

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06939

研究課題名(和文) アルギニンメチル化による長鎖非コードRNA結合の抑制と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of inhibitory mechanism of binding of long noncoding RNA via arginine methylation and its physiological significance

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの研究から、RNA結合タンパク質(RBP)TLS/FUSは、長鎖非コードRNA(lncRNA)であるpncRNA-Dと結合すると、CBP/p300のヒストンアセチル化酵素(HAT)活性を強力に抑制することが見出された(Wangら、Nature 2008)。今回、TLSのC末端付近のアルギニン(R)残基がタンパク質アルギニンメチル化酵素(PRMT1)によりメチル化を受けるとTLSのRNA結合が阻害され、さらにHAT阻害活性も失うことが示された。この結果は、Rメチル化がTLS機能を抑制してゲノムワイドで遺伝子発現を制御する新規性があり包括的なモデルを提示することになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、TLS/FUSを含む多くのRNA結合タンパク質(RBP)が高度にアルギニン(R)メチル化されていることが知られていたが、その生理的意義は大部分不明であった。今回の成果で、TLSのRメチル化が、RBPの中心的な機能であるRNA結合を制御することが明らかになった学術的意義は大きい。今後は、この現象がほかのRBPでも機能していることをゲノムワイドで解明していきたい。一方、タンパク質のRメチル化は、大腸がんの発症や、胎生期の脳の発達、iPS細胞の万能性の維持などに必須であり、これらの分子機構を解明することは社会的な要求に貢献することになる。

研究成果の概要(英文)：Our previous data demonstrate that RNA-binding protein (RBP) TLS/FUS binds promoter-associated noncoding RNA-D (pncRNA-D) and strongly represses the CBP/p300 histone acetyltransferase (HAT) activity (Wang et al. Nature 2008). Recently, we have shown that protein arginine (R) methyltransferase 1 (PRMT1) methylates arginine residues of the C-terminus of TLS and this R methylation represses RNA binding of TLS and also its inhibitory effect on the HAT activity. These data present a novel and comprehensive model showing that R methylation of TLS modulates its function and also regulates expression of relevant genes in the human genome.

研究分野：基礎医学・医科学一般

キーワード：アルギニンメチル化 TLS FUS lncRNA pncRNA-D 相分離 HAT PRMT1

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの8割は転写されて大部分が長鎖非コードRNA(lncRNA)となる。最新の理化学研究所の論文では27,919種のlncRNAが同定されている。多様なゲノムから転写されるlncRNAも多様であり、共通の作用機構は見出されていない。一つの糸口は、lncRNAの特異的RNA結合タンパク質の存在である。我々は、cyclin D1プロモーター由来のpncRNA-DがTLSと結合してHATを阻害することを報告した(Wang, Nature 454:126, 2008)。予備実験では、TLSがアルギニン(R)メチル化を受けるとpncRNA-Dとの結合が抑制された。このことから、TLSがRメチル化されるとRNA結合も抑制されて、その結果HAT阻害が抑制される仮説をたてた(図1)。この仮説が、本研究の核心をなす「問い」である。TLSは、HeLa細胞の2万種以上のRNAと結合し、その1700種以上がlncRNAであった。TLSのRメチル化は、このHeLa細胞RNAのTLS結合を有意に減少させることから(図2)、TLSと結合するlncRNA結合も抑制されると予想される。以上より、Rメチル化は、広範なlncRNAのTLS結合を抑制し、lncRNA機能の普遍的な制御機構であることが示唆される。

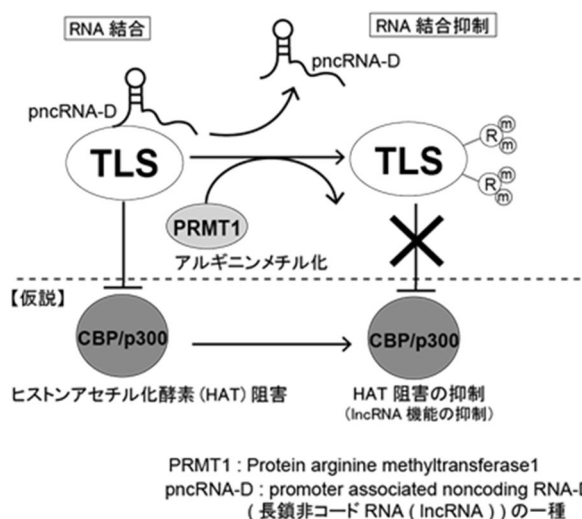


図1 アルギニンメチル化によるlncRNA結合の抑制

TLSのHAT阻害にはpncRNA-D結合が必須なので、メチル化によりHAT阻害が抑制されることが予想される。これが、本研究の核心をなす「問い」、すなわち、仮説となる。

