

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07186

研究課題名(和文) がんにおけるタンキラーゼによる統括的miRNA生合成制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of integrative regulation mechanisms for tankyrase-mediated miRNA biosynthesis in cancer

研究代表者

水谷 アンナ (Mizutani, Anna)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・特任研究員

研究者番号：30615159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA生合成は、(1) pri-miRNAの転写、(2) pre-miRNAの産生、(3) pre-miRNAの核外輸送、(4) Dicerによるpre-miRNA切断、(5) RNA誘導型サイレンシング複合体の形成、の五段階から成る。タンキラーゼはpre-miRNAの産生を司るDGCR8とDROSHAに結合することを見出した。タンキラーゼがpre-miRNAの産生を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ポリ(ADP-リボシル)化と呼ばれるタンパク質の翻訳後修飾が、遺伝子発現の微調整因子であるmiRNAの産生を促進することが明らかとなった。この反応を司るタンキラーゼは、染色体末端テロメアの伸長促進やWntと呼ばれる細胞増殖シグナルの増強などを介し、がん細胞の無秩序で無制限な分裂増殖を支えることでも知られている。今回の知見から、タンキラーゼによる新たな作用点を介したがん形質制御機構の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tankyrases are members of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family proteins. Tankyrase has multiple ankyrin repeat cluster (ARC) domains, which recognize the tankyrase-binding motifs in various proteins. Here we found that several proteins involved in microRNA (miRNA) processing have putative tankyrase-binding motifs and their functions are regulated by tankyrase. First, chemical inhibition of tankyrase PARP activity downregulated the expression levels of precursor miRNAs (pre-miRNAs) but not primary precursor miRNAs (pri-miRNAs). Subsequent reporter assay revealed that tankyrase inhibitors or overexpression of the PARP-dead mutant tankyrase represses the pri-miRNA processing to pre-miRNA. Tankyrase ARCs bound to DGCR8 and DROSHA, which are essential components for pri-miRNA processing and have putative tankyrase-binding motifs. These observations indicate that tankyrase binds to Microprocessor, DGCR8 and DROSHA complex and modulate pri-miRNA processing to pre-miRNA.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：miRNA ポリ(ADP-リボシル)化 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々ながんにおいて、miRNA の広汎な発現減少が認められることが報告され、網羅的な解析から miRNA が腫瘍増殖を抑え、分化を誘導することが示唆されている (Lu J, et al. Nature 2005)。このことから、miRNA は、がんの悪性化に対して、抑制的に働くことが示唆される。一方、こうした miRNA の広汎な発現低下に伴う、miRNA 生合成に関わる因子の mRNA 発現変動は認められない (Lu J, et al. Nature 2005) ことから、この原因についてはわかっていない。

miRNA の生合成は、(1) 転写による primary miRNA (pri-miRNA) の合成、(2) 核内における pri-miRNA 切断による precursor miRNA (pre-miRNA) の産生、(3) pre-miRNA の核外輸送、(4) Dicer による pre-miRNA 切断、(5) RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex : RISC) の形成の 5 段階から成る。

近年、miRNA 生合成を担う分子について、翻訳後修飾による制御が報告されてきている (Hata A and Lieberman J, Sci. Signal. 2015)。申請者はこれまでに、タンパク質の翻訳後修飾に着目し、翻訳後修飾がエンドサイトーシスや RNA スプライシングを制御していることを報告してきた (Mizutani A, et al. J. Biochem. 2010; Mizutani A, et al. Oncogene 2016)。翻訳後修飾のうち、ポリ (ADP - リボシル) 化は、タンパク質に負電荷を持つ巨大な分子を結合させ、タンパク質の物性を大きく変化させることから、タンパク質と DNA、RNA の結合に変化を与えると考えられ、miRNA 生合成調節に関与している可能性があり、着目した。これまでに miRNA 生合成を担うタンパク質のうちの一つである Argonaute 2 (Ago2) がポリ (ADP - リボシル) 化され、その結果 miRNA 生合成が抑制されていることが報告されているものの、分子メカニズムの詳細は明らかではない (Leung AKL, et al. Mol. Cell 2011)。タンキラーゼ結合配列に関しては、ペプチドの網羅的解析から同定されている (Guettler S, et al. Cell 2011)。我々は、アミノ酸配列からタンキラーゼに結合し得ると予測された分子リスト (Guettler S, et al. Cell 2011) に、miRNA を介した mRNA 分解のプロセスに関わる分子群が含まれていることに着目した。具体的には、miRNA 生合成に関わる DGCR8、DROSHA、Exportin-5、Ago、Dicer と最下流で mRNA 分解に関わる PABP である。

2. 研究の目的

様々ながんで広くマイクロ RNA (miRNA) の発現減少が認められることが知られているが、原因は明らかではない。申請者は、miRNA 生合成に関わる複数の分子に、ポリ (ADP - リボシル) 化酵素であるタンキラーゼに結合するモチーフ配列があることに着目した。ポリ (ADP - リボシル) 化とは標的タンパク質にポリ (ADP - リボース) 鎖を付加する翻訳後修飾である。タンキラーゼによりポリ (ADP - リボシル) 化されたタンパク質は、物性が大きく変化するとともに、ポリ (ADP - リボース) 鎖がシグナルとなりユビキチン化による分解に導かれる。miRNA 生合成の複数のステップがタンキラーゼにより抑制的に制御されている可能性があると考えた。そこで、本研究の目的はタンキラーゼにより miRNA 生合成が制御されているのかどうかを明らかにし、そのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

miRNA 生合成は、前述の通り 5 段階から成る。いずれかのプロセスにタンキラーゼが関与しているか確かめるために、タンキラーゼの機能欠損としてノックダウン下及びタンキラーゼ阻害剤処理下で、いくつかの miRNA について、pri-miRNA、pre-miRNA、mature miRNA を定量的 RT-PCR にて測定する。

