

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293073

研究課題名(和文)メチル化シグナルによる長鎖非コードRNA機能の発現機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of function of long noncoding RNAs through methylation signal

研究代表者

黒川 理樹 (KUROKAWA, RIKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70170107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はcyclin D1遺伝子プロモーターから転写される非コードRNA(プロモーター由来ncRNA-D)が、RNA結合タンパク質TLSとの結合を介してその遺伝子発現を抑制することを示した(Nature 454:126-30,2008)。TLSはpncRNA-Dの5'末端側32-62を標的としていた。この領域は3'末端側でステム-ループ構造をとるが、TLSは5'末端32-44の直鎖状部分に強く結合していた。さらに、HeLa細胞の高浸透圧処理により、pncRNA-Dのアデノシン特異的メチル化が低下すると、逆にTLS結合が上昇した。現在、TLSのメチル化とRNA結合についても鋭意解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that the promoter-associated noncoding RNA-D (pncRNA-D) transcribed from a promoter region of the cyclin D1 gene represses its expression through binding of pncRNA-D to RNA-binding protein TLS (Nature 454: 126-130, 2008). TLS is found to target the 5' end (32-62) of pncRNA-D. At the 3' end (44-62) of pncRNA-D forms a stem-loop structure, while TLS firmly binds to the straight chain of the 5' end (32-44) of pncRNA. Moreover, high-osmotic treatment of HeLa cells reduced methylation of the N6-adenosine (m6A) at pncRNA-D, but induced its binding to TLS. Recently, we have been analyzing effect of methylation of TLS on its binding to pncRNA-D. Methylation of long ncRNAs (lncRNAs) might regulate their physiological function presenting another exciting issue of the lncRNA biology.

研究分野：基礎医学・医科学一般

キーワード：酵素 遺伝子 核酸 生体分子 発現制御 メチル化 長鎖非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの大部分は転写され、その主要な転写産物である長鎖非コード RNA (lncRNA) が注目を集めている。とりわけ、多様な lncRNA の生理機能が関心的である。我々は、転写制御因子としての TLS を見出して研究する過程で、その機能には特異的 RNA 配列の結合が必須であることを示し、pncRNA-D を同定した。また、TLS 複合体解析から、アルギニン特異的メチル化酵素 PRMT1 が TLS をメチル化し、その機能を制御する結果も得た (BBRC, 2011)。そして、TLS のメチル化が RNA 結合を制御する予備的結果を得て、本研究を企画した。この目的の第一段階としては、TLS と RNA 結合の詳細な解析をすすめた。今回の報告では、この結果が主たるもので、TLS のメチル化と RNA 結合に関する解析は進行中である。さらに、pncRNA-D 自体のメチル化は予想外に効果があり、この方向でも研究は進展している。当初の目的は修正されたが目的の本質、lncRNA 機能のメチル化による制御の解明は確実に進展しており、本課題は成功したと認識している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メチル化シグナルが長鎖非コード RNA の機能発現を制御することを解明することである。この目的の達成には、pncRNA-D と TLS との結合の詳細な解析が必須であり、我々は NMR 解析を導入して生物物理学的に TLS の標的 RNA 構造を決定した。そして、研究の進展に伴い、pncRNA-D 自体のメチル化が RNA 機能に重要な役割をもつという斬新な結果を得て、この解析を進めている。当初設定の TLS 自体のメチル化と RNA 結合、およびタンパク質結合への効果も現在研究が進行中である。

3. 研究の方法

RNA プルダウン法

ビオチン標識の RNA を作成し、ストレプトアビジン-ダイナビーズに吸着させる。これと HeLa 細胞核抽出液または GST-TLS タンパク質を発現させた大腸菌ライゼートと 1 時間、4 °C でロテーターにてインキュベーションする。WCE 緩衝液にて 4 回洗浄後、SDS-サンプル緩衝液で煮沸し、これを SDS-PAGE にて展開後、特異抗体を用いて Western blot 法を実施した。

一般的な実験方法

SDS-PAGE 法、Western Blot 法、銀染色法は、これまで論文発表した方法に従った (上述の Nature 及び、Yoneda ら 2016)。NMR 解析は、片平らの方法で行った (Yoneda, 2016)。

4. 研究成果

まず、TLS が結合する pncRNA-D の詳細な 2 次構造を解明した (Yoneda et al. 2016)。とりわけ、5' 末端側のステム-ループ構造の直鎖状 RNA 領域が TLS 結合に必須であるという新

