

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2022

課題番号：20KK0338

研究課題名（和文）tRNA epitranscriptome in regulating glioma therapeutic resistance

研究課題名（英文）tRNA epitranscriptome in regulating glioma therapeutic resistance

研究代表者

Rashad Sherif (RASHAD, Sherif)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00824088

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：今回の留学では、新たに考案したLC-MSを用いたハイスループットメソッドを用いて、tRNA修飾の解析方法を学ぶことができました。この方法を用いて、tRNA修飾酵素の研究に用いた多くの系でtRNA修飾を解析しました。CRISPR KOを用いて、がん細胞におけるtRNA修飾の影響を解明し、さらにリボソームプロファイリングによりmRNA翻訳への影響を明らかにした。さらに、コドンの使い方や偏りを調べ、これらの変化とtRNA修飾のシグネチャーを関連付ける方法を学ぶことで、バイオインフォマティクスのスキルを向上させることができました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

This work will open the doors for discovery of novel targets for cancer therapy that center on mRNA translation control. The first targets have been identified and currently under further studies. Using this system of analysis, novel biomarkers for various diseases can also be elucidated.

研究成果の概要（英文）：During my overseas stay, I was able to learn methods for tRNA modifications analysis using a newly designed LC-MS-based high throughput method. Using this method, I analyzed tRNA modifications in a number of systems we used to study tRNA modifying enzymes. Using CRISPR KO, the impact of tRNA modifications was elucidated in cancer cells, and their impact on mRNA translation was further characterized via Ribosome profiling. In addition, I improved my bioinformatics skills via learning methods to study codon usage and bias and correlate these changes with distinct tRNA modifications signatures. I was able to use these new skills to study the translational impact of ferroptosis and tRNA modifying enzyme ALKBH1 in glioma cells (Rashad et al, Neuroscience, 2022)

研究分野：Molecular Neurobiology

キーワード：tRNA modifications Glioma Ferroptosis mRNA translation Codon usage LC-MS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫（GB）は、成人の最も一般的な脳腫瘍であり、新しい化学療法や免疫療法が利用できるにもかかわらず、その予後は極めて不良である。DNA（エピゲノム）とRNA（エピトランスクリプトーム）の両方の異常な修飾、およびtRNAの存在量の調節異常は、腫瘍形成の重要なドライバーとして浮上している。私の研究では、tRNA修飾酵素が細胞のストレス応答を制御し、様々な治療法に対するGB化学療法抵抗性を促進する重要な機能的役割を果たすことが示されています。このプロジェクトでは、tRNAのエピトランスクリプトームがGBの化学療法抵抗性にどのような影響を与えるかを探る予定です。また、疾患と関連するtRNA修飾を制御するRNA修飾タンパク質（RMP）を同定し、GBの標的治療薬としての利用を評価するために、動物モデルを用いた機能的な前臨床試験を実施します。この研究により、将来の研究開発型創薬研究のシーズとなる新規治療標的の発見や、GB治療薬の臨床・前臨床研究につなげたいと考えています。

2. 研究の目的

GB化学療法後の動的なエピトランスクリプトーム変化をマッピングし、これらの変化を化学療法抵抗性と関連付ける → GB治療モニタリングのためのバイオマーカーを開発すること。

➢ GB化学療法抵抗性に影響を与えるtRNAエピトランスクリプトーム変化を特定する → 将来のGB治療のターゲットを特定する。

GBの致死を引き起こすtRNA修飾酵素を同定する → 将来のGB治療の標的を同定する。

療法のターゲットを特定する。

GBのフェロプトーシスを制御するtRNAエピトランスクリプトーム変化を同定する ➢ 腫瘍フェロプトーシスのプロセスを理解する。

腫瘍のフェロプトーシスのプロセスを深く理解する。

➢ GBフェロプトーシス反応を制御するtRNA修飾酵素を同定する ➢ 将来のGB治療のターゲットを同定する。

GB化学療法後のtRNA切断を特定し、tRNA修飾酵素がこのプロセスをどのように形成するか ➢ GBストレス応答におけるプロテオスタシスの役割を理解し、GB療法モニタリングのための高感度バイオマーカーを開発する。

3. 研究の方法

この研究開発プロジェクトでは、tRNA修飾が神経膠腫やフェロプトーシスに与える影響を理解するために、様々な方法を組み合わせて使用しました。tRNA修飾の質量分析、シークエンス、遺伝子編集、バイオインフォマティクスと計算生物学的アプローチを用いて、tRNA修飾酵素が神経膠腫の進行とフェロプトーシス感受性に及ぼす影響を解明しました。

