

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14505

研究課題名(和文) アルギニンのメチル化と翻訳による新たな細胞分裂制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of cell division by arginine methylation and translation

研究代表者

千賀 威 (Senga, Takeshi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80419431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂の異常は細胞死や細胞の癌化を起こすため、細胞分裂は様々な緻密なシステムにより制御されている。これまでに多くの研究が行われたが、いまだその解明にはほど遠い。我々は新たな細胞分裂因子を同定するスクリーニングにおいて、PRMT1というアルギニンメチル化酵素が細胞分裂の進行に重要であることを見出した。さらにPRMT1がUBAP2Lというタンパク質のアルギニンをメチル化することが分裂時における染色体の均等な分配に必須であることが分かった。更なる詳細な解析により、UBAP2LはG3BPやFXR1という翻訳制御因子や核小体RNAと複合体を形成し、分裂に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Failure in cell division induces cell death or cell transformation, so that cell division is regulated by various mechanisms. However, it still remain unknown how chromosomes are equally distributed during cell division.

We performed siRNA screening and found that PRMT1, a enzyme that methylates arginine, is essential for cell division. In addition, we found that arginine methylation of UBAP2L was required for equal distribution of chromosomes during cell division. We also found that G3BP and FXR1, which regulate translation, and small nucleolar RNA formed a large RNA-Protein complex with UBAP2L. Our results suggest that arginine methylation of UBAP2L complex may regulates cell division by promoting translation of specific proteins for cell division.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：細胞分裂 アルギニンメチル化

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂の異常は細胞死や細胞の癌化を引き起こすため、様々な複雑なシステムにより制御されている。過去 100 年において多くの研究者が精力的に研究を展開し、多くの知見が得られている。しかしながら、いまだ未知の新たな制御システムが存在すると考えられている。

申請者らは新たな細胞分裂制御因子を同定するため、siRNA を用いたスクリーニングを行った。24 穴プレートに HeLa 細胞を培養し、およそ 300 種類の遺伝子に対する siRNA を導入し、72 時間後に分裂の異常を観察した。その結果、多くの分裂に関与すると考えられる遺伝子を同定するに至った。

この中で我々はアルギニンメチル化酵素である、PRMT1 に注目した。アルギニンのメチル化酵素は 9 種類あり、PRMT1 はその中で最も発現が高く重要な酵素である。PRMT1 の発現を抑制すると、細胞分裂の進行は遅れ、染色体の分配の異常が出ることが分かった。この現象は複数の siRNA を用いても観察することができた。

そこで PRMT1 の基質を明らかにするため、質量分析を用いて網羅的解析をおこなった。その結果、翻訳制御に関する複数のタンパク質が同定できた。

2. 研究の目的

PRMT1 というアルギニンのメチル化酵素が細胞分裂の進行に重要であることが分かった。そこで、PRMT1、及びその基質がどのようにして細胞分裂を制御しているか明らかにすることを目的とした。また、PRMT1 の基質として複数の翻訳制御因子が同定できたので、翻訳制御機構が細胞分裂に関わっているのか検証することを試みた。さらに、PRMT1 の新たな基質がどのような興味深い現象を制御しているか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) siRNA を用いた発現抑制
siRNA は Invitrogen から購入した。主に HeLa 細胞を使用した。Lipofectamine2000 を用いて siRNA を導入し、24 時間、または 72 時間後に細胞分裂の異常がないか検討をおこなった。

(2) 免疫染色
siRNA を導入して 48 時間、または 72 時間後に細胞をパラホルムアルデヒド、またはマイナス 20 度に冷やしたアセトンを用いて固定した。その後 BSA を用いて細胞をブロッキングし、1 次抗体、2 次抗体と反応させ、共焦

点顕微鏡を用いて観察を行った。

(3) 質量分析を用いた解析
Flag タグを N 末に付加した PRMT1 や UBAP2L をレトロウイルスベクターである pQCXIP に導入し、そのプラスミドをパッケージング細胞に Lipofectamine2000 を用いて導入した。48 時間後に上清を回収し、それを 293T 細胞に感染させた。24 時間後にピューロマイシンを入れ、感染細胞を選択した。

