

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24810023

研究課題名(和文)長鎖非コードRNAを介する転写抑制でのRNA結合タンパク質のメチル化修飾の役割

研究課題名(英文)Role of methylation of RNA-binding protein on transcriptional repression by the long non-coding RNA

研究代表者

藤本 健太(Fujimoto, Kenta)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：50403580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：長鎖非コードRNA(lncRNA)がRNA結合タンパク質を介してどのように転写を抑制するのか未解明な問題が多い。そこで、本研究では、アルギニンメチル化TLSの特異的モノクローナル抗体を作製し、HeLa細胞においてRNA免疫沈降アッセイを行った。その結果、cyclin D1プロモーターから転写されるlncRNAがメチル化TLSと結合することが明らかとなった。さらに、RNAゲルシフトアッセイにより、TLSのメチル化によりRNAオリゴヌクレオチドとの結合が変化するという予備的結果を得た。これらより、RNA依存性の転写制御がRNA結合タンパク質のメチル化修飾により制御されるという可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to uncover how the long non-coding RNAs (lncRNAs) regulate transcription via RNA-binding proteins. To investigate the role of arginine-methylation of RNA-binding protein TLS, we first developed a monoclonal antibody against arginine-methylated TLS. We performed RNA-binding immunoprecipitation assays using HeLa lysate and this antibody. We found that the lncRNA transcribed from cyclin D1 promoter binds to methylated TLS by RT-PCR. Our preliminary data also suggest that arginine methylation of TLS might enhance the binding to RNA oligonucleotides. These results suggest that the RNA-dependent transcription is regulated by arginine-methylation of RNA-binding protein.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：長鎖非コードRNA RNA結合タンパク質 遺伝子発現制御 メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現調節機構は、生命現象の根幹の一つである。近年、転写調節において、タンパク質、特にヒストンの翻訳後修飾が重要であることが明らかにされている。我々は、DNA 損傷刺激により転写が抑制される cyclin D1 (CCND1) 遺伝子において、CCND1 プロモーターから転写される長鎖非コード RNA が RNA 結合タンパク質である Translocated in LipoSarcoma (TLS) と結合することで CCND1 遺伝子の転写抑制を誘導することを明らかにした。これは、長鎖非コード RNA 依存的な転写抑制という新しい遺伝子の発現制御機構を提唱するものである。しかしながら、長鎖非コード RNA が制御する転写抑制の作用機序については未解明の問題が多い。我々は、TLS に結合するタンパク質複合体を精製し、TLS がタンパク質アルギニンメチル化酵素 (PRMT1) と複合体を形成していることを明らかにした。また、PRMT1 が TLS のアルギニンをメチル化修飾することを示した。

そこで、長鎖非コード RNA 依存的な転写抑制において、TLS のアルギニン特異的なメチル化修飾の役割に着目した。

## 2. 研究の目的

ここ数年で長鎖非コード RNA に関する研究論文が、急速に発表されている。世界中で急速に研究が行われている長鎖非コード RNA ではあるが、その作用機構や生理的な意義については未知の部分が多い。

本研究は、長鎖非コード RNA 依存的な転写制御における RNA 結合タンパク質 TLS のアルギニン特異的なメチル化修飾の機構とメチル化 TLS の転写調節における役割を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

(1) TLS のメチル化アルギニンに特異的に結合する因子の同定

我々は、TLS に結合するタンパク質複合体を精製し、PRMT1 が TLS と複合体を形成し、TLS の 216、218 番目のアルギニン (R216, R218) をメチル化修飾することを見出した。そこで、TLS のメチル化修飾を受けたアルギニンを特異的に結合する因子の同定を試みた。方法としては、GST 標識した TLS を大腸菌で発現させ、PRMT1 を用いて TLS を *in vitro* においてメチル化させた後、HeLa 細胞の核抽出液を加え、メチル化 TLS 複合体を形成させた。その後、その複合体を精製し、SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。非メチル化 TLS とメチル化 TLS を比較し、銀染色によりメチル化 TLS 複合体に特異的なバンドを同定し、ゲルから切り出し、質量分析によるペプチド解析を行った。

(2) RNA オリゴヌクレオチドとメチル化修

飾された TLS との結合解析

TLS による CCND1 遺伝子の転写抑制には、長鎖非コード RNA が TLS に結合することが必要である。そこで、TLS がアルギニン特異的な修飾を受けることで長鎖非コード RNA との結合が変化するかどうかを調べた。方法としては、大腸菌で発現させた野生型 TLS あるいは RNA 結合ドメインを欠損した融合タンパク質 TLS-CHOP を用いて、PRMT1 の存在下、非存在下において P<sup>32</sup> 標識した RNA オリゴヌクレオチドと反応させた後、RNA ゲルシフトアッセイを行った。

