

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15212

研究課題名(和文) 機能性非コードRNA結合蛋白質を網羅的に同定する新たな基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for the identification of ncRNA-binding proteins

研究代表者

武川 睦寛 (Takekawa, Mutsuhiro)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30322332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、miRNAやlncRNA等に代表されるノンコーディング(nc)RNAが、細胞内で核酸や蛋白質と相互作用して、多彩な生命機能の制御に寄与すること、また、その異常が疾病発症に関与することが明らかにされ、注目を集めている。しかし、個々のncRNAの機能に関しては依然として不明な点が多い。本研究では、ncRNAの機能解析に資する新たな基盤技術の確立を目指して、生細胞内でncRNAと特異的に結合する分子を網羅的に同定する実験法の開発に挑戦し、新規システムを樹立することに成功した。本法はncRNAに限らずmRNAの解析にも広く適用可能であると考えられ、当該分野の発展に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Non-coding (nc) RNAs are functional RNA molecules that are transcribed from genomic DNA. Recent studies have demonstrated that various ncRNAs (e.g., miRNAs and lncRNAs) play important roles in the regulation of diverse cellular functions such as cell proliferation, and apoptosis through interacting with specific RNAs or proteins. Furthermore, accumulating evidence showed that abnormal expression of ncRNAs is involved in the etiology of human diseases including cancers. However, the functions of individual ncRNAs remain largely unknown. In this study, we aimed to establish a novel method to identify proteins that selectively bind to a specific ncRNA. For this purpose, we performed several pilot studies using a representative lncRNA, whose binding partners have already been identified. By constructing various expression vectors and optimizing experimental conditions, we succeeded in establishing the novel method. This method will greatly advance our understanding of ncRNAs.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：非コードRNA 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

近年のヒトゲノム転写産物の網羅的解析から、蛋白質をコードする領域はゲノムの2%以下であるのに対して、残りの領域の大半からは膨大な数の **non-coding RNA (ncRNA)** が発現する事が明らかとなった。これらの RNA 分子は、その一次・二次構造の特徴から

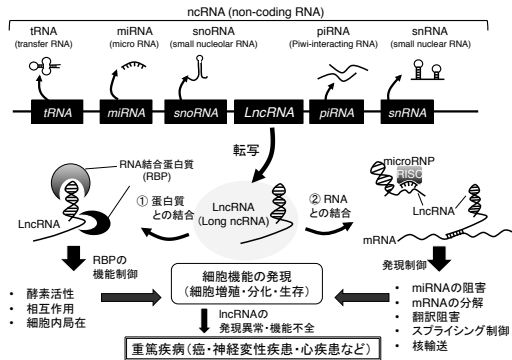


図1 ncRNAとその結合分子による細胞機能の制御

多様な RNA 分子種に分類され (tRNA, miRNA, snoRNA など)、特定の核酸や蛋白質との相互作用によって個体発生から疾患まで様々な高次生命機能を制御する (図1)。

特に近年、これらの ncRNA の中でもポリ A 構造を有しており、かつ比較的長鎖(200bp ~) である **lncRNA (Long ncRNA)** については、現在までにおよそ 30,000 種が同定されており、多くの注目を集めている。lncRNA は他の ncRNA 種と同様、RNA 結合蛋白質 (RBP: Rna-binding protein) と相互作用し、RNA 制御 (RNA 不安定化・スプライシング・核輸送・miRNA 分解) やエピジェネティクス、蛋白質の酵素活性・分子結合能・細胞内局在・翻訳後修飾等を著明に変化させる事で、個体の発生・分化・代謝などの重要な生物学的プロセスの制御に寄与している。また、癌・神経変性疾患・感染症など様々な重篤疾患において lncRNA の発現プロファイルに明らかな異常が見出されており、その生理学的・病理学的重要性が認識されつつある。

2. 研究の目的

分子機能が解明された lncRNA の例は現在までごく一部に留まっており、lncRNA を含む大部分の ncRNA の生理学的意義は未だ不明な点が多く残されている。上述の通り、lncRNA 分子の多くは様々な蛋白質分子との相互作用を介して生体機能を調節、制御しているが、lncRNA-蛋白質間の相互作用を検出

し、その生理的結合分子を探索するツールは、蛋白質-蛋白質間結合の解析法と比較して明らかに不足しており、これが本研究分野の発展を大きく妨げている。そこで本研究では、特定 RNA 配列と選択的に結合する RBP の性質を利用し、解析対象の lncRNA のみを細胞から精製、さらにその結合蛋白質単離、同定する方法の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

