カプシドタンパク質を用いて酵素との融合タンパク質発現系を作製した。MS2 ステムループを持った luciferase 遺伝子とともに MEF に導入、RNA 修飾の有無を bisulfite 法に

よって確認した。しかしながら、いずれの酵素においても発現が見られない、または修飾が十分でなかった。

そこで修飾酵素の探索範囲を拡大し、HEK293 細胞でのコントロール実験系を用いて至適な酵素を行うこととした。現在、大腸菌以外の原核生物由来のメチル化酵素や真核生物由来の酵素を探索している。

また、当初計画を修正し、HEK293 細胞での過剰発現系において機能している系を用いて、HEK293 細胞においてヒト ZFP36 や HuR に結合するターゲットの同定を実施している。また、他の細胞株、HeLa 細胞や THP-1 細胞において提案手法の実施可能性を検討している。

## 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 4 件)

1. Liang, K.C., Y. Suzuki, Y. Kumagai, and K. Nakai, Analysis of changes in transcription start site distribution by a classification approach. *Gene*, 2014. 537(1): p. 29-40.
2. Elzawahry, A., A. Patil, Y. Kumagai, Y. Suzuki, and K. Nakai, Innate immunity interactome dynamics. *Gene Regul Syst Bio*, 2014. 8: p. 1-15.
3. Vandebon, A., Y. Kumagai, S. Teraguchi, K.M. Amada, S. Akira, and D.M. Standley, A Parzen window-based approach for the detection of locally enriched transcription factor binding sites. *BMC Bioinformatics*, 2013. 14: p. 26.
4. Patil, A., Y. Kumagai, K.C. Liang, Y. Suzuki, and K. Nakai, Linking transcriptional changes over time in stimulated dendritic cells to identify gene networks activated during the innate immune response. *PLoS Comput Biol*, 2013. 9(11): p. e1003323.

[学会発表] (計 2 件)

1. 熊谷雄太郎、自然免疫研究の最前線—システムとしての理解に向けての問題点、「GWAS、オミックス、経路網からの標的探索—期待と現実と対策」第 329 回 CBI 学会研究講演会、2012 年 8 月 3 日
2. 熊谷雄太郎、RNA 分解を通じた自然免疫応答の制御—定量化とモデル化、定量生物の会第 5 回年会、2012 年 11 月 25 日

[図書] (計 1 件)

1. Kumagai, Y. and S. Akira, Nucleic acid-sensing Toll-like receptors, in *Nucleic Acid Sensors and Antiviral Immunity*, S. Sambhara and T. Fujita (Eds), 2013: p. 40-57.

[その他]

ホームページ等

<http://qimm.ifrec.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 雄太郎 (Yutaro Kumagai)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：00528408