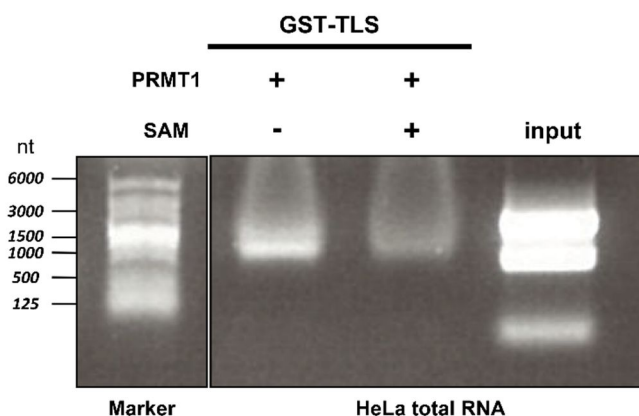


図2 TLSのアルギニンメチル化によるRNA結合の抑制

GST-TLSの非メチル化、および、メチル化サンプルにHeLa細胞の総RNAを結合させてアガロースゲルで電気泳動した。検出はエチジウムブロマイド染色法を用いた。インプットは10%。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルギニン(R)メチル化によりTLSのlncRNA結合の抑制が起こり、HAT阻害作用を抑制する仮説の検証である。この仮説を証明すると、Rメチル化によるRNA結合タンパク質TLSを介した、HAT阻害、すなわち、lncRNAの生理機能の制御機構という新たな仕組みが提示される。このことは従来にない学術的に独自の発見となる。これまでに、多くのRNA結合タンパク質(RBP)のRメチル化が知られていたが、その生理的意義が分子レベルで解明さ

れた例は少ない。本研究は、RBP の中心的機能である RNA 結合が R メチル化による抑制を受けるという事実の検証から、RBP の R メチル化の生理的意義を明確に示せる点で、新規性の高い創造的な成果を生み出すことになる。さらに、ヒトゲノムに存在感を強める lncRNA であるが、依然として生理的意義には懐疑的な意見がある。本研究は、ヒトにおける lncRNA の生理的意義を補強する成果が期待される。

3. 研究の方法

In vitro メチル化実験 精製した GST-TLS(3 μg)は、精製した Strep-tag PRMT1(3g)と 2mM S アミノシルメチオニン(SAM)の存在および非存在下で、2 時間 30 で反応させた。反応液は、SDS サンプル緩衝液の添加で停止させた。これを 100 で 2 分間煮沸して、SDS-PAGE ゲルで展開して次の解析に供した。

RNA 結合実験 ビオチン標識の RNA を合成し、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ライセートと 1 時間、4 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 3 回洗浄後、SDS サンプル緩衝液にて煮沸し、これを SDS-PAGE ゲルにて展開後、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 法などは、これまで発表した論文に従った(論文の項参照)。

4. 研究成果

本研究の目的は、TLS のアルギニンメチル化が lncRNA である pncRNA-D 結合を抑制し、HAT 阻害をも抑制することを検証することである。具体的には、以下の項目を実行した。