(3) 長鎖非コード RNA による転写抑制における *in vivo* での長鎖非コード RNA とアルギニンメチル化 TLS との結合解析

DNA 損傷刺激における CCND1 遺伝子の TLS による転写抑制には、長鎖非コード RNA が TLS に結合することが必要である。そこで、長鎖非コード RNA 依存的な転写抑制において、長鎖非コード RNA とメチル化 TLS が *in vivo* で結合するかどうかを調べた。具体的には、メチル化 TLS を特異的に認識する抗体を用いて RNA 結合タンパク質免疫沈降 (RIP) アッセイを行った。得られた total RNA を用いて CCND1 プロモーターから転写される長鎖非コード RNA とアルギニンメチル化 TLS との *in vivo* における結合を RT-PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) TLS のメチル化アルギニンに特異的に結合する因子の同定

TLS のメチル化修飾を受けたアルギニンに特異的に結合する因子の同定を試みた。GST 標識した全長 TLS を大腸菌で発現させ、PRMT1 を用いて *in vitro* で TLS をメチル化させた後、HeLa 細胞の核抽出液を加え、メチル化 TLS 複合体を形成させた。その後、その複合体を生化学的に精製し、電気泳動でタンパク質を分離し、銀染色を行った (図 1)。非メチル化 TLS とメチル化 TLS とを比較し、メチル化 TLS 複合体に特異的なバンドをゲルから切り出し、質量分析によりペプチド配列を決定した。その結果、Elongation factor 1、actin、PRMT1、が同定された (図 1)。これらの因子は、非特異的な結合である可能性が高いため、現在、ビオチン標識した TLS の 216、218 番目のメチル化アルギニンを含むペプチドを用いて、TLS のメチル化アルギニンに特異的に結合する因子の同定を試みている。

(2) RNA オリゴヌクレオチドとメチル化修飾された TLS との結合解析

TLS がアルギニン特異的なメチル化修飾を受けることで RNA との結合が変化するかどうかを調べた。大腸菌で発現させた野生型 TLS あるいは RNA 結合ドメインを欠損した融合タンパク質 TLS-CHOP を用いて、PRMT1 の存在下、

非存在下で反応させた後、 $P^{32}$  で標識した RNA オリゴヌクレオチドを加え、RNA ゲルシフトアッセイを行った(図2)。その結果、TLS が PRMT1 によりメチル化されることで、RNA オリゴヌクレオチドへの結合の増加が見られた。また、RNA 結合ドメインを欠損した融合タンパク質 TLS-CHOP では、RNA オリゴヌクレオチドとの結合は見られなかった。今回、RNA オリゴヌクレオチドと TLS の結合におけるアルギニンメチル化の効果は劇的ではなかった。その理由として、TLS が大腸菌の内在性の RNA と非特異的に結合している可能性があるため、今後は、TLS を RNase 処理し、精製した後、RNA ゲルシフトを行う予定である。また、現在、CCND1 プロモーター由来の長鎖非コード RNA を *in vitro* で合成した RNA を用いて、メチル化 TLS との結合アッセイを行っている。

### (3) 長鎖非コード RNA による転写抑制における *in vivo* で長鎖非コード RNA とアルギニンメチル化 TLS との結合解析

長鎖非コード RNA 依存的な転写抑制において長鎖非コード RNA とメチル化 TLS とが *in vivo* で結合しているかどうかをメチル化 TLS を認識する抗体を用いて RNA 結合タンパク質免疫沈降 (RIP) アッセイにより解析した。CCND1 プロモーターから転写される長鎖非コード RNA とアルギニンメチル化 TLS との *in vivo* における結合を RT-PCR 法により調べた。

まず、アルギニンメチル化修飾を受けた TLS を認識するモノクローナル抗体を作製し、抗体の特異性を確認した(図3)。その結果、今回得られたマウスモノクローナル抗体 2B12 は、TLS のアルギニン残基が非対称のジメチル化修飾を受けている場合のみ、特異的に認識し、非メチル化 TLS は認識しないことがわかった。

そこで、次に、HeLa 細胞の細胞抽出液と 2B12 抗体を用いて、RIP アッセイを行った。得られた total RNA を逆転写した後、CCND1 プロモーターから転写される長鎖非コード RNA を PCR 法で調べた(図4)。その結果、CCND1 プロモーター-D領域から転写される lncRNA が、メチル化 TLS と結合することがわかった。今後は、他の長鎖非コード RNA とメチル化 TLS の結合をゲノムワイドに網羅的に解析することを検討している。

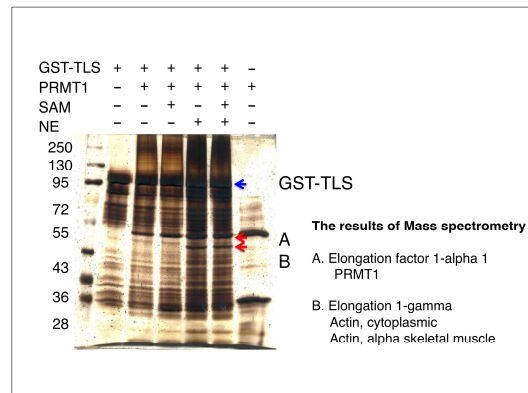


図1 TLS のメチル化アルギニンに特異的に結合する因子の同定

メチル化 TLS 複合体を形成させた後、タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、銀染色を行った。メチル化 TLS 複合体に特異的な 2 力所のバンドを切り出し、質量分析によりペプチド配列を決定した。