本技法の基盤的因子となる特定 RNA 配列およびその RBP を、過去の報告より複数選択する。これらの中でも特にその RNA-RBP 相互作用が強力かつ特異的である組み合わせについて、該当する RNA 配列を解析対象 lncRNA に融合し、一方で RBP には Myc タグを融合して細胞内に共発現する。細胞破碎後、Myc 抗体にて RRB-RNA 複合体を回収し、これに結合する蛋白質分子を lncRNA の生理的結合分子として、LC-MS/MS にて網羅的に同定する。

4. 研究成果

1) 解析対象の lncRNA の選別

当研究室での先行研究において、特に予後の悪い癌 (膵臓癌、悪性黒色腫、肺癌) で発現する lncRNA 分子を TCGA データベース (<https://cancergenome.nih.gov/>) より探索した結果、これらの癌で特に共通して高い発現を示す lncRNA 遺伝子を複数同定した。これらの lncRNA には、特定の RBP と結合することで癌の発生や悪性化を増進する既知の lncRNA も含まれていた。そこで、この既知 lncRNA および RBP をクローニングし、今回の新規 lncRNA-RBP 結合解析法の開発におけるポジティブ・コントロールとして用いた (※それぞれ lncRNA(A) および RBP(B) と記述)。本解析技術において対象とする lncRNA 分子を決定すべく、

2) 特定 RNA に選択的かつ強力に結合する RBP 分子種の選択

次に、解析対象の lncRNA に融合する特定の RNA 配列、およびその RBP の選別に取り組んだ。現在までに、特定の RNA 配列と結合する様々な RBP が報告されているため、これらの中でも特に結合能が強く、かつ特異的な RNA-RBP の組み合わせを探索した。まず、これらの RBP に Myc タグを融合

し、各 RBP に結合する RNA 分子と共にヒト細胞内に発現させた。細胞を破碎後、抗 Myc 抗体を用いてライセートより各 RBP を精製し、これらの結合する特定 RNA 分子を q-RT-PCR にて定量した。その結果、最も非特異的な結合が少なく、かつ強固な結合を示す RNA-RBP の組み合わせが決定された

3) RNA(X)配列を融合した lncRNA の精製、およびその RBP 分子の観察

そこで次に、上述の癌関連 lncRNA(A)を RNA(X)と融合し、Myc-RBP(Y)と共にヒト細胞に発現させた。その後、Myc 抗体にて精製することで、lncRNA(A)の生理的結合分子である RBP(B)が回収可能か検証した。この際、lncRNA(A)と Myc-RBP(Y)との結合を極力阻害しないよう、以下の 2 種の RNA(X)融合分子種を作製し、その配向性が与える影響について検討した。

① lncRNA(A)-RNA(X)

② RNA(X)-lncRNA(A)

細胞破碎後、Myc 抗体にて RBP(Y)を精製したところ、特に lncRNA(A)-RNA(X)の配向性を持つ融合分子種が、低バックグラウンドかつ有意に強く検出された。さらに、この免疫沈降サンプルを SDS-PAGE にて分離し、ウェスタンブロットにて解析した結果、癌関連 lncRNA(A)の生理的結合分子である RBP(B)を検出することに成功した。

4) RNA(X)の融合および精製による機能未知 lncRNA の RBP スクリーニング法の確立

以上の検討から、今回決定した RNA(X)配列を特定の lncRNA に融合し、Myc-RBP(Y)にて精製することで、その結合分子 (RBP) を細胞内から単離することが可能となった。そこで、機能未知 lncRNA 分子の生理的および病理的意義を明らかにすべく、lncRNA の RBP の網羅的スクリーニングを実施した。本目的のために、まず Myc-RBP(Y)を安定発現する HEK293 細胞を樹立した。さらに、様々な癌で高発現が観察された機能未知 lncRNA (上述)の中でも、特に強い発現レベルを示した分子を選択し、これに RNA(X)を融合して同細胞株に導入した。細胞を破碎後、Myc 抗体により lncRNA 複合体を精製し、沈降物を SDS-PAGE により分離、銀染色にて可視化した。その結果、上記癌関連

lncRNA との結合を示す特異的な蛋白質バンドが複数観察された。現在、これらのバンドをゲルより切り出し、LC-MS/MS にて結合分子を同定しており、その機能的意義について引き続き解析中である。

本研究では、非コード RNA と生細胞内で特異的に結合する分子を網羅的に同定する手法の開発を行い、その技術的基盤を確立した。本法は lncRNA のみならず、様々な ncRNA さらには mRNA 分子の相互作用解析にも広く適用可能であると考えられ、その生理機能の解明を強力に推し進める新技術として、当該分野の発展に大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Iijima M, Kubota Y, Sawa R, Kubota Y, Hatano M, Arashi M, Kawada M, Momose I, Takekawa M and Shibasaki M. A guanine derivative as a new MEK inhibitor produced by *Streptomyces* sp. MK63-43F2. *The Journal of Antibiotics*, 71, 135–138, (2018) 査読有

