

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293015

研究課題名(和文) ABHファミリーによるRNAエピジェネティクス制御と癌における制御破綻機構の解明

研究課題名(英文) RNA epigenetics regulation by ABH family and regulation failure mechanism in cancer

研究代表者

辻川 和丈 (TSUJIKAWA, KAZUTAKE)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10207376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌、膵癌や非小細胞肺癌で高発現するALKBH3は大腸菌タンパク質AlkBの2-oxoglutarate, Fe(II)-dependent dioxygenase domainを有し、DNAやRNA塩基を脱メチル化する酵素である。本研究では、ALKBH3がRNA、特にtRNAの1-meA、3-meC、N6-meAを脱メチル化し、タンパク質の翻訳効率上昇させ、癌細胞の増殖促進に寄与していることを明らかにした。さらにALKBHファミリーも特徴的なRNA塩基の脱メチル化活性を担うことも示した。こららの成果は、ALKBHファミリーによるRNAエピジェネティクス制御に新展開をもたらせるものである。

研究成果の概要(英文)：AlkB homolog 3 (ABH3, ALKBH3), which is originally designated as prostate cancer antigen-1, is highly expressed in prostate cancer, pancreatic cancer, and non-small-cell lung cancer. ALKBH3 catalyzes the demethylation of 1-methyladenine (1-meA), 3-methylcytosine (3-meC), and N6-methyladenine (N6-meA) in DNA and RNA. In this study, ALKBH3 was found to effectively demethylate 1-meA, 3-meC, and N6-meA within endogenously methylated RNA. An in vitro translation assay showed that ALKBH3-demethylated tRNA significantly enhanced protein translation efficiency. In addition, ALKBH3 knockdown in Panc-1 cells suppressed the nascent protein synthesis. Thus, our data highlight a novel role for ALKBH3 in tumor progression via RNA demethylation and subsequent protein synthesis promotion. Moreover, ALKBH family molecules were found to demethylate specific methylated bases in RNA. These results open a new avenue for RNA epigenetic regulation by ALKBH family molecules.

研究分野：生物系薬学

キーワード：RNAエピジェネティクス ABHファミリー ALKBH 癌

1. 研究開始当初の背景

癌の発症や悪性化に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子産物が癌治療薬の分子標的となるか検証する目的で、前立腺癌術後組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、非癌部と比べ癌部で高発現する新規遺伝子を発見し prostate cancer antigen-1 (PCA-1)と命名した。病理組織学的解析により PCA-1 の発現がより高いと診断された前立腺癌患者において、発症機構が明確にされていない去勢抵抗性前立腺癌が早期に出現することを突き止めた。さらに PCA-1 の高発現は難治性癌である非小細胞肺癌や膵癌、膀胱癌でも高発現していること、PCA-1 の発現強度とそれらの癌における術後の予後不良性とが有意に相関することも明らかとした。そこでこれら癌細胞における PCA-1 の発現を siRNA により抑制し表現型を検討した結果、in vitro において足場非依存性増殖抑制によるアポトーシス誘導作用が認められた。また in vivo においても PCA-1 siRNA の投与により顕著な抗腫瘍作用が確認できた。さらに投与後摘出した腫瘍細胞においてアポトーシス誘導が確認できた。これらの結果から、PCA-1 がこれら癌細胞において重要な機能を演じており、その発現あるいは機能抑制により画期的な癌治療薬創製の可能性が示唆された。ホモロジー解析により、PCA-1 は大腸タンパク質 AlkB と 2-oxoglutarate, Fe(II)-dependent oxygenase domain (2-OG, Fe(II)-oxygenase domain) と高い相同性を有する domain を持つことが分かった。AlkB は、メチル化剤によりメチル化されたバクテリオファージの一本鎖 DNA や RNA を酸化的脱メチル化という全く新しい機構により脱メチル化する酵素活性を有することから、PCA-1 が DNA や RNA のメチル化塩基の脱メチル化という重要な機能を演じる分子であることが推測された。最近、PCA-1 が前立腺癌細胞において 3-methylcytosine (3-meC) を脱メチル化する酵素活性を有し、癌細胞の DNA 複製障害を回避させていることが報告された。

一方我々は、PCA-1 が in vitro において RNA 塩基の 1-methyladenine (1-meA), 3-methylcytosine, N6-methyladenine (N6-meA) を特異的に脱メチル化する酵素活性を有し、さらに PCA-1 により脱メチル化された tRNA はタンパク質翻訳効率を促進させる機能がある可能性を認めた。このことは、PCA-1 による tRNA 塩基の脱メチル化は、癌細胞の増殖に重要となるタンパク質の迅速な供給に関わることを示すものと推測した。以上の結果や論文情報から、PCA-1 は AlkB のヒトホモログとして DNA だけではなく RNA 塩基の特異的メチル基に対して脱メチル化酵素活性を発現し、その制御バランスの攪乱が癌の発症や悪性化に関わるという仮説を立てるに至った。

