

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K18065

研究課題名(和文)プロモーターから発現するlncRNAによるcyclin D1遺伝子の発現制御機構

研究課題名(英文)Regulation of cyclin D1 gene expression by lncRNA transcribed from its promoter region

研究代表者

米田 竜馬 (YONEDA, Ryoma)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00734881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：lncRNAである pncRNA-DがRNA修飾の一つm6A修飾を受けることにより、cyclin D1の発現を制御し、細胞増殖に影響を与えることを明らかにした。

近年、RNAもメチル化やアセチル化といった修飾を受けることが判明し、その中でも多くのmRNAに見られるm6A修飾に着目して研究を行った。cyclin D1のpromoterから転写されるlncRNA、pncRNA-Dにおけるm6A修飾は、pncRNA-DとRNA結合タンパク質との相互作用や半減期に関わっており、pncRNA-Dのm6A修飾を解してがん細胞増殖に関わっていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では複数のがん細胞由来の細胞株の増殖を抑えるRNA修飾を発見した。これはつまり、がん細胞間で保存された細胞増殖メカニズムを抑制するRNA修飾であることを意味する。本研究をさらに進めると、多くのがん細胞の増殖を抑えられるRNA断片の作製に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：m6A modification of lncRNA named pncRNA-D regulates cell cycle by controlling the expression of cyclin D1.

RNA is also methylated or acetylated, and this time I focused on the most abundant RNA modification, m6A. pncRNA-D is a long noncoding RNA transcribed from the promoter region of cyclin D1. m6A modification of pncRNA-D altered interaction with RNA binding proteins, and half-life of this RNA. in summary, I discovered m6A modification of pncRNA-D is deeply related with cell cycle and cell growth of cancer cell lines.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNAメチル化 lncRNA pncRNA-D TLS/FUS

1. 研究開始当初の背景

CCND1 は、細胞周期の G1/S 期チェックポイントを制御しており、B 細胞リンパ腫、乳がん、肺がん等で過剰発現が報告されている。その発現は、プロモーターに結合するヒストンアセチル化酵素 CBP により活性化されている。一方で、発現を抑制する因子として SIP1、Oct-1、Myc などが知られているが、いずれも CCND1 を特異的に阻害する転写因子ではない。CBP による CCND1 の転写活性化が RNA 結合タンパク質 TLS により、RNA 依存的に抑制されることを発見した。また CCND1 プロモーターからは、放射線処理により誘導される promoter-associated noncoding RNA (pncRNA)-A、-B、-D、-E という 4 種類の lncRNA が発現していた。以上より pncRNA は TLS と結合する事で、CCND1 の発現を特異的に抑制している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、long noncoding RNA (lncRNA)による cyclin D1(CCND1)遺伝子の発現制御メカニズムを解明することである。CCND1 は細胞周期を司る因子で、数々のがんでその過剰発現が認められ、がん細胞の増殖異常を介して病状や予後の悪化に関与している。そのため、CCND1 の発現を特異的に制御する機構の解明が急務である。我々の研究室では、放射線により CCND1 プロモーターから lncRNA が転写され、CCND1 の発現を抑制していることを発見した。この CCND1 の発現制御メカニズムを詳細に解析することで、lncRNA の作用機序の解明と、CCND1 の過剰発現を示すがん治療への応用が期待できる。

3. 研究の方法

放射線およびソルビトール処理後に、pncRNA-D プロモーターに結合するタンパク質を同定し比較することで、pncRNA-D の発現誘導に必須な因子を同定した。pncRNA-D のメチル化を認識するタンパク質を同定し、その効果を検証した。セルソーターを用いて、細胞周期各ステージの pncRNA-D と CCND1 の発現量を比較した。さらに pncRNA-D の有無による細胞周期への効果を調べた。RNA のメチル化や pncRNA-D の過剰発現による細胞周期への影響を検討した。

4. 研究成果

研究費をいただいた期間で 3 本の論文を筆頭著者として発表することができた。特に期間を延長した 4 年目に発表した論文¹の内容を記す。

pncRNA-D は 602 塩基からなる lncRNA で、cyclin D1 遺伝子(CCND1)の上流より転写されている(図 1 上)。放射線や高浸透圧ストレス(0.4M ソルビトール)により発現が誘導され(図 1 下)、RNA 結合タンパク質 TLS/FUS をこの領域にリクルートして CCND1 の発現を抑える。pncRNA-