(2) Ichimanda M, Hijiya N, Tsukamoto Y, Uchida T, Nakada C, Akagi T, Etoh T, Iha H, Inomata M, Takekawa M and Moriyama M. Downregulation of DUSP4 enhances cell proliferation and invasiveness in colorectal carcinomas. *Cancer Science*. 109, 250-258 (2018). 査読有

(3) Kubota Y, Fujioka K and Takekawa M WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins. *PLoS One*. 12: e0180714, (2017) 査読有

(4) 武川睦寛

発癌シグナルによる癌抑制遺伝子のジーン・サイレンシング機構 査読無
科研費 NEWS 2017 年度 Vol.1 p18 (2017).

(5) Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, and Moriyama M. Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Res*. 76: 2612-2625, 2016 (5) 査読有

(6) Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Kubota Y, Takekawa M and Koike T. A Phos-tag SDS-PAGE method that effectively uses phosphoproteomic data for profiling the

phosphorylation dynamics of MEK1. *Proteomics* 16: 1825-1836, 2016 (7) 査読有

(7) Kubota Y and Takekawa M.

Detection and functional analysis of SUMO-modified MEK. *Methods in Molecular Biology* 1487, 99-111, 2016 (12) 査読有

(8) Arimoto-Matsuzaki K, Saito H, Takekawa M. TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis. *Nature Commun.* 7:10252. doi: 10.1038/ncomms10252 (2016) 査読有

(9) 武川睦寛 MAPキナーゼ情報伝達経路の活性制御機構と疾患発症機構の解明 生物物理化学 電気泳動 60巻 7-10, 2016 査読有

(10) 武川睦寛 ストレス顆粒形成によるストレス誘導アポトーシスの制御と活性酸素によるその破綻. 生物物理化学 電気泳動 60巻 s24, 2016 (8). 査読無

(11) 武川睦寛 数理科学を活用し、人体をシステムとして理解する. 実験医学34巻 2752, 2016 (10). 査読無

[学会発表] (計 62 件)

(1) 武川睦寛 ERK シグナルによる癌抑制遺伝子のエピゲノム・サイレンシングと発がん 東京生化学研究会 2017 年度研究報告会、2018.3.2 東京

(2) 武川睦寛 数理解析を活用した中心体複製制御機構の解明 第 1 回 MMDS/IMSUT/CBM 合同ワークショップ、2018.2.3. 大阪

(3) Takekawa M Aberrant regulation of MAPK signaling pathways in cancer. The 48th international symposium of the Princess Takamatsu cancer research fund、Tokyo (Japan)、2017.11.7-9

(4) Takekawa M Aberrant post-translational modifications of the MEK MAPKK in cancer. OIST seminar, 2017/2/22, OIST, 沖縄

(5) 武川睦寛 数理科学を活用した生命・医学研究 数学教育学会 2017 夏季研究会、2017.7.29、東京.

(6) 武川睦寛 数理解析を活用した中心体複製制御機構の解明 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ワークショップ、2017.12.6. 神戸

(7) Hisashi Moriizumi, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Functional analysis of feedback-phosphorylation of MKK4 by MAPKs AACR Annual Meeting 2017, 2017.4.1-5., Washington D.C., USA

(8) Yuji Kubota, Ko Fujioka and Mutsuhiro Takekawa A novel method for the detection of O-

GlcNAc-modified proteins: WGA-based lectin affinity gel electrophoresis (WGA-SDS-PAGE) プロテイン・アイランド松山、2017.9.13., 愛媛

(9) Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa The molecular mechanisms that maintain the numerical integrity of centrosomes under stress EMBO Conference “Centrosomes and Spindle Pole Bodies”, 2017.9.24-27., Heidelberg, Germany.

(10) Jane Weng, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Functional analysis of a novel ERK substrate, MCRIP1 24th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 2017.10.17-18, Ohtsu, Japan

(11) Jane Weng, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Epigenetic regulation of pulmonary surfactant protein expression by MCRIP1: a novel mouse model for respiratory distress syndrome 12th International Symposium of the institute Network, 2017.11.28-29. Tokyo, Japan

(12) 中村貴紀、西住 (渡海) 紀子、中澤嵩、鈴木貴、武川睦寛 中心体複製開始を司る PLK4 中心体局在機構の解明 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017.12.9., 神戸

(13) 藤岡興、久保田裕二、武川睦寛 蛋白質 O-GlcNAc 化による MAPK 経路の新たな制御メカニズムの解明 第 5 4 回日本臨床分子医学会学術集会、東京、2017.4.14-15

(14) Seina Ohe, Yuji Kubota and Mutsuhiro Takekawa Identification of novel ERK substrates by yeast three hybrid screening 東京大学生命科学シンポジウム、東京、2017 年 4 月

(15) Hisashi Moriizumi, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Functional analysis of feedback-phosphorylation of MKK4 by MAPKs 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017.9.28-30

(16) Yusuke Takagi, Yuji Kubota and Mutsuhiro Takekawa Identification of a novel protein that is induced by hyperactivation of the ERK pathway 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017.9.29

(17) Ko Fujioka, Yuji Kubota and Mutsuhiro Takekawa Analysis of a novel O-GlcNAc protein involved in the MAPK pathway 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017.9.28-30

(18) Yuji Kubota, Tomoyuki Tsuchiya and Mutsuhiro Takekawa Negative regulation of the ERK pathway by caspase-mediated cleavage of MEK1 during apoptosis. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017.9.28-30

(19) 松下萌恵、中村貴紀、武川睦寛

ストレス応答キナーゼ MTK1 による新たなストレス感知・応答機構
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.6.

(20) 高木祐輔、久保田裕二、武川睦寛
ERK 経路の異常活性化により発現が亢進する新規遺伝子の同定と機能解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.6.

(21) 久保田裕二、藤岡興、武川睦寛
蛋白質 O-GlcNAc 化を定量的かつ簡便に検出する新たな解析方法の開発
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.7.

(22) 渡海紀子、中村貴紀、武川睦寛
ストレス応答 MAPK 経路によって制御される miRNA の機能解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.7.

(23) 中村貴紀、西住(渡海)紀子、中澤嵩、鈴木貴、武川睦寛 中心体複製開始を司る PLK4 中心体局在機構の解明
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.8

(24) Jane Weng、中村貴紀、武川睦寛
新規 ERK 基質分子 MCRIP1 の生理機能解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12.8.

(25) 武川睦寛 ストレス顆粒形成によるストレス誘導アポトーシスの制御と活性酸素によるその破綻
第 67 回日本電気泳動学会総会 特別講演 2016/8/27-28, 釧路

(26) Takekawa M MCRIP1, a novel ERK substrate, mediates ERK-induced epigenetic gene silencing during epithelial-to- mesenchymal transition. 15th Karolinska Institute Cancer Retreat, 2016/9/26-27, Stockholm, Sweden.

(27) Takekawa M Regulation of cell-fate decisions by MAPK signaling pathways and its failure in cancer. OIST seminar 2016/4/6, OIST, 沖縄

(28) 武川睦寛 TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis 第一回 RNA 顆粒/RNA タンパク質複合体研究会 2016/07/16-17, 岡崎

(29) 武川睦寛 MAP キナーゼ情報伝達経路の活性制御機構と疾患 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会シンポジウム 2016/4/15-16, 東京

(30) 武川睦寛 フィードバック・リン酸化による ERK シグナルと発癌の制御 第 39 回日本分子生物学会年會シンポジウム 2016/11/30-12/02, 横浜

(31) 武川睦寛 Dysregulation of cell signaling pathways in cancer 第 75 回日本癌学会学術総会「がん研究入門コース 1」教育講演、2016/10/6-8, 横浜

(32) 武川睦寛 ストレス顆粒形成によるストレス応答の制御と疾患 Science Medical Frontier Forum 2016 年 12 月 8 日 品川

(33) Moriizumi Hisashi, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Functional analysis of feedback-phosphorylation of MKK4 by MAPKs. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016/10/6-8, 横浜

(34) Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa, Molecular mechanisms that maintain the numerical integrity of centrosomes. American Society of Cell Biology (ASCB) annual meeting.2016/12/3-7, San Francisco, USA.

(35) Moriizumi Hisashi, Takanori Nakamura and Mutsuhiro Takekawa Functional analysis of feedback-phosphorylation of MKK4 by MAPKs. IARU International Symposium of Aging, longevity and Health. 2016/9/26, 東京

(36) 西住(渡海)紀子、中村貴紀、武川睦寛 ストレス応答 MAPK 経路依存的に発現調節される miRNA の同定 第 39 回日本分子生物学会年會 2016 年 11 月 30 日、横浜

(37) 大江星菜、久保田裕二、武川睦寛 酵母 Three Hybrid 法による新規 ERK 基質分子の同定と生理機能の解明 第 39 回日本分子生物学会年會 2016 年 11 月 30 日、横浜

(38) 高木祐輔、久保田裕二、川邊庸介、武川睦寛 ERK 経路の異常活性化により発現変化する新規遺伝子の機能解析 第 53 回日本臨床分子医学会学術集会 2016 年 4 月 16 日、東京

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ims.u-](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/Top.html)

[tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/Top.html](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/Top.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

武川 睦寛 (TAKEKAWA, MUTSUHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：30322332

(2)研究協力者

久保田 裕二 (KUBOTA, YUJI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70614973