タンキラーゼはタンキラーゼ1とタンキラーゼ2があり、タンキラーゼの酵素活性を抑えるには、タンキラーゼ1および2の同時ノックダウンが必要である。タンキラーゼ阻害剤については、由来と構造の異なる化合物が複数種入手可能であり、このうち、特にタンキラーゼ阻害活性の強い阻害剤である IWR-1 および G007-LK を使用予定した。

この結果を踏まえ、miRNA 生合成において、タンキラーゼが作用していると考えられるステップに關与するタンパク質について、分子レベルで生化学的な実験によりタンキラーゼのターゲットであるか検証を行った。

4. 研究成果

各種タンキラーゼ阻害剤で処理すると、pri-miRNA の量は変化しないが、pre-miRNA および mature miRNA の量は減少した。PARP 酵素活性を欠いたタンキラーゼ変異体を用いた検討でも同様の結果が得られた。各種タンキラーゼ阻害剤を用いた検討、および PARP 酵素活性を欠いたタンキラーゼ変異体を用いた検討から、miRNA 生合成経路のなかでタンキラーゼが調節しているステップは核内における pri-miRNA から pre-miRNA が切り出される段階であることがわかった。そのステップでは、pri-miRNA に RNA-binding protein である DGCR8 が結合し、さらに DGCR8 に結合した RNase III である DROSHA が pri-miRNA を pre-miRNA へと切断する。ここで DGCR8 にも DROSHA にもタンキラーゼと結合すると考えられる配列があったことから、これらのタンパク質とタンキラーゼが結合するか検討したところ、外因性のタンキラーゼと内因性の DGCR8 および DROSHA との結合を検出した。DGCR8 および DROSHA は、タンキラーゼ阻害剤処理下でタンパク質の変動は見られなかった。これまでの報告では、タンキラーゼによりポリ(ADP リボシル)化されると、続いてユビキチン化され、タンパク質が分解経路に導かれることが知られている (Zhang Y et al. Nat. Cell Biol. 2011)。我々の結果から、タンキラーゼによる修飾の結果、DGCR8 の RNA 結合能が変化する、または、DROSHA の RNase III 活性が変化するのではないかと考えている。

また、複数種の細胞株で検討したところ、タンキラーゼが pri-miRNA から pre-miRNA のプロセッシングに關与している細胞としていない細胞があった。このことから、タンキラーゼによる pri-miRNA プロセッシングの制御は細胞株によることがわかった。

DGCR8 は核小体にも存在し、TERC の分解にも關与しているが、タンキラーゼはこのプロセスには關与していないことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka N, Mashima T, Mizutani A, Sato A, Aoyama A, Gong B, Yoshida H, Muramatsu Y, Nakata K, Matsuura M, Katayama R, Nagayama S, Fujita N, Sugimoto Y, Seimiya H	4. 巻 16
2. 論文標題 APC Mutations as a Potential Biomarker for Sensitivity to Tankyrase Inhibitors in Colorectal Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 752-762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-16-0578	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 -
1. 著者名 Mashima T, Taneda Y, Jang MK, Mizutani A, Muramatsu Y, Yoshida H, Sato A, Tanaka N, Sugimoto Y, Seimiya H	4. 巻 8
2. 論文標題 mTOR signaling mediates resistance to tankyrase inhibitors in Wnt-driven colorectal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 47902-47915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.18146	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 -
1. 著者名 Shirai YT, Mizutani A, Nishijima S, Horie M, Kikuguchi C, Elisseeva O, Yamamoto T	4. 巻 38
2. 論文標題 CNOT3 targets negative cell cycle regulators in non-small cell lung cancer development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2580-2594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0603-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirai F, Tsumura T, Yashiroda Y, Tuki H, Niwa H, Sato S, Chikada T, Koda Y, Washizuka K, Yoshimoto N, Abe M, Onuki T, Mazaki Y, Hirama C, Fikami T, Watanabe H, Honma T, Umehara T, Shirouzu M, Okue M, Kano Y, Watanabe T, Kitamura K, Shitara E, Muramatsu Y, Yoshida H, Mizutani A, Seimiya H, Yoshida M, Koyama H	4. 巻 62
2. 論文標題 Discovery of Novel Spiroindoline Derivatives as Selective Tankyrase Inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 3407-3427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.8b01888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani A and Seimiya H	4. 巻 522
2. 論文標題 Tankyrase promotes primary precursor miRNA processing to precursor miRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 945-951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizutani A, Yashiroda Y, Muramatsu Y, Yoshisa H, Chikada T, Tsumura T, Okue M, Shirai F, Fukami T, Yoshida M, Seimiya H.	4. 巻 109
2. 論文標題 RK-287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4003-4014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13805	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Anna Mizutani, Yukiko Muramatsu, Haruka Yoshida, Hiroyuki Seimiya
2. 発表標題 RK-287107, a potent and specific tankyrase inhibitor, blocks colorectal cancer cell growth in a preclinical model
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----