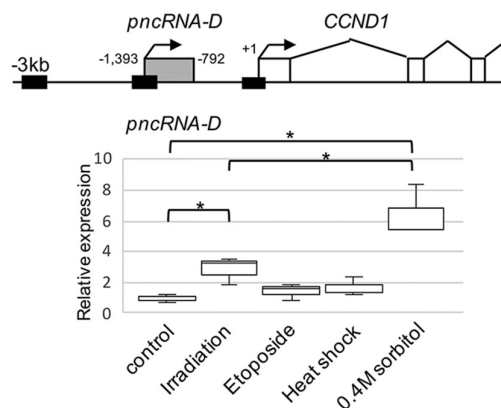


図 1. 細胞ストレスによる pncRNA-D の誘導

D は通常、高い m⁶A 修飾を受けており、この修飾により RNA 結合タンパク質との結合や RNA の安定性がどのような影響を受けるか検証した。(図2)。まず *pncRNA-D* の m⁶A 修飾を認識するタンパク質を探したところ、YTHDC1 というリーダータンパク質が結合することがわかった。そこで YTHDC1 と、m⁶A 修飾酵素である METTL3 をノックダウンした時の、*pncRNA-D* の半減期を調べた。その結果、YTHDC1 のノックダウンではコントロールに比べ影響はなかったが、METTL3 をノックダウンした際には半減期が延びたことから(図2)、m⁶A 修飾は *pncRNA-D* の分解を促進していることが示唆された。

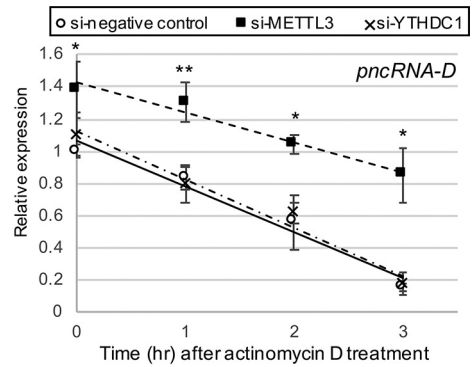


図2. *pncRNA-D* の半減期

また、YTHDC1 と METTL3 いずれのノックダウンでも、*pncRNA-D* と TLS/FUS の相互作用が増加した。これらの結果から、*pncRNA-D* の m⁶A 修飾は *pncRNA-D* を不安定化し、YTHDC1 が結合することで、TLS/FUS が結合しにくくなっていると考えられる。さらに YTHDC1 や METTL3 をノックダウンした細胞では細胞増殖が抑えられたが、同時に *pncRNA-D* をノックダウンすると、増殖率がレスキューされることを明らかにした(図3)。以上より、*pncRNA-D* は cyclin D1 の発現を介して細胞周期を負に制御しており、がん細胞由来細胞株の増殖を抑える効果を得た。

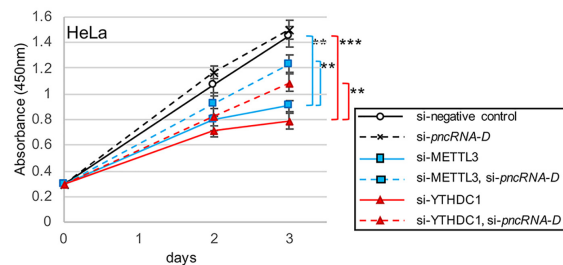


図3. *pncRNA-D*, METTL3, YTHDC1 をノックダウンした際の細胞増殖

<引用文献>

1. Yoneda R, Ueda N, Uranishi K, Hirasaki M, Kurokawa R., Long Noncoding RNA *pncRNA-D* Reduces Cyclin D1 Gene Expression and Arrests Cell Cycle Through RNA M⁶A Modification. *J Biol Chem.* 295(17):5626-5639, (2020)

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yoneda Ryoma, Ueda Naomi, Uranishi Kousuke, Hirasaki Masataka, Kurokawa Riki	4. 巻 295
2. 論文標題 Long noncoding RNA pncRNA-D reduces cyclin D1 gene expression and arrests cell cycle through RNA m6A modification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5626 ~ 5639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011556	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 Hamad Nesreen, Mashima Tsukasa, Yamaaki Yudai, Kondo Keiko, Yoneda Ryoma, Oyoshi Takanori, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 10
2. 論文標題 RNA sequence and length contribute to RNA-induced conformational change of TLS/FUS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59496-0	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 Cui Wei, Yoneda Ryoma, Ueda Naomi, Kurokawa Riki	4. 巻 293
2. 論文標題 Arginine methylation of translocated in liposarcoma (TLS) inhibits its binding to long noncoding RNA, abrogating TLS-mediated repression of CBP/p300 activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10937 ~ 10948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA117.000598	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米田 竜馬、上田 奈緒美、金木 清美、板東 俊和、黒川 理樹
2. 発表標題 RNA結合タンパク質TLS/FUSの液-液相分離、繊維化に薬剤が与える効果
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 米田竜馬、上田奈緒美、黒川理樹
2. 発表標題 CCND1プロモーター領域より転写されるlncRNAによる細胞周期への影響
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryoma YONEDA, Wei Cui, Naomi Ueda, Riki Kurokawa
2. 発表標題 TLS and long noncoding RNA transcribed from the promoter of cyclin D1 repress its mRNA expression
3. 学会等名 第43回内藤コンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryoma YONEDA, Wei CUI, Naomi UEDA, and Riki KUROKAWA
2. 発表標題 The effect of m6A modification on lncRNA transcribed from Cyclin D1 promoter
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------