15 センチシャーレ 2 枚の遺伝子導入細胞から細胞抽出液を作成し、Flag ビーズを用いて免疫沈降を行った。そして Flag ペプチドを用いてタンパク質を回収し、トリプシンで切断した後、質量分析装置を用いて複合タンパク質の同定を行った。

(4) RNA 沈降
UBAP2L と結合する RNA を同定するため、Halo-UBAP2L を恒常的に発現する 293T 細胞を、レトロウイルスを用いて作成した。15 センチシャーレ 2 枚分の細胞から抽出液を作成し、Halo ビーズを用いて沈降した。様々な種類のバッファーで洗浄したのち、RNA 抽出キットを用いて RNA を精製した。RNA は 200 塩基以上のロング RNA、及びそれ以下のスモール RNA に分けて回収した。そしてそれらの RNA を、世代シーケンスを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) PRMT1 による UBAP2L のアルギニンのメチル化は細胞分裂を制御する。

Flag-PRMT1 を恒常的に発現する 293T 細胞を、レトロウイルスを用いて作成し、それを用いて PRMT1 に結合するタンパク質の同定を試み

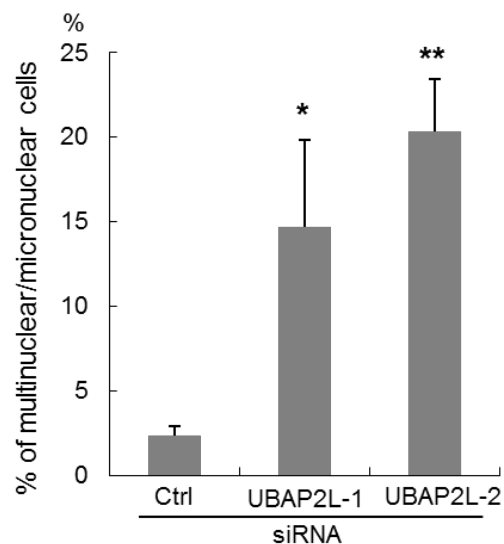


図1 多核細胞の割合

た。その結果、G3BP、FXR1、そして UBAP2L という機能未知なタンパク質が PRMT1 と複合体を形成することが分かった。そこでまず UBAP2L が細胞分裂の進行に関与しているか検討を行った。

UBAP2L の発現を siRNA を用いて抑制し 72 時間後に細胞を観察すると、多くの細胞が多核となることが判明した(図 1)。細胞分裂の阻害が起こると多くの多核細胞が出現することが知られている。この結果はレスキュー実験においても確認することができた。

次に UBAP2L の細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて検討を行った。UBAP2L に対する抗体を作成し、免疫染色を行った。興味深いことに、UBAP2L は分裂中期において、紡錘体上に局在することが観察された。

UBAP2L の発現抑制が細胞分裂のどの段階を阻害するのか検証するため、タイムラプス顕微鏡を用いた。HeLa 細胞に UBAP2L siRNA を導入し、48 時間後から 24 時間、継時的に細胞を観察した。その結果、UBAP2L の発現を抑制した細胞では分裂中期において染色体が赤道面に整列しないことが観察された。また、UBAP2L の発現を抑制した細胞では分裂異常、細胞死が分裂中に誘導されることが分かった。また、異常分裂を起こす細胞の分裂にかかる時間は顕著に長くなっていた(図 2)。

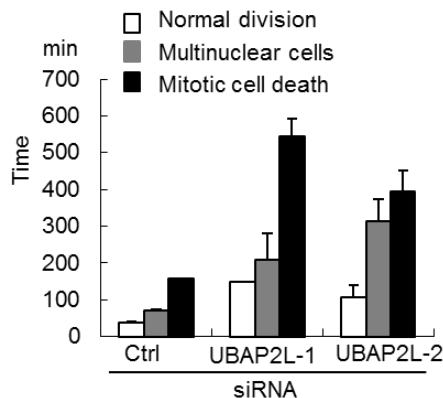


図2 分裂、細胞死までの時間

次に UBAP2L 発現抑制が細胞分裂のどの部分を阻害するのか検討を行った。UBAP2L の発現を抑制した細胞を固定し、染色体、微小管、そしてセントロメアを染色し、観察を行った。興味深いことに、UBAP2L の発現を抑制すると、微小管とセントロメアの接着に異常が観察された。拡大して丁寧に観察したところ、本来なら各染色体のセントロメアは微小管の先端に結合するが、UBAP2L の発現を抑制した細胞では、微小管の側面に多くのセントロメアが接着していた。これは、UBAP2L が微小管と染色体の結合に重要な役割を担っていることを示唆する。図 3 における side-on は微

小管の側面、end-on は微小管の先端にセントロメアが接着していることを示す。Unattached はセントロメアに結合していない微小管を示す。

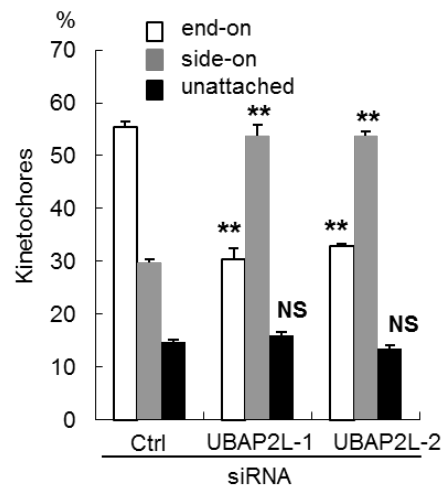


図3 接着形式の割合

さらに PRMT1 による UBAP2L のアルギニンのメチル化が重要であるか検討した。UBAP2L にはアルギニンとグリシンに富んだ配列があり、その配列のアルギニンがメチル化されることが欠損変異型の UBAP2L を作成することで確認できた。さらにそこにある 18 個のアルギニンをすべてアラニンに変換したところ、メチル化は阻害された。どのアルギニンが重要であるかは、その数の多さから同定するには至らなかった。そして野生型、及びこの変異型 UBAP2L を HeLa 細胞に恒的に発現させ、UBAP2L の 3'UTR に対する siRNA を用いて内在性のタンパク質の発現を抑制し、細胞分裂を観察した。その結果、PRMT1 による UBAP2L のアルギニンのメチル化が細胞分裂の進行に重要であることが明らかとなった。これらの結果は 2016 年に FASEB J. に発表した。

(2) UBAP2L は RNA-タンパク質複合体を形成し、細胞分裂に関わる。

UBAP2L の機能をさらに解析するため、結合タンパク質を網羅的に解析した。その結果、FXR1、FMR1、FMR2、及び G3BP1、G3BP2 というタンパク質が UBAP2L と複合体を形成することが判明した。これらの結合タンパク質は RNA と結合し、翻訳を制御することが知られている。また、これらのタンパク質は PRMT1 によりアルギニンがメチル化されており、発現抑制は細胞分裂の軽度な異常を誘導した。それらの結果から、UBAP2L 複合体は細胞分裂に関与していると予想される。

G3BP や FMR などのタンパク質は RNA に結合することが知られている。そこで UBAP2L も RNA 結合タンパク質である可能性を考え、RNA

沈降を行った。様々なタグを検証した結果、Halo タグを用いた場合最も沈降してくるバックグラウンドのRNAが少ないことが判明した。そこで Halo-GFP、または Halo-UBAP2L を恒常的に発現した細胞を作成し、Halo タグビーズで沈降し、その後 RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA の解析を行った。その結果興味深いことに、核小体 RNA が顕著に UBAP2L と結合することが分かった。さらに、UBAP2L と G3BP との結合は、複数の種類の核小体 RNA を介しており、図 4 のような複合体を形成していることが確認できた。

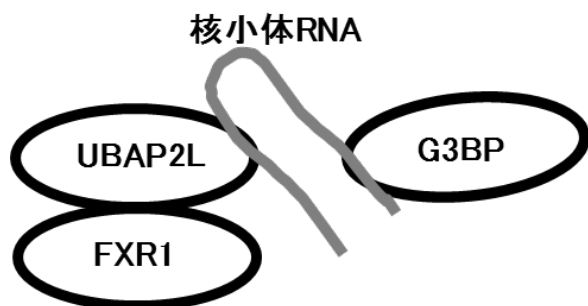


図4 RNA-タンパク質複合体

この RNA-タンパク質複合体の形成にはアルギニンのメチル化が関与していた。また、この複合体は細胞分裂時にリン酸化されるが、その詳細な役割に関してはまだ解明は進んでいない。さらに、UBAP2L、G3BP の変異型タンパク質を用いてこの複合体形成を阻害すると細胞分裂が阻害されることから、この複合体は細胞分裂の進行に重要であると考えられる。また、この複合体の形成を阻害すると翻訳が 2 割ほど減少することが観察された。これらの結果から、この複合体は RNA の翻訳を介して細胞分裂を制御している可能性が考えられる。

さらにこれらの複合体の検証を行った結果、UBAP2L はストレス顆粒と呼ばれる構造体に局在することが明らかとなった。ストレスにより細胞内では様々な反応が起こるが、その一つに RNA とタンパク質からなる凝集体、ストレス顆粒の形成がある。ストレス顆粒は膜構造を持たない、直径 5 マイクロメートルほどのダイナミックな可逆的な構造である。ストレスにより 20 分ほどで形成され、スト

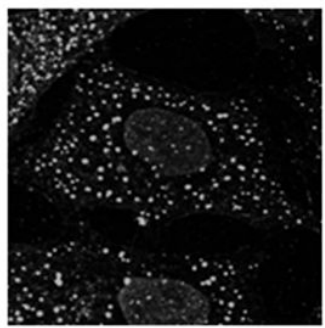


図5 UBAP2Lのストレス下における局在

レスを除去すると 60 分ほどで消失する。免疫染色の結果、UBAP2L は G3BP や FXR1 と同様に、ストレス顆粒にどのようなストレス下でも局在することが明らかとなった (図 5)。

また、GFP-UBAP2L を恒常的に発現した HeLa 細胞をタイムラプス顕微鏡を用いて観察することで、UBAP2L はストレス顆粒の形成、及び分解にも関与している知見を得た。さらに、UBAP2L のアルギニンのメチル化はストレス顆粒の形成に関与しているが、リン酸化は関係がなかった。UBAP2L が形成する RNA-タンパク質複合体はストレス顆粒の形成、またストレスシグナル、ストレスによる翻訳制御などに関与しているか、今後検証が必要であると考えられた。

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 3 件)

(1) 前田真男、長谷川仁紀、杉山麻衣、兵頭寿典、伊藤聡子、陳丹、浅野恵理、増田章男、浜口道成、千賀威

Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes.

FASEB Journal 査読有、2016、Vol130、pp312-23、doi: 10.1096/fj.14-268987

(2) 兵頭寿典、伊藤聡子、浅野恵理、陳丹、千賀威

A regulatory subunit of protein phosphatase 2A, PPP2R5E, regulates the abundance of microtubule crosslinking factor 1.

FEBS Journal 査読有、2016、Vol283、pp3662-3671、doi: 10.1111/febs.13835.

(3) コンドカーアイシャ、モハメドマンソール、兵頭寿典、千賀威

FAM98A associates with DDX1-C14orf166-FAM98B in a novel complex involved in colorectal cancer progression.

Int J Biochem Cell Biol. 査読有 Vol184、pp1-13、doi: 10.1016/j.biocel.2016.12.013

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千賀威 (SENGA, TAKESHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 80419431

(2) 研究分担者

増田章男 (MASUDA, AKIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10343203