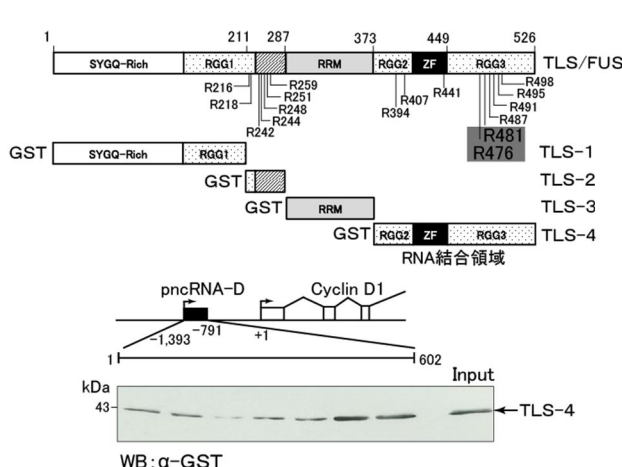


図 3 TLS の pncRNA-D 結合領域

GST-TLS4 (C 末端)が RNA 結合領域である。これが、pncRNA-D の 3' と 5' 末端に強く結合する。

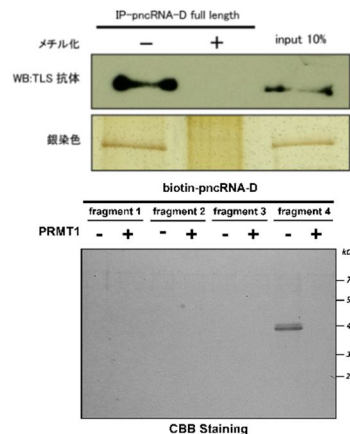


図 4 TLS のアルギニンメチル化による pncRNA-D 結合の抑制

上段：野生型 TLS はメチル化されるとビオチン化 (Bio)pncRNA-D への結合が抑制された。検出は特異抗体による Western Blot 法を用いた。下段：GST-TLS の 4 個の断片の中で、pncRNA-D に結合するものは C 末端側の TLS-4 のみであった。PRMT1 処理でアルギニンメチル化すると TLS-4 の結合は消失した。検出は CBB 染色法を用いた。

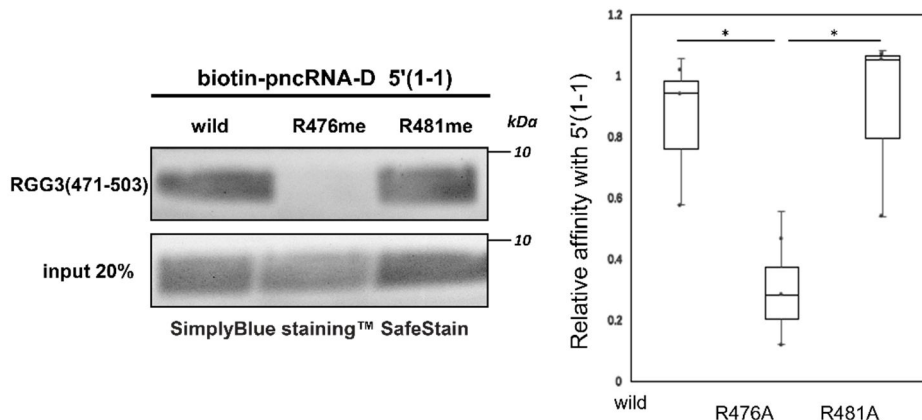


図 5 アルギニン(R)476 がメチル化すると pncRNA-D 結合が消失する

左はタンパク質ゲルの画像。ビオチン化 pncRNA-D と RGG3 ペプチド(471-503)の野生型(Wild), R476 をメチル化したペプチド(R476me), R481 をメチル化したペプチド(R481me)とインキュベーションして結合画分を 15%アクリルアミドゲル SDS-PAGE で展開後、ペプチドの結合コマシーブルーによるタンパク質染色で検出した。右は、左のタンパク質染色の結果を ImageJ システムでスキャンして、グラフ化した。

() pncRNA-D 結合を抑制するメチル化アルギニン残基の決定 RNA 結合に關与するアルギニン残基(R)を同定し、次にメチル化で pncRNA-D 結合關与を抑制する R を決定した。詳細な生化学実験から、TLS の C 末端側(TLS-4)の R が RNA 結合することが示された(図 3・4)。TLS-4 には、R394 から R498 まで、9 個の R が存在する。この中で、どの R がメチル化特異的に RNA 結合を抑制するか TLS の断片を用いた結合実験で場所を絞り込み、さらに合成ペプチド RGG3(471-03)を用いた実験を行った。ここで、候補の R 残基である R476 と R481 をそれぞれメチル化したペプチドと pncRNA-D との結合を測定した。その結果、メチル化 R481 は野生型ペプチドと同様の結合レベルを示したが、メチル化 R476 のペプチドの pncRNA-D への結合は、ほぼ消失した(図 5)。この成果から、メチル化すると RNA 結合が抑制される残基は R476 であることが示された。この成果は、本研究の分子的基盤を提供する。

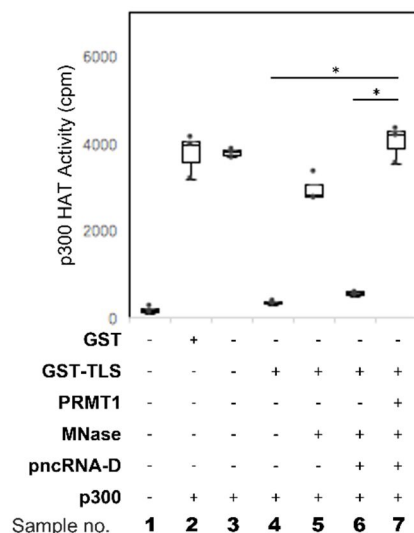


図 6 ヒストンアセチル化酵素(HAT)活性の TLS による阻害と TLS の R メチル化による HAT 阻害効果の抑制基質であるヒストンに、[3H] アセチル CoA と酵素 p300 を加えて反応させて、トリチウムを液体シンチレーションカウンターにより cpm を測定して、縦軸にプロットした。サンプル 1、[3H] アセチル CoA のみの陰性対象、サンプル 2、p300 に GST を添加した陽性対象、サンプル 3、p300 のみの陽性対象、サンプル 4、GST-TLS を添加すると HAT 活性は抑制された。サンプル 5、サンプル 4 に Nuclease 添加で TLS の RNA を除去すると、HAT 阻害は解除される。サンプル 6、サンプル 5 から Nuclease を除去して、新たに pncRNA-D を添加すると阻害効果は回復する。サンプル 7、サンプル 6 に PRMT1 を添加して、TLS を R メチル化すると RNA 結合が再び抑制され、TLS の阻害効果が抑制される。

() TLS アルギニンメチル化による HAT 阻害活性に対する効果の検証 TLS の HAT 阻害活性には pncRNA-D の結合が必須である。従って、アルギニン(R)メチル化により pncRNA-D の TLS への結合が抑制されると、TLS の HAT 阻害活性は消失するはずである(図 1)。このことを検証した。この成果は、TLS の R メチル化がその機能を制御するという画期的な成果となる。大腸菌発現系で調製した GST-TLS は、まったく R メチル化されておらず、これに pncRNA-D は結合する。そして、pncRNA-D と結合した GST-TLS は CBP-HAT を強力に阻害する。そこで、PRMT1 により GST-TLS を R メチル化すると pncRNA-D 結合が抑制されて、HAT 阻害が減弱する結果を得た(図 6)。ここまでの結果で、本研究の仮設『TLS が R メチル化されると HAT 阻害が抑制されること』は検証された。本研究の課題は達成されたと認識された。

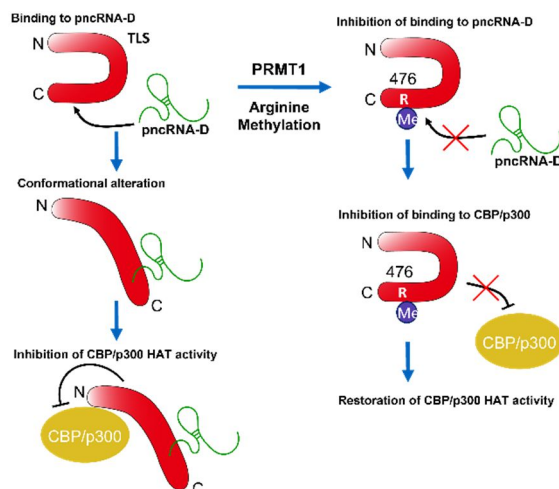


図 7 RNA 結合依存的な TLS の HAT 阻害効果は、TLS のアルギニンメチル化により RNA 結合がブロックされると HAT 阻害効果も抑制される分子モデル。詳細は本文参照。

() TLS に結合する lncRNA の探索と仮説のゲノムレベルでの検証の試み TLS のアルギニンメチル化により結合が抑制される lncRNA をゲノムレベルで検出するために、まず、TLS に結合する lncRNA をスクリーニングする方法の確立を進めた。まず、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞の総 RNA を調製し、GST-TLS に結合させた。この GST-TLS 結合 RNA 画分から、RNA を精製した。この TLS 結合 RNA を Cyanine3 で蛍光標識して、ヒト lncRNA マイクロアレイにハイブリダイゼーションした。出発物質である HeLa 細胞の総 RNA のハイブリダイゼーションシグナルに比較して 2 倍以上の蛍光強度を示す RNA 配列は、1700 以上が検出された。これを TLS 結合性 lncRNA とした。このうち上位 6 種類ほどを生化学的に解析し次の実験に進んだ。これまでの実験から(図 2)、大部分の lncRNA は TLS メチル化により結合が減少すると予想される。現在のところ、少なくとも 1 種類の lncRNA が TLS のメチル化に不応答的で、上述のメチル化 R476 にも結合する結果が得られ、本研究の仮説がゲノムレベルでも検証される方向に進んだ。ここまでの成果をモデルにした(図 7)。モデルの左では、TLS の C 末端に lncRNA である pncRNA-D が結合する。次に N 末端と C 末端が緩く会合して閉じた構造をもつ TLS の構造が開き、CBP/p300 にアクセスしやすくなり、HAT 阻害活性が誘導される。一方、TLS の R476 を含むアルギニン残基が PRMT1 によりメチル化されると、図の左側のように pncRNA-D が結合しなくなり、TLS は閉じた不活性な構造のままで CBP/p300 の HAT を抑制することができない。以上から、本研究課題の仮説が検証された。この結果は、R メチル化が TLS を介して、lncRNA 機能をゲノムワイドで制御する、新しい仕組みを提示する。これは、R メチル化による TLS の HAT 阻害の生物学的意義を検証する成果となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Naomi Ueda, Ryoma Yoneda, Riki Kurokawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of Long Noncoding RNA Recognized by RNA-Binding Protein TLS/FUS: Purification of RNAs by Affinity Chromatography of GST-TLS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 144-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20220804.15	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 Ryoma Yoneda, Naomi Ueda, Riki Kurokawa	4. 巻 Vol.22
2. 論文標題 m 6 A Modified Short RNA Fragments Inhibit Cytoplasmic TLS/FUS Aggregation Induced by Hyperosmotic Stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011014	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 Nesreen Hamad, Ryoma Yoneda, Masatomo So, Riki Kurokawa, Takashi Nagata, Masato Katahira	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-coding RNA suppresses FUS aggregation caused by mechanistic shear stress on pipetting in a sequence-dependent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89075-w	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 Naomi Ueda, Yuki Hirose, Ryoma Yoneda, Toshikazu Bando, Riki Kurokawa	4. 巻 6
2. 論文標題 Potential Inhibitor Against Phase Separation, 1,6-hexanediol Specifically Binds to Beta Actin in Nuclear Extract of Human Cell Line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 88-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.bs.20200604.13	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 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 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 -

1. 著者名 Naomi Ueda, Riki Kurokawa	4. 巻 4
2. 論文標題 Affinity Profiles Categorize RNA-Binding Proteins into Distinctive Groups.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Sciences	6. 最初と最後の頁 24-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11648/j.bs.20180403.11	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6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒川理樹
2. 発表標題 Quest for novel long non-coding RNAs with inhibitory activity against phase separation
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒川 理樹
2. 発表標題 Transcription regulatory lncRNA represses phase separation of TLS/FUS-Molecular linkage of lncRNA to phase separation by TLS in cellular functions
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川 理樹
2. 発表標題 相分離・凝集体形成の抑制因子1,6-hexanediolの作用機構と生理的意義の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒川 理樹
2. 発表標題 多機能分子FUS/TLS-脂肪肉腫の融合遺伝子、家族性ALSの原因遺伝子、そして、相分離の中心分子としての役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒川 理樹
2. 発表標題 Arginine methylation of RNA binding protein TLS inhibits binding to long noncoding RNA, repressing the histone acetyltransferase activity アルギニンメチル化によるRNA結合タンパク質TLS機能の制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川 理樹
2. 発表標題 Arginine methylation of RNA binding protein TLS inhibits binding to long noncoding RNA, repressing the histone acetyltransferase activity.
3. 学会等名 Keystone Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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