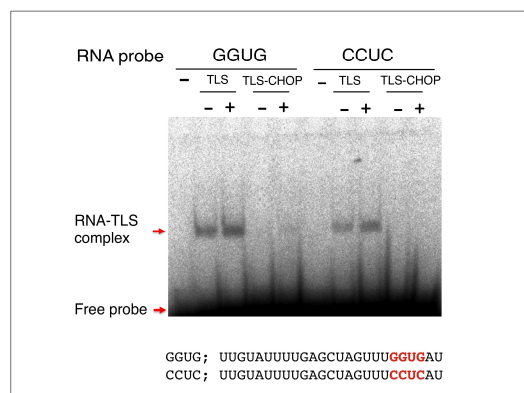


図2 RNA オリゴヌクレオチドとメチル化修飾された TLS との結合解析

野生型 TLS あるいは RNA 結合ドメインを欠損した融合タンパク質 TLS-CHOP を用いて、PRMT1 によりメチル化させた後、 $P^{32}$  標識した RNA オリゴヌクレオチドと反応させ、RNA ゲルシフトアッセイを行った。

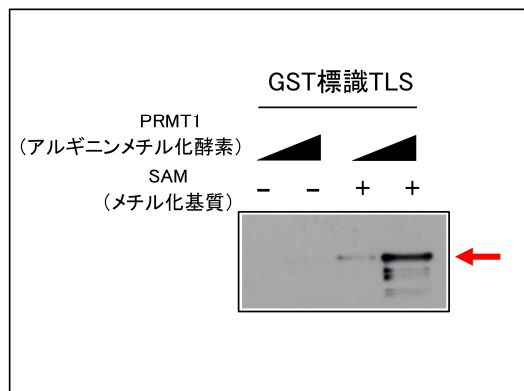


図3 アルギニンメチル化修飾を受けた TLS

を認識するマウスモノクローナル抗体の特異性

メチル化基質 SAM の存在下、非存在下において *in vitro* のメチル化アッセイにより、GST 標識 TLS をメチル化修飾させた後、GST 標識 TLS をプルダウンした。SDS-PAGE を行った後、2B12 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

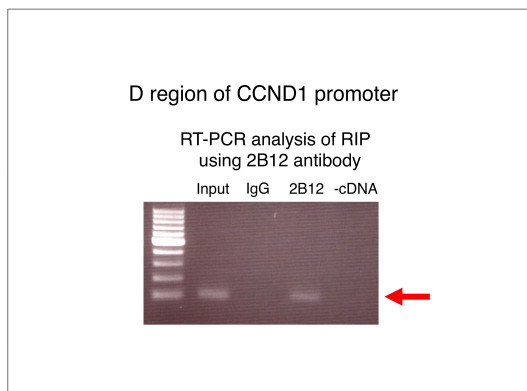


図4 長鎖非コード RNA による転写抑制における *in vivo* での長鎖非コード RNA とアルギニンメチル化 TLS との結合解析

HeLa 細胞において、メチル化 TLS を認識する 2B12 抗体を用いて RNA 結合タンパク質免疫沈降アッセイを行った。得られた RNA を逆転写した後、CCND1 プロモーター由来の長鎖非コード RNA について PCR 法で解析した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kenta Fujimoto, Shigeki Arai, Maki Matsubara, Kun Du, Yasuto Araki, Akio Matsushita, Riki Kurokawa, Implicated role of liposarcoma related fusion oncoprotein TLS-CHOP in the dysregulation of arginine-specific methylation through PRMT1. Cell Biology, 査読有、Vol.1、No.2、pp. 18-23、2013、DOI; 10.11648/j.cb.20130102.11

[学会発表](計4件)

藤本 健太、鈴木 志穂、黒川 理樹、筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 TLS のメチル化と転写制御、第11回 RCGM フォロンティアシンポジウム、2013年11月22、23日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂(埼玉県日高市)

Kenta Fujimoto, Shiho Suzuki, Riki Kurokawa, Transcriptional regulation by the long non-coding RNA transcribed from cyclin D1 promoter via protein

methylation of nuclear hormone receptor-cofactor TLS. ENDO2013, 2013年6月15-18日、Moscone Center (San Francisco, California, USA)

藤本 健太、鈴木 志穂、黒川 理樹、cyclin D1 プロモーター由来長鎖非コード RNA による TLS のアルギニンメチル化修飾を介した転写制御、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

藤本 健太、鈴木 志穂、黒川 理樹、筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 TLS のメチル化と転写制御、第10回 RCGM フォロンティア国際シンポジウム、2012年11月2、3日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂(埼玉県日高市)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計1件)

名称: 抗 TLS モノクローナル抗体及びその製造方法、ハイブリドーマ及びその製造方法、並びに抗 TLS モノクローナル抗体含有組成物

発明者: 黒川 理樹、藤本 健太

権利者: 埼玉医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-099962 号

出願年月日: 25年5月10日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://space.geocities.jp/idensikouzou/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 健太 (FUJIMOTO, Kenta)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 50403580

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし