

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06065

研究課題名(和文) 分化転換におけるRNA代謝解析

研究課題名(英文) RNA metabolism during cellular transition

研究代表者

上 大介 (Kami, Daisuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80415588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は分化転換におけるRNA代謝、特にRNA Decayの中心的役割を果たすP-bodyで古い形質のRNAの消失が分化過程において必須であることを証明した。ヒト癌細胞A549を用いて、上皮間葉転換(EMT)時におけるP-bodyのRNAの変化を解析したところ、P-bodyのRNAは分化転換に伴い一変していた。また3T3-L1脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化モデルにおいて、Ddx6(P-body構成タンパク質)はKOすることで脂肪分化誘導は抑制されていた。このKO細胞の遺伝子発現を解析したところ、抑制因子の除去ではなく、前駆細胞の形質を維持する複数のRNAの分解が重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は転写されたRNAが細胞内でどのように代謝されているかに着目している。今回、我々はRNA代謝の中心となるP-body内のRNAに着目し、EGFP-DDX6を融合し、P-body内のRNAの変化を解析した。また脂肪分化誘導時におけるP-body形成とDDX6の重要性についても証明しており、細胞内のRNA代謝が重要であることも証明した。以上の結果は、分化制御機構にRNA代謝が能動的に関与する重要な知見であり、発生過程におけるダイナミックな分化制御へのより深い理解に寄与すると共に、癌化の新たな創薬ターゲットとなり得ることを示唆しており、社会的意義は極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：This study clarified the role of RNA metabolism in differentiation and transformation, and demonstrated that the loss of old trait RNA in the P-body, which plays a central role in RNA metabolism, especially in RNA decay, is essential for the differentiation process. Using A549, we analyzed RNA in the P-body during EMT by RNA-seq and analyzed the changes in RNA present. The RNA in the P-body changed drastically during the differentiation process. In a model of adipogenic differentiation from 3T3-L1 to adipocytes, Ddx6, one of the P-body component proteins, plays an important role in adipogenic differentiation, and its KO suppressed the induction of adipogenic differentiation. In addition, comprehensive gene expression analysis by RNA-seq showed that Ddx6-KO maintained the expression of RNA encoding old traits and Dlk1, a suppressor of adipogenic differentiation. We found that degradation of multiple RNAs that maintain progenitor cell traits, but not removal of suppressors, is important.

研究分野：分子生物学

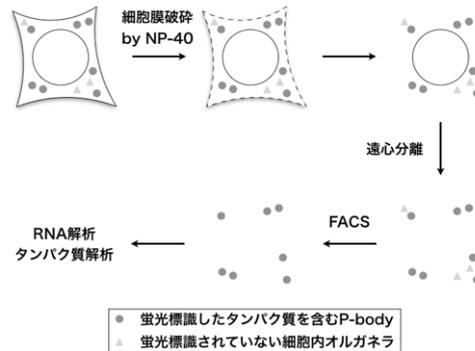
キーワード：RNA metabolism Cellular transition FAPS RNA-seq LC-MS/MS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞の発見 (Takahashi K. Cell 2006) から 11 年が経過し、iPS リプログラム初期に MET が起きていることが報告された (Li R. et al., and, Samavarchi-Tehrani P. et al., Cell Stem Cell. 2010)。この iPS リプログラム細胞は上皮様細胞の RNA の発現量が上昇し、これらのタンパク質が合成される。一方で元細胞由来の RNA 代謝は不明な点が多い。これは EMT でも同様で (Mishra VK et al., Cancer Res. 2017)、RNA の動的な変化は不明なままである。

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は「分化転換における細胞内 mRNA はどのような代謝を経て分化転換後の状態に移行するのか?」である。分化転換は前述の MET や EMT といった細胞 A から B へ、または B から A へ可逆的に移行でき、細胞内の RNA 環境は A と B では異なる。我々は 2016 年 4 月から 2018 年 3 月までの挑戦的萌芽研究 (16K15260) にて iPS リプログラムに関わる ncRNA を探索し、ncRNA の RNY1 が iPS リプログラム初期に RNA の安定性に関与することを報告している。RNY1 は iPS リプログラムにてその発現を細胞質にて大きく上昇させる。さらに siRNY1



にて処理した場合、iPS リプログラム効率は減少し、細胞形態は変化せず、RNA が安定化していた。この RNY1 に結合する RO60 の抗体にて免疫沈降し MS 解析したところ、DDX6 が検出された。DDX6 は RNA helicase で RNA 代謝を行う P-body の構成体の一つである (Jankowsky E. et al., Trends Biochem Sci. 2011)。線維芽細胞 TIG-1 は A549 細胞とは異なり、P-body を細胞質に常時形成しておらず、DDX6 抗体にて免疫蛍光染色をしても殆どの細胞は P-body が観察されない。しかしながら、iPS リプログラムの 3 日目、OCT4 陽性細胞の 86% は DDX6 と共陽性であった。また DDX6 を Cas9 処理した線維芽細胞細胞は iPS リプログラム効率が激減した。さらに免疫沈降法にて siRNY1 処理することで RO60 と DDX6 の結合割合に変化が生じたことを示唆できた。しかし、細胞内の P-body 内での RNA 代謝を評価する場合、免疫沈降法では P-body 外の DDX6 や OCT4 陰性細胞の DDX6 も混在しているため偽陽性も観察している。そこで DDX6 に GFP を融合させた GFP-DDX6 を細胞内で発現させ、P-body 特異的な蛍光状態を誘導し、FACS にて分取する FACS (Fluorescence Activated Particulate Sorting) 法を利用し、P-body のみを分取・解析する。これにより本研究の目的である「分化転換における P-body での RNA 代謝の解析」を試みるのが可能となる。さらに我々は癌転移の in vitro モデルである A549 細胞の TGF β 刺激による EMT 系も完成させており、遺伝子発現や免疫染色にて評価ができる。また A549 細胞は常時、P-body 形成する細胞のため、誘導前後の P-body を FACS 法にて回収、評価することで P-body における RNA 代謝の変化を観察できると考えている。これらの MET と EMT、両者の系を解析することで分化転換における P-body 中の RNA 代謝を詳細に評価することにより、分化転換の新たなメカニズムを得られる。

2. 研究の目的

本研究の目的は分化転換における P-body での RNA 代謝の解析である。iPS リプログラムにおける MET、並びに TGF β 刺激による上皮細胞の EMT は数多く報告 (Tang F. et al., Drug Des Devel Ther. 2017, Tian M., J Cancer Metastasis Treat. 2017) があるものの、これらの解析は誘導中の RNA 発現量の増加とそのエピジェネティクス変化の解析が中心であり、減少する RNA がどのように代謝されているのかについてはあまり知られていない。我々はこの減少する RNA に着目しており、これらの RNA を積極的に代謝するシステムが分化転換に存在すると仮定している。何故ならば誘導前の RNA の残存は誘導後の細胞にとっては細胞状態を不安定化させる因子であり、積極的な除去システムは分化転換後の細胞安定性に重要であると我々は考えている。また近年、初期発生胚にて母性-胚性転移と呼ばれる母親由来 mRNA やタンパク質の積極的な分解がトリガーとなることで、接合子由来の mRNA やタンパク質の合成が活性化すると報告されている (Tadros W. et al., Development. 2009, Giraldez AJ. et al., Curr Opin Genet Dev. 2010, Lee MT et al., Annu Rev Cell Dev Biol. 2014)。我々の仮説は胚発生においてもおきており、分化転換でも同様の現象が起きている可能性は非常に高い。このように本研究は学術的独自性と創造性の高いアイデアであり、この仮説を裏付けるデータも RNY1 の結果から解析された。我々はこの仮説を証明するために、分化転換における P-body 中の RNA 代謝を解析する。

3. 研究の方法

細胞内の P-Body 内に含まれる RNA を取得する FACS にて分取する FACS 法を確立した。まず、EGFP と DDX6 を融合した EGFP-DDX6 をレトロウイルスにて恒常的に発現させる系を設

計した。このウイルスを用いて A549 細胞に遺伝子導入し、GFP の蛍光量の高い細胞を FACS にてソーティングした。ソーティングした細胞は細胞内で GFP 陽性の Foci があることを確認し、TGFB2 による EMT 誘導を試みた。EMT 誘導は遺伝子発現変化を定量的 PCR (qPCR) 法にて解析した。次に誘導前と誘導後のそれぞれの細胞を回収し、FASP 法を用いて P-body をソーティングした (図 1)。ソーティングした P-body は RNA 抽出し、Bioanalyzer (アジレント社)を用いて抽出した RNA の品質を確認した。これらの RNA は微量 RNA-seq 法にて評価し、P-body と細胞質 (P-body ソート前)に含まれる RNA を解析した。以上の結果をまとめ、細胞内 RNA と P-body に含まれる RNA、さらには分化転換前と分化転換後に分けて比較評価した。

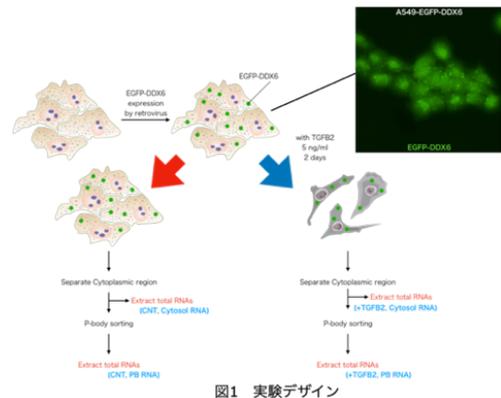


図1 実験デザイン

3T3-L1 はマウス脂肪前駆細胞で、インスリン、IBMX (Isobutylmethylxanthine)、デキサメタゾン (以下、アディポカクテルとする) を添加することで脂肪分化する細胞である。脂肪分化も分化転換による細胞内の変化が重要であることが知られているため、我々は 3T3-L1 の脂肪分化における DDX6 の役割について経時的に評価した。評価方法は qPCR 法と Western blotting 法、蛍光免疫染色法と RNA-seq 法を用いた。また CRISPR 法と siRNA を用いて、遺伝子発現を抑制した系でも解析した。

4. 研究成果

A549 細胞は TGFB2 (5 ng/ml) による刺激で EMT が起こり、2 日ほどで細胞形態が上皮様細胞から間葉系細胞様に変化することが知られている。遺伝子発現も 2 日で大きく変化し、CDH1 は発現量が 1/10 程度に減少し、EMT マーカーとして知られている ZEB1, SNAI1, CDH2 の遺伝子発現量は 2 倍以上に増加した (図 2)。

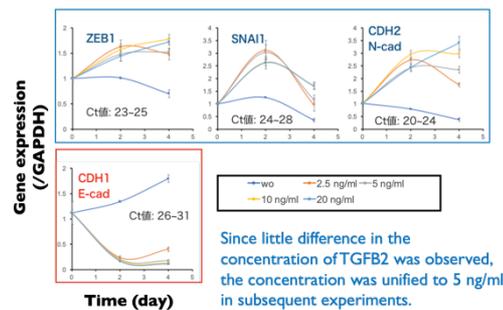


図2 qPCRによるEMT解析

レトロウイルスベクター pMXs-puro (Cell Biolabs, Inc.) に EGFP と DDX6 を融合した遺伝子を実験し、挿入した。このベクターを用いて作製したレトロウイルスを A549 に感染させたところ、細胞内で GFP の Foci を 1 細胞あたり 7.2 ± 1.3 個存在していた。この細胞を A549 EGFP-DDX6 とする。A549 EGFP-DDX6 を 150 mm dish にサブコンフルエントになるまで培養し、Hubstenberger A. (Mol Cell. 2017)らの手法を参考に GFP を含む P-body を回収した。回収した溶液は FACS 装置 (SH800, SONY) にて解析し、GFP 陽性分画をソーティングし (図 3)、TRIZOL にて RNA 抽出した。抽出した RNA は高い RIN 値を示す良好なサンプルだった (図 3)。この RNA は SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2- Pico Input Mammalian にて処理し、RNA-seq (single-end 75 bp, 60 M reads/sample) にて解析した (表)。解析した結果は、各サンプルのそれぞれの RNA 量の平均値よりも多い RNA を選択し、EMT 前の細胞の P-body 特異的な遺伝子、EMT 後の細胞の P-body 特異的な遺伝子、EMT 後の P-body に特異的な遺伝子をベン図を用いて選択した (図 4)。これらの遺伝子の DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いた KEGG pathway 解析を行い、特異的な遺伝子発現について評価した (図 4)。この結果、EMT 前後における P-body 特異的な遺伝子を選択することができた。これらの結果は分化転換における P-body には何らかの役割があると考えられる。また素早い形態変化が伴う分化誘導 (iPS 細胞化や脂肪分化誘導など) の際にも P-body 形成が重要な役割を果たしている可能性を示している。そこで、次に我々は 3T3-L1 脂肪前駆細胞を用いた P-body の重要性について検討した。

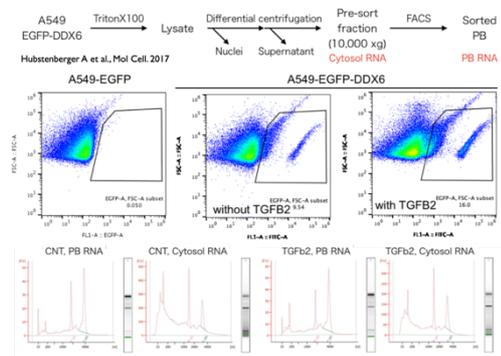


図3 FASP法によるP-Bodyの回収

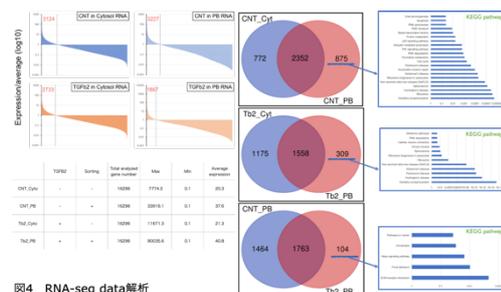


図4 RNA-seq data解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

3T3-L1 は Ddx6 遺伝子とタンパク質が恒常的に発現しているが、細胞内に Foci は形成しない (図 5)。この細胞にアディポカクテルを暴露すると 4 日後から Ddx6 の Foci を形成し、その細胞は脂肪細胞に分化した。次に Ddx6 遺伝子を CRISPR 法にてノックアウトした 3T3-L1 細胞 (L1 CR-Ddx6) を作製し、アディポカクテルに暴露したところ、脂肪分化誘導は起きず、4E-T 抗体を用いて蛍光免疫染色法にて細胞内 P-body 形成を観察したところ、Foci 形成はされなかった (図 6)。一方でレトロウイルスを用いて Ddx6 遺伝子を過剰発現させた 3T3-L1 細胞 (L1 OE-Ddx6) は脂肪分化していた。これらの結果は脂肪分化誘導には Ddx6 遺伝子の発現と P-body 形成が重要である可能性を示唆している。次に脂肪分化誘導 2 日間後における L1 CR-Ddx6 の遺伝子発現の変化を RNA-seq にて網羅的解析をしたところ、Control では減少する 19 遺伝子のうち、12 遺伝子が CR-Ddx6 において減少しなかった (図 7)。これらの 12 遺伝子のうち、脂肪分化抑制因子 Dlk1 遺伝子に着目し、さらなる解析を試みた。L1 CR-Ddx6 の Dlk1 遺伝子を CRISPR 法でノックアウトし、ダブルノックアウト (L1 CR-Ddx6 CR-Dlk1) 細胞を樹立し、脂肪分化誘導を試みた。Dlk1 は脂肪分化抑制因子のため、この結果、脂肪分化が促進すると仮定して誘導したが、L1 CR-Ddx6 CR-Dlk1 細胞は脂肪分化誘導されなかった (図 8)。これらの結果から、抑制因子の除去ではなく、前駆細胞の複数の RNA を分解することが重要であると考えられる。

以上の結果より、分化転換における RNA 分解は細胞の表現型変化に非常に重要な役割を果たしており、P-body はその中心的な役割を果たしている。また T 細胞における RNA 分解と細胞の分化制御の重要性は他の研究者らも同様の報告をしている (Akiyama T. Trends Immunol. 2021) ことから、今後の RNA 分解の細胞制御における重要性は増加していくと予想され、魅力的な研究分野として今後も発展すると予想される。

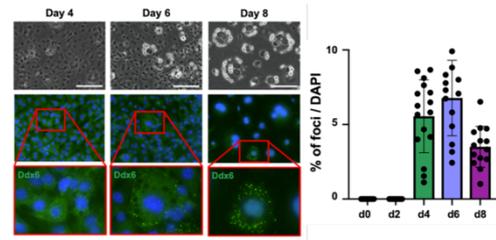


図5 脂肪分化誘導における3T3-L1のP-body形成

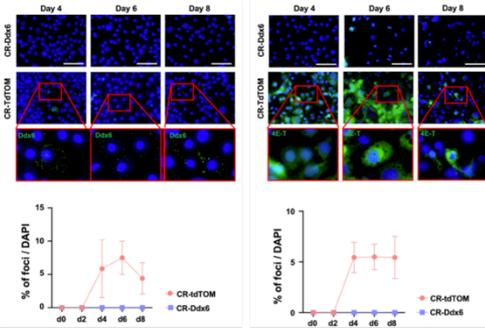


図6 脂肪分化誘導における3T3-L1 KO-Ddx6のP-body形成

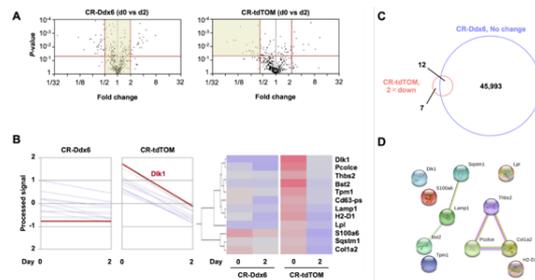


図7 RNA-seq解析

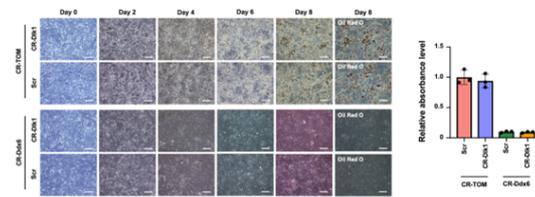


図8 3T3-L1 KO-Ddx6 and -Dlk1の脂肪分化誘導

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 Maeda R, Kami D, Shikuma A, Suzuki Y, Taya T, Matoba S, Gojo S.	4. 巻 12
2. 論文標題 RNA decay in processing bodies is indispensable for adipogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-021-03537-7.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Kami, Satoshi Gojo
2. 発表標題 Analysis of RNAs in processing body during epithelial mesenchymal transition
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田遼太郎、志熊明、鈴木陽介、田谷俊彦、上大介、的場聖明、五條理志
2. 発表標題 RNA Decay in Processing Bodies is Indispensable for Adipogenesis
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	秋光 信佳 (Akimitsu Nobuyoshi) (40294962)	東京大学・アイソトープ総合センター・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分担者	五條 理志 (Gojo Satoshi) (90316745)	京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (24303)	

	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
研究 協力者	亀谷 富由樹 (Kamitani Fuyuki) (70186013)		

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