4. 研究成果

1. 質量分析を用いたハイスループットtRNA修飾解析手法の習得と紹介

この国際共同研究助成の主な目的のひとつは、tRNAの修飾を研究するための手法を学ぶことでした。最も重要な手法のひとつが、質量分析（LC-MS/MS）を用いたtRNA修飾の解析です。私はマサチューセッツ工科大学（MIT）のDedon研究室で1年間、与えられたサンプルからすべての既知のtRNA修飾をハイスループットで分析する方法の学習、改善、最適化に取り組みました。滞在中、私たちはこの方法の2つの反復法、すなわち発見用の分析法と、大量サンプルのコホート分析用の超短時間法の作成に取り組みました（図1）。両手法は多くのサンプルに適用され、酸化ストレス、アルツハイマー病、脳卒中モデル、神経膠腫細胞株、遺伝子ノックアウトや過剰発現後のtRNA修飾酵素機能の検証など、さまざまな症状

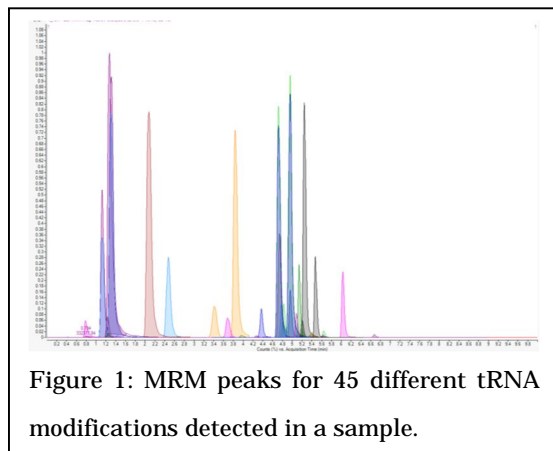


Figure 1: MRM peaks for 45 different tRNA modifications detected in a sample.

や疾患の研究に用いられました。さらに、tRNA 修飾が mRNA の翻訳に与える直接的な影響を解明できるコドン解析の手法も学びました (Rashad et al,

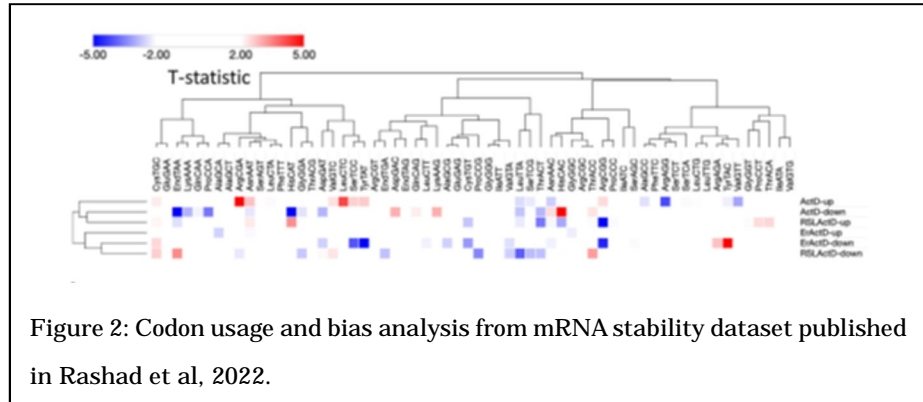


Figure 2: Codon usage and bias analysis from mRNA stability dataset published in Rashad et al, 2022.

Neuroscience, 2022. 図 2)

2. フェロプトーシスの翻訳制御と tRNA 修飾酵素の役割の解明

本研究では、神経膠腫細胞においてフェロプトーシスが誘導される際に生じる mRNA のエピ転写変化に着目した。その結果、alternative splicing と mRNA の安定性的変化は、転写の変化よりも早く、かつ非常に強い速度で起こることが明らかになりました。さらに、翻訳抑制はクラス I のフェロプトーシス誘導剤に対しては保護的であるが、クラス II に対しては保護的でないことが示された (図 3)。この理論を検証するために、ALKBH1 の過剰発現が用いられた。ALKBH1 は、神経膠腫患者の予後不良と関連している。ALKBH1 は、神経膠腫細胞において、翻訳抑制と幹のような表現型を誘導した。ALKBH1 はクラス I に対しては保護的であったが、クラス II のフェロプトーシス誘導剤に対しては感受性を高めた (図 4)。このデータは、神経膠腫に対するフェロポトーシスに基づく治療法を最適化し、個別化するために重要である。

3. 作業を継続する：

この研究開発プロジェクトの過程で、私は複数の tRNA 修飾酵素を試験し、神経膠腫におけるその役割を特定することができました。また、神経膠腫におけるリボソームの品質管理、フェロプトーシス、tRNA 修飾の間の関連性を特定することができました。これらのプロジェクトは現在進行中で、これらの研究成果に基づいて授与された JSPS 科研費 B の支援を受けています。

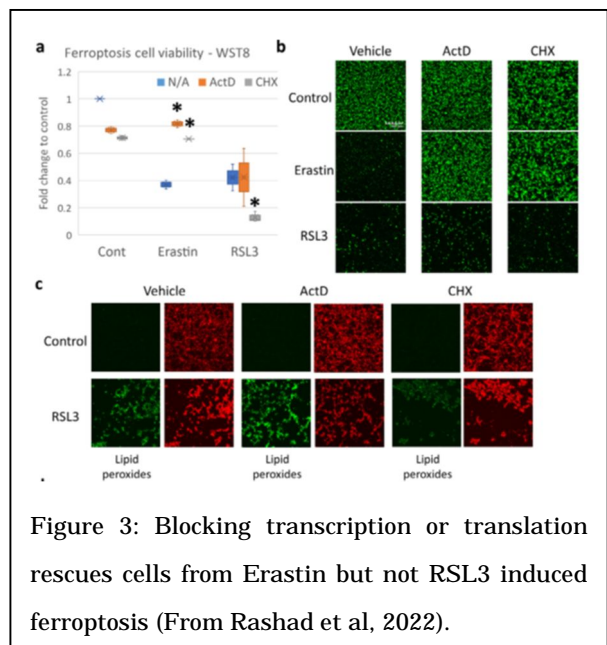


Figure 3: Blocking transcription or translation rescues cells from Erastin but not RSL3 induced ferroptosis (From Rashad et al, 2022).

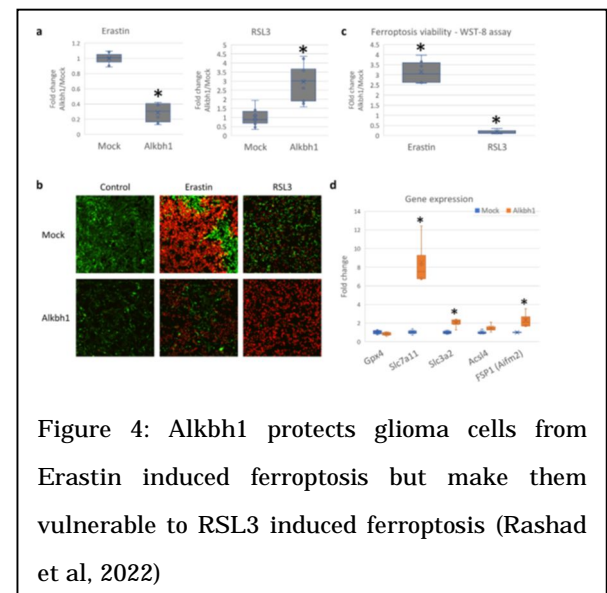


Figure 4: Alkbh1 protects glioma cells from Erastin induced ferroptosis but make them vulnerable to RSL3 induced ferroptosis (Rashad et al, 2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sherif Rashad, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 236
2. 論文標題 The cell and stress specific canonical and noncanonical tRNA cleavage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 3710-3724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30107	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 該当する

1. 著者名 Yuan Zhou, Sherif Rashad, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 -
2. 論文標題 Mature Neurons' sensitivity to oxidative stress is epigenetically programmed by alternative splicing and mRNA stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biorxiv preprint	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.12.25.472549	査読の有無 無
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 Sherif Rashad, Shane R Byrne, Daisuke Saigusa, Jingdong Xiang, Yuan Zhou, Liyin Zhang, Thomas J Begley, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 501
2. 論文標題 Codon Usage and mRNA Stability are Translational Determinants of Cellular Response to Canonical Ferroptosis Inducers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2022.08.009	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sherif Rashad
2. 発表標題 Codon usage and mRNA stability are translational determinants of cellular response to canonical ferroptosis inducers
3. 学会等名 29th annual conference of the Society for Redox Biology and Medicine, Orlando, Florida, USA. (国際学会)
4. 発表年 2022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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	デドン ペーター (Dedon Peter)	マサチューセッツ工科大学・Department of Biological Engineering・Professor	

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		
米国	Massachusetts Institute of Technology,		