

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840043

研究課題名(和文)ポリADPリボシル化による癌抑制型マイクロRNAプロセシングの制御機構

研究課題名(英文)Regulation of Poly(U) Polymerase by Poly(ADP-ribose)

研究代表者

杉本 崇 (Sugimoto, Takashi)

東京大学・新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：80635285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：let-7は癌抑制に関わる機能性RNAである。癌細胞ではlet-7の前駆体RNA(pre-let-7)がポリウリジル化されlet-7の生成が抑制される。このことからpre-let-7のポリウリジル化は癌化の分子機構として注目されているが反応制御機構の詳細は不明である。本研究では、ポリウリジル化酵素TUT7がポリADPリボース(pADPr)によって翻訳後修飾を受けpre-let-7のポリウリジル化が抑制されることを示した。pADPrは細胞がストレスに晒されると蓄積するため、TUT7のpADPrによる制御はストレスに応じて遺伝子発現を調節し生体恒常性を維持するための機構の一つであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：let-7 miRNA functions as a tumor suppressor through oncogene repression. precursor let-7 (pre-let-7) is known to be polyuridylylated at its 3' terminus by poly(U) polymerase TUT4/TUT7 in cancer cell lines. Polyuridylylated pre-let-7 is a poor substrate for Dicer and rapidly degraded by exonuclease Dis3l2. Thus, polyuridylylation of pre-let-7 results in decreased expression of mature let-7 and contributes to tumorigenesis. In our current study, PARP13, one of human PARP homologues, was identified as a new interactor for TUT7. This suggests that TUT4/7 could be modified and regulated by PAR. In fact, we found that PAR was associated with TUT4/7 and diminished pre-let-7 polyuridylylation in vitro and in vivo. We also found oxidative stress leads to the increased amount of PAR associated with TUT4/7, while pre-let-7 polyuridylylation was severely inhibited. This is a new example of expanding roles of PAR in post-transcriptional gene regulation and provides insight into cellular stress response.

研究分野：分子生物学

キーワード：ガン マイクロRNA ウリジル化 酸化ストレス ポリADPリボース

1. 研究開始当初の背景

(1)マイクロ RNA (miRNA) は標的となるメッセンジャーRNA に結合してその翻訳反応を阻害し、標的メッセンジャーRNA の分解反応を誘導する機能性 RNA である。ヒトではこれまで 1000 種類以上の miRNA が同定されている。

(2)miRNA の中でも let-7 は様々な高次現象を制御することが知られており¹⁾、細胞の発生分化の制御や癌抑制に関わっている。最近の報告では、糖代謝に関与することも報告されている。したがって、let-7 が生体内でどのように合成され、代謝されるのか、その生合成の制御機構を明らかにすることはこれら多様な高次現象を理解する上で重要な課題である。

2. 研究の目的

(1)近年の研究から、let-7 の前駆体 RNA である pre-let-7 がポリウリジル化による修飾を受け、成熟型 let-7 の生成を抑制する現象が、ES 細胞や癌細胞で発見された。従って pre-let-7 のポリウリジル化反応は細胞の万能性維持や癌化を引き起こす新たな機構として注目されている²⁾。(図 1)

(2)また、ポリウリジル化は pre-let-7 だけでなく様々な RNA で観察され、其質となる RNA の安定性を制御することが報告されており、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかしながら、反応制御機構など未解明な点が多い。以上の背景を踏まえて、本研究課題では RNA のポリウリジル化反応を制御する新規因子を同定することを目的とした。

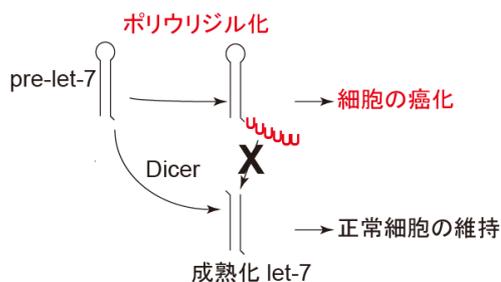


図 1. 癌細胞で観察される pre-let-7 のポリウリジル化反応

3. 研究の方法

(1)TUT7 安定発現細胞株樹立

TUT7 発現プラスミド (pcDNA5-SBP-TUT7) は TUT7 の N 末端に SBP タグを付加するように設計しており、Flp-In™ T-REx™-293 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Japan) を用いてトランスフェクションした。pcDNA5-SBP-TUT7 を保持した細胞はハイグロマイシン (100 µg/ml) により選別を行った。

(2)TUT7 のアフィニティー精製と TUT7 結合因子の LC/MS/MS による解析

SBP-TUT7 安定発現細胞株を 10 枚の 10 cm プレートで培養し、500 ng/ml のドキシサイクリンを含んだ培地で 48 時間培養して SBP-TUT7 発現を誘導した。その後、回収した細胞から抽出液を調製し、SBP-TUT7 をストレプトアビジンビーズ (GE Healthcare, Japan) により精製した (2 mM のビオチンで溶出)。その後、SBP-TUT7 溶出液を SDS-PAGE により分画し、CBB 染色を行った。染色された各タンパク質のバンドをゲルから切り出し、LC/MS/MS による解析 (BioGARAGE) を行った。

(3)Lin28A の HeLa 安定発現細胞株の樹立

Lin28A を安定的に発現する HeLa 細胞株 (HeLa-Lin28A) を樹立するために、Lin28A 発現プラスミド (pIRES-Flag-Lin28A) を Lipofectamine 2000 により HeLa 細胞にトランスフェクションした。0.5 µg/ml のピューロマイシンにより選別 (2 週間) 後、Lin28A の発現を anti-Flag 抗体によるウェスタンブロットティングで確認した。

(4)定量 RT-PCR

RNA の定量のために定量 RT-PCR を実施した。ポリウリジル化された RNA の解析には、100 ng の全 RNA から adaptor-oligo (dA)₁₄ プライマーによる逆転写を行った (PrimeScript RT reagent kit (TAKARA, Japan) を使用)。続く定量 PCR は、adapter プライマーと遺伝子特異的プライマーを用いて行った (SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA, Japan) を使用)。成熟型 let-7 の定量には 10 ng の全 RNA を用い TaqMan miRNA assay (Life Technologies, Japan) を行った。これらのデータは RNU48 で補正した。一方、pre-let-7 RNA と GAPDH mRNA の定量には 10 ng の total RNA を用いて定量 RT-PCR を行い、GAPDH で補正した。

(5)siRNA トランスフェクション

PARG 遺伝子に対する siRNA あるいは PARP13 遺伝子に対する siRNA を RNAiMAX (Invitrogen, Japan) を用いて HeLa-Lin28A cells に導入した。トランスフェクションを 2 回実施した後、細胞から全 RNA 回収を行った。

(6)リコンビナントタンパク質の調製

His タグを付加した Lin28A を調製するために、発現プラスミド pET-Lin28A を大腸菌 *E. coli* BL21(DE3) Rosetta codon-plus strain (Novagen, Japan) に導入し、0.1 mM IPTG による発現誘導を 37 °C で 2 時間行った。大量発現した Lin28A は Ni-NTA カラム (QIAGEN, Japan)、HiTrap-Q、HiTrap-heparin、Superdex 75 (GE Healthcare, Japan) の各カラムにより高度に精製した。

(7) *in vitro* 転写による pre-let-7a-1 の合成
GGG 配列を 5' 末端に付加した pre-let-7a-1

の配列を pUC18 ベクターの T7 プロモーターの下流に挿入した (pUC18-plet7a)。pUC18-plet7a を *FokI* で切断したものを鋳型に、T7RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応を行った。合成された pre-let-7 はエタノール沈殿及びゲル電気泳動により精製した。