規性の高い結果が得られた。この RNA 構造は、生化学的解析と共に、NMR 解析でも確認された。これは本課題の大きな成果である (図 1, 2)。

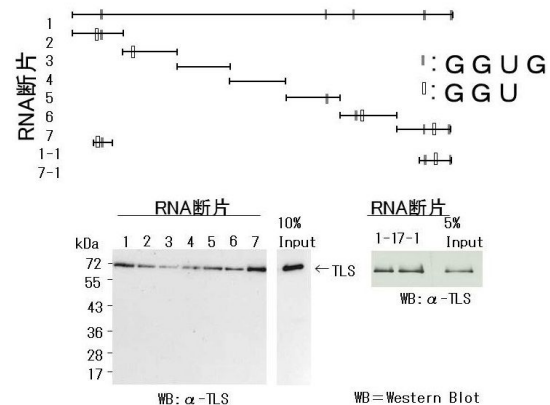


図1 pncRNA-DのTLS結合部位の同定

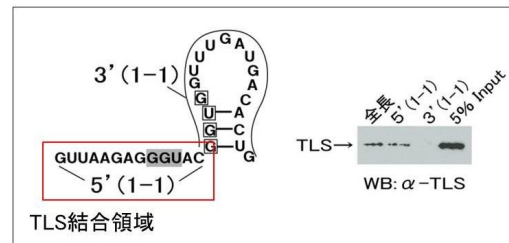


図2 pncRNA-DのTLS結合領域

これまでは、pncRNA-D 発現誘導に X 線照射を用いていた (Nature 2008)。これには、他の施設の X 線照射装置が必要なため、制約となっていた。今回、ソルビトールによる高浸透圧処理が、X 線照射よりも効率的に pncRNA-D を誘導できることを示した (図 3, 4)。今後、簡便な浸透圧処理を活用できる利点は大きい。この結果は、高浸透圧処理によるストレス負荷と長鎖非コード RNA の関連という新たな視点をもたらした。現在、次世代シーケンサー解析で、高浸透圧処理でゲノムワイドの lncRNA 発現変動を調べている。この中から、メチル化により TLS への結合が制御される lncRNA を探索する。

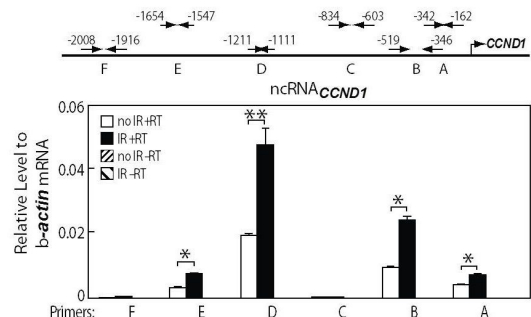


図3 cyclin D1 遺伝子のプロモーター領域と pncRNA-D の発現誘導 RI (X 線照射) により、pncRNA-A、pncRNA-B、pncRNA-D、pncRNA-E が上昇する。Nature 454:126-30, 2008 の Figure 4A を許可を得て転載。

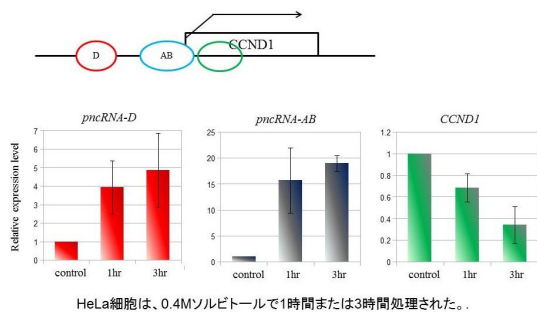


図4 ソルビトール処理(高浸透圧処理)によるpncRNAとcyclin D1量への効果

ソルビトールによる高浸透圧処理により、TLSのpncRNAへの結合が上昇する結果を得た(図5)。一方、高浸透圧処理により、pncRNA-Dのアデノシンメチル化(m6A)が減少した(図5)。このことから、pncRNA-Dのメチル化により安定性が低下することが示唆された。さらに、pncRNA-Dの配列上A465にm6Aのコンセンサス配列GGACUを見出した。実際に、この部位がメチル化されているか化学的に解析していく。

高浸透圧処理によるTLS-RNA結合とRNAメチル化への効果

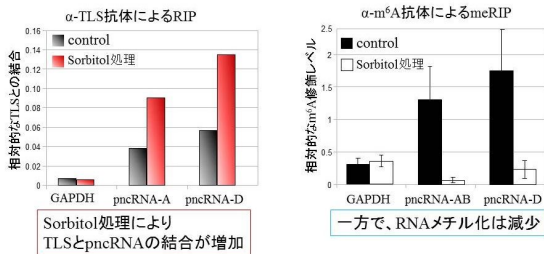


図5 高浸透圧処理によるpncRNA-Dのメチル化量の減少とTLS結合の増加

TLSの高頻度にメチル化されるアルギニン残基(R)216・R218付近のアミノ酸配列は、ヒトおよび脊椎動物、昆虫や線虫でも保存されたアミノ酸配列である。この近傍の27マーを選び、非メチルとメチル化したピオチン化ペプチドを作成した。このメチル化ペプチドに結合するタンパク質が同定されてきた(図6)。

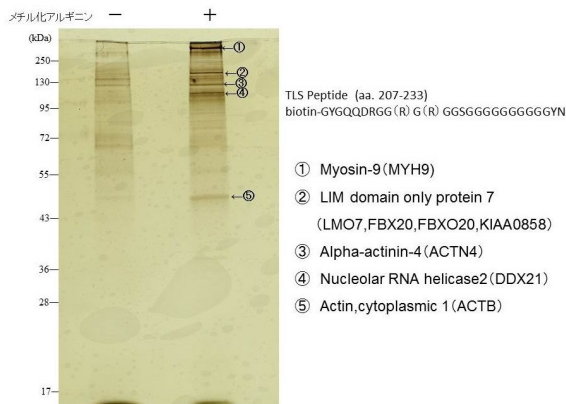


図6 TLS-R216/R218のメチル化依存的に結合するタンパク質の同定

現在、このメチル化依存的結合の生理的意義を検討している。このように、pncRNA-Dの機能の発現にはメチル化シグナルが重要な役割を果たすことが示された。今後は、ゲノムワイドでのメチル化シグナルネットワークの解析を進めていきたい。

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7件)

Kurokawa, R., Bando, T. Three-Dimensional Structure of RNA-Binding Protein TLS Co-Crystallized with Biotinylated Isoxazole. RNA and Transcription 2(1):1-10, 2016 doi: 10.11648/j.rnat.20160201.11 査読有

Araki, Y., Wada, T., Aizaki, Y., Sato, K., Yokota, K., Fujimoto, K., Kim, Y.T., Oda, H., Kurokawa, R., Mimura, T., Histone methylation and STAT3 differentially regulate IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis & Rheumatology. Arthritis & Rheumatol. 68(5):1111-23, 2016 doi: 10.1002/art.39563 査読有

Yoneda, R., Suzuki, S., Mashima, T., Kondo, K., Nagata, T., Katahira, M., Kurokawa, R. The Binding Specificity of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma with lncRNA Transcribed from the Promoter Region of Cyclin D1. Cell Biosci. 6:4, 2016 doi: 10.1186/s13578-016-0068-8 査読有

Kurokawa, R. Initiation of Transcription Generates Divergence of Long Noncoding RNAs. In: Kurokawa, R. (eds.) Long Noncoding RNAs: Structures and Functions, Chapter 5. Springer-Japan, Tokyo, Japan: p69-91, 2015 査読有

Fujimoto, K., and Kurokawa, R. Development of a mouse monoclonal antibody for the detection of asymmetric dimethylarginine of Translocated in LipoSarcoma/FUsed in Sarcoma and its application in analyzing methylated TLS. Cell & Bioscience 4:77, 2014 doi:10.1186/2045-3701-4-77 査読有

Wada, T., *Araki, Y., Sato, K., Yokota, K., Kim, Y., Oda, H., Kurokawa, R., and Mimura, T. Abnormal histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 444: 682-686. 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.195 査読有

Fujimoto, K., Arai, S., Matsubara, M., Du, K., Araki, Y., Matsushita, A., and *Kurokawa, R. Implicated role of liposarcoma related fusion oncoprotein TLS-CHOP in the dysregulation of

arginine-specific methylation through PRMT1. Cell Biology 1: 18-23. 2013
doi:10.11648/j.cb.20130102.11 査読有

〔学会発表〕(計6件)

黒川理樹特異的結合タンパク質の解析から長鎖非コード RNA の機能を探索する
第38回日本分子生物学会年会 平成27年
12月2日 兵庫県神戸市

Kurokawa, R. Mechanism of Transcription of Long Noncoding RNA. Keystone Symposia, 平成26年3月1日 New Mexico USA

Fujimoto, K., Suzuki, S., Kurokawa, R.: Transcriptional regulation by the long non-coding RNA transcribed from cyclin D1 promoter via protein arginine methylation of RNA-binding protein TLS. IAS Research Conference 2014 Chromatin Decoding. 平成26年5月13日 京都府木津川市

黒川理樹 Long noncoding RNA による遺伝子発現制御 第51回日本臨床分子医学会学術集会シンポジウム 平成26年4月11日 東京都千代田区

Fujimoto, K., Suzuki, S., and Kurokawa, R. Transcriptional regulation by the long non-coding RNA transcribed from cyclin D1 promoter via protein arginine methylation of nuclear hormone receptor-cofactor TLS. ENDO 2013. 平成25年6月15日 California, USA.

黒川理樹 長鎖非コード RNA 作用の分子機構の解析 第36回日本分子生物学会年会 平成25年12月3日 兵庫県神戸市

〔図書〕(計1件)

Kurokawa, R. (eds.) Long Noncoding RNAs: Structures and Functions, Springer-Japan, 257 pages 2015 査読有

〔その他〕

ホームページ等

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子構造機能部門

<http://space.geocities.jp/idensikouzou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 理樹 (KUROKAWA RIKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70170107

(2) 研究分担者

藤本健太 (FUJIMOTO KENTA)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：50403580

(3) 連携研究者

松下 明生 (MATSUSITA AKIO)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50402269

小川 純人 (OGAWA SUMITO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20323579