(8) *In vitro* pre-let-7 ポリウリジル化アッセイ

In vitro pre-let-7 ポリウリジル化反応は 37 °C で 20 分を行った。反応には UTP、pre-let-7 ([γ-³²P] ATP で 5' 末端をラベル化)、リコンビナント Lin28A 及び SBP-TUT7 溶出液を用いた。反応後、RNA を回収して尿素入りのポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。ポリウリジル化された pre-let-7 は、BAS-5000 イメージング装置 (Fuji Film, Japan) により検出を行った。

(9) 免疫染色法

細胞が付着したカバースリップを 4% (v/v) paraformaldehyde を含んだ PBS で 20 分間固定化し、0.25% (v/v) Triton X-100 を含んだ PBS による透過処理と 5% (v/v) FBS を含む PBS によるブロッキングを行った。一次抗体及び二次抗体による抗体反応 (それぞれ 1 時間) の後に蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Microscopy) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) TUT7 結合因子の同定

RNA ポリウリジル化酵素であるポリ U 付加酵素 TUT7 が生体内で形成する複合体に着目して、ヒト培養細胞からのアフィニティー精製を実施し、構成因子を LC/MS/MS により同定した。その結果、PARP13 を新規結合因子として同定した。PARP13 は翻訳後修飾であるポリ ADP リボシル化因子 PARP ホモログの一つであり、TUT7 と同様に細胞質に局在することが知られている。このことから、TUT7 が PARP13 の結合を介してポリ ADP リボシル化による制御を受けているのではないかと推測した。

(2) TUT7 へのポリ ADP リボースの結合と TUT7 活性への影響

そこで、TUT7 にポリ ADP リボースが結合するか否かを解析するために、*in vitro* ポリ ADP リボシル化反応を実施した。本アッセイでは、TUT7 を大量発現している細胞由来の抽出液を調製し、ポリ ADP リボースの基質となる NAD⁺ を添加して反応を実施した。その後、TUT7 のプルダウンを行い、ポリ ADP リボースの結合の有無をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、ポリ ADP リボースは TUT7 に特異的に結合することが分かった。また、ポリ ADP リボースが結合した TUT7 の活性を *In vitro* pre-let-7 ポリウリジル化反応により解析した。その結果、ポリ ADP

リボースの結合により、TUT7 の酵素活性が低下することも見出した。

(3) 細胞内でのポリ ADP リボースが pre-let-7 ポリウリジル化に及ぼす影響

続いて、ポリ ADP リボースの pre-let-7 ポリウリジル化反応への影響を更に調べるために、ポリ ADP リボースの分解酵素である PARG 遺伝子を siRNA によりノックダウンした。その後、細胞から全 RNA を回収し、定量 RT-PCR によりポリウリジル化された pre-let-7 の量を解析したところ、PARG 遺伝子をノックダウンすることにより pre-let-7 のポリウリジル化が阻害されることが分かった。一方、成熟型 let-7 の量は増大した。更に、PARG をノックダウンした細胞から抽出液を調製して *In vitro* pre-let-7 ポリウリジル化反応を実施した結果、活性の顕著な低下が見られた。

(4) TUT7 のポリ ADP リボシル化を誘導する生理的条件と意義

続いて、ポリ ADP リボースによる TUT7 の活性制御が起きる生理的条件を解析した。多くの場合、ポリ ADP リボシル化は酸化的ストレスなどの外的刺激により誘導されることが知られている。そこで、亜ヒ酸による酸化的ストレスで培養細胞を処理し、解析した結果、TUT7 に結合するポリ ADP リボースの量が増大することが分かった。また、定量 RT-PCR を用いて、この条件下では pre-let-7 のポリウリジル化が著しく阻害されることや成熟 let-7 の生成量が増加することも明らかにした。また、pre-let-7 の量は変わらないことから転写段階ではなく、ポリウリジル化の阻害が成熟型 let-7 の増加につながっていることが示唆される。さらに、TUT7 がストレス顆粒と呼ばれる構造体に局在することも見出した。pre-let-7 のポリウリジル化の抑制は過酸化水素による酸化ストレスでも観察された。この抑制は細胞を予め PARP 阻害剤である 3-ABA で処理することにより防ぐことが出来ることから、酸化ストレスによる pre-let-7 のポリウリジル化の抑制に PARP が関与していることが強く示唆された。

(5) 活性型 PARP ホモログの探索

LC/MS/MS による解析では、PARP13 以外に TUT7 に結合する因子は同定出来なかった。PARP13 は単独ではポリ ADP リボシル化の活性を持たない因子であるため、活性型 PARP を同定することが、TUT7 のポリ ADP リボシル化の機構を詳細に解析するために必要である。これまで PARP13 と相互作用する活性型 PARP を解析したところ、PARP1 が TUT7 に結合することが分かった。PARP1 は主に核に局在するタイプの PARP ホモログであるが、細胞質に存在することを示す報告もあるため、PARP1 が少なくとも TUT7 のポリ ADP リボシル化に関与していると予想される。

(6)考察

今回の研究では、TUT7 に結合する新規因子として PARP13 を同定した。PARP13 は翻訳後修飾であるポリ ADP リボシル化因子の一つであり、実際に TUT7 にポリ ADP リボースが結合することを見出した。この結合は細胞が酸化ストレスに晒された際に増大し、pre-let-7 のポリウリジル化が抑制されること、またそれに伴い成熟 let-7 の量が増大することが分かった。また、TUT7 に結合する活性化型 PARP として PARP1 を同定した。全ての PARP ホモログを解析したわけではないため、他の PARP ホモログの関与を否定することは出来ないが、PARP1 が PARP13 に結合することはすでに報告されており、少なくとも PARP1 が関わっていると考えている。

let-7 は caspase-3 の発現抑制を介してアポトーシスを防ぐ効果を有することが知られている³⁾。このことから、TUT7 のポリ ADP リボースによる制御は酸化ストレスに応じた遺伝子発現調節の新たな機構であり、アポトーシスを防ぎ生体の恒常性を保つための機構の一つなのではないかと考えている (図 2、本研究成果は現在論文投稿中である)。

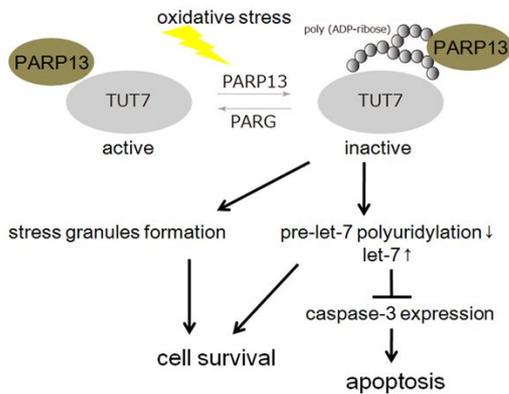


図2. TUT7のポリADPリボシル化と生理的意義のモデル

< 引用文献 >

Bussing, I., Slack, F.J., Grosshans, H.: *Trends in molecular medicine*, **14**: 400-409 (2008)

Thornton, J.E., Gregory, R.I.: *Trends in cell biology*, **22**: 474-482 (2012)

Tsang, W.P., Kwok, T.T.: *Apoptosis*, **13**: 1215-1222 (2008).

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 件)

〔学会発表〕(計 2件)

杉本崇、富田耕造「Regulation of poly(U) polymerase by ADP ribosylation」日本 RNA 学会年会、2014年7月23日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

Takashi Sugimoto, Kozo Tomita
“Regulation of poly(U) polymerase by ADP ribosylation” Joint Australia and Japan RNA meeting、2014年11月5日、Sydney (Australia)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

杉本 崇 (SUGIMOTO, Takashi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教
研究者番号：80635285

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

富田 耕造 (TOMITA, Kozo)