一方、ヒトで AlkB の 2-OG,

Fe(II)-oxygenase domain と高い類似性を示す遺伝子が全部で8種類発現していることを報告した。これらの分子は現在 AlkB homolog (ALKBH) ファミリーと呼ばれ、PCA-1 は ALKBH 3 に位置付けられている。そこで ALKBH ファミリーの癌病理組織における発現解析を行った結果、ALKBH 8 が膀胱癌や乳癌で、ALKBH 2 が乳癌で、ALKBH 6 が肝癌で高発現していることを認めた。しかしこれら ALKBH ファミリー分子の酵素活性の有無や癌細胞における機能解析は、分子生物学的にも創薬標的としても非常に重要であるが、不明な点が多く残されたままである。よって本申請研究において、ALKBH ファミリー分子によるメチル化 RNA 塩基の脱メチル化制御と癌との関連性を研究することとした。

2. 研究の目的

DNA 変異は癌化の原因となるが、最近 DNA 塩基のメチル化やヒストン蛋白質の修飾によるエピジェネティクスの制御異常も、癌細胞の出現に関わることが明らかにされてきた。一方、DNA 塩基とともに RNA 塩基も種々のメチル化修飾がなされていることは知られていたが、その生物学的意義や制御機構さらには癌との関連性は不明確なままである。我々は癌で高発現し、RNA 塩基の脱メチル化酵素活性を有する分子として PCA-1 を同定した。また PCA-1 は他の8種類の分子とともに ALKBH ファミリー (ALKBH1-8) を構成する。そこで本研究は ALKBH3 を中心に RNA エピジェネティクス制御と癌との関連性を解析することを目的とする。さらに ALKBH ファミリー分子による RNA 塩基の脱メチル化制御についても検討を進めることとした。

3. 研究の方法

(1) RNA エピジェネティクス解析

細胞からの RNA は QIAzol を用いて回収した。Large RNA (200 塩基以上), small RNA (200 塩基以下) は QIAGEN miRNA easy Kit, RNeasy MinElute Cleanup Kit を用いて抽出した。抽出後、Bio Spec Nano (SIMAZU) を用いて濃度測定を行い、quality check は large RNA では 1% agarose gel, small RNA では Experion™ StdSens RNA Chips を用いて行った。RNA が分解していないことを確認後、次のような方法でヌクレオシド分解を行った。RNA 溶液に RNA 量の 1/100 量になるように dG15N5 溶液を加えた。0.1 U/μL Nuclease P1 と 0.1 M 酢酸アンモニウム (pH5.3) を等量混合して RNA 溶液に添加後、45 °C で 2 時間反応させた。0.01 U/μL Alkaline Phosphatase (E. coli C75) 溶液を添加し、37 °C で 2 時間反応させた。Chloroform 抽出を行い、上清を濃縮乾固後 10 ng/μL になるように HPLC 用超純水で再溶解した。サンプル中の RNA 修飾を UPLC-四重極質量分

析装置(Xev-TQ-S, Waters)により解析した。

(2) 新生タンパク質量定量

新生タンパク質量はClick-IT AHA キット(Life Technologies)を用いて定量した。

(3) ウエスタンブロット解析

細胞に protease inhibitor と phosphatase inhibitor を加えた Pierce RIPA buffer を添加し、4 O/N で可溶化させた後、4、15000rpm、20 分間遠心により、不溶性画分を除去して細胞 lysate を得た。細胞 lysate 中のタンパク質濃度を DCTM protein assay kit を使用して測定後、sample buffer を加え、95、10 分間 heat block を行った。得られた sample を 10%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、PVDF メンブレンにセミドライ式トランスファー装置を用いて転写した。メンブレンを洗浄後、blocking し、1 次抗体を 4 で一晩反応させた。洗浄後 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。ECL Prime Western Blotting Detection Reagents により発光させ、ImageQuant LAS4000 Mini(GE Healthcare)によりバンドの撮影を行った。

(6) 膵癌発症モデルマウスと解析

全ての動物実験は大阪大学動物実験委員会の指針に従って行われ、12 時間明暗周期、通常食、一定温度下で飼育された。Alkbh3 transgenic mouse (Alkbh3 TG mouse)は、pCAG1.1 vector に、Alkbh3 エキソン全長を組み込んだ vector を使用し、大阪大学遺伝子情報実験センターで作製した。実験には C57BL/6 マウスに戻し交配を 5 回以上行ったものを用いた。

膵臓特異的 KrasG12D 変異マウスの作製には、東京大学医学部附属病院消化器内科の伊地知秀明先生からご供与していただいた ptf1a Cre allele mouse と LSL-KrasG12D allele mouse を掛け合わせて作製した (KP mouse と表記)。そのマウスに更に、Alkbh3 TG マウスを掛け合わせたマウスも作製した (KAP mouse と表記)。

マウス膵臓を摘出後、10%中性緩衝ホルマリン中で固定した。パラフィン包埋したサンプルブロックを回転式マイクロトーム(Thermo Fisher Scientific)で 3 μm に薄切後、42 に設定したパラフィン伸展器(Leica)で 6 時間以上伸展した。レモゾールとエタノールを用いて脱パラフィン処理後、110、15 分で抗原賦活化処理を行った。その後、ペルオキシダーゼブロッキング 15 分間、goat serum ブロッキング処理を 30 分間行い、終濃度 2 μg/mL になるように希釈した抗 Alkbh3 抗体と 4 で一晩反応させた。Horse-radish peroxidase 標識抗マウス IgG 抗体を室温下で 1 時間反応させた後、DAB による発色を行った。ヘマトキシリンによるカウンターステイン後に脱水・透徹して封入した。

(7) ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色・病理組織解析

10%中性緩衝ホルマリンにより固定した膵

臓組織を PBS に置換し、アブライドメディカルリサーチへ委託して H&E 染色・病理組織解析を行った。病理組織解析は認定病理医により行われた。

4. 研究成果

PCA-1 (ALKBH3) により脱メチル化される RNA 種の検討を行った。Total RNA と蚕リコンビナント ALKBH3 をインキュベート後、質量分析計により RNA 修飾塩基を定量した。その結果、ALKBH3 の co-substrate や co-factor である 2-oxoglutarate や Fe(II) 依存的に 1-meA、3-meC が顕著に、また N6-meA が弱いながら脱メチル化されることが分かった (図 1)。

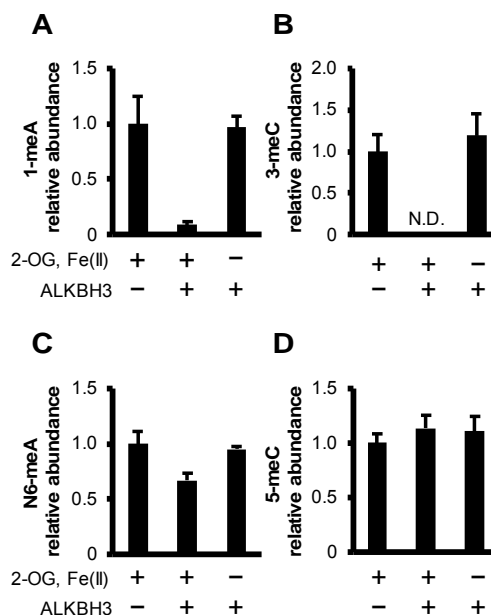


図 1 .ALKBH3 による RNA 塩基の脱メチル化

そこで次に、tRNA、mRNA、rRNA を用いて同様な解析を進めた。その結果、total RNA と同様 tRNA、mRNA、rRNA において 1-meA、3-meC が顕著に ALKBH3 により脱メチル化された (図 2)。また N6-meA も顕著な脱メチル化が認められた。ALKBH3 の N6-meA 脱メチル化は tRNA 選択的という特色を示すものである。

次に ALKBH3 により脱メチル化された tRNA (図 3 A) のタンパク質翻訳効率について解析した。その結果、顕著なタンパク質翻訳効率の促進が認められた (図 3 B)。また ALKBH3 ノックダウン Panc-1 細胞 (図 3 C) を用いた解析では、RNA 中の 1-meA レベルの上昇 (図 3 D) とタンパク質翻訳効率の減弱 (図 3 E) が認められた。これら in vitro、細胞レベルの解析から、ALKBH3 高発現が癌化に関わる機序として RNA 脱メチル化によりタンパク質の翻訳効率を上昇させ、癌細胞の増殖を維持している機序の存在が示唆された。

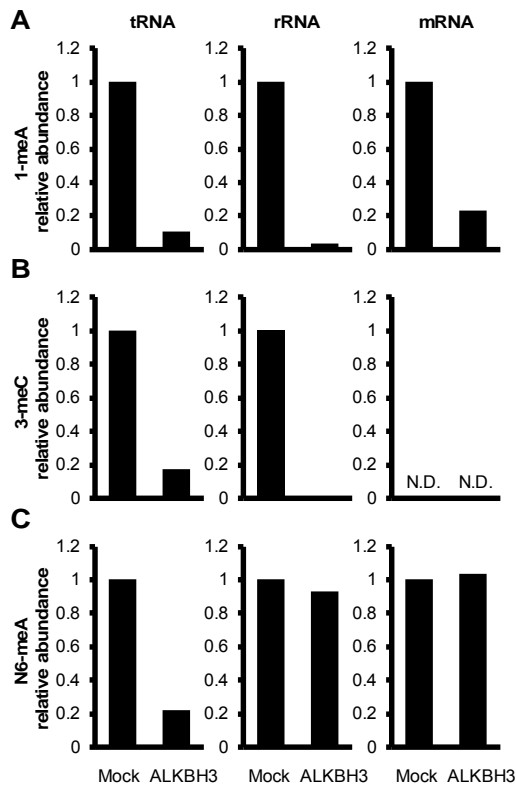


図2 . ALKBH3 による各 RNA 種の脱メチル化

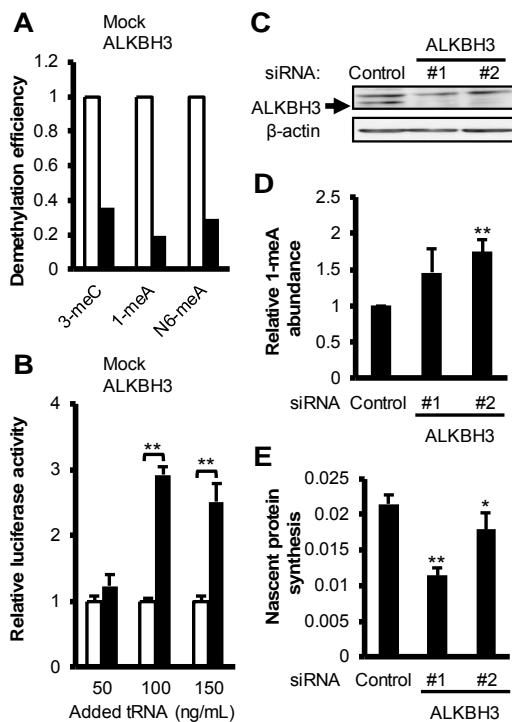


図3 . ALKBH3 により脱メチル化された tRNA によるタンパク質翻訳効率促進

そこで膵癌発症マウスモデルを用いて in vivo での解析を行った。膵癌のドライバー遺伝子変異である KrasG12D の膵臓特異的発現マウス (KP マウス) を Alkbh3 transgenic

mouse とかけあわせた (KAP マウス)。KP マウス、KAP マウスそれぞれについて、一年飼育後、膵臓を摘出し、H&E 染色による病理組織解析を行った。PanIN-2 までの前癌病変、PanIN-3 の上皮内癌、浸潤癌である adenocarcinoma として解析を行った。その解析に際し、それぞれのマウスの膵臓組織像の中で、最も進んでいる病態をそのマウスの病態としてカウントした。その結果すべてのマウスは PanIN-1 以上の grade であり、KAP マウスは全て PanIN-3 以上の grade であった。すなわち、1 年経過した KAP マウスでは PanIN grade や癌化の頻度が上昇する傾向がみられた。

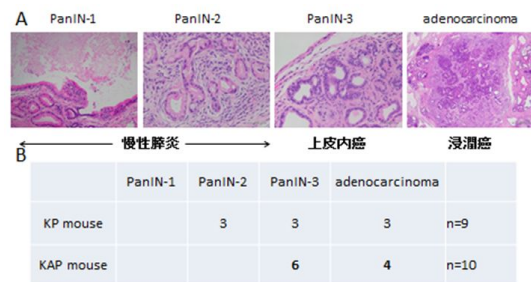


図4 一年飼育した KrasG12D マウスと ALKBH3 トランスジェニックマウスの膵臓における病変解析

次に ALKBH ファミリー分子による RNA 修飾制御に関して shRNA 発現レンチウイルスを HeLa 細胞に感染させ解析に用いた。Large RNA と small RNA を抽出し、それらを質量分析計を用いて解析した結果、ALKBH1 shRNA の発現では 5-hydroxymethylcytosine の ALKBH8 では 5-methoxycarbonylmethyluridine (mcm5U) や 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine (cm5S2U) のレベル減少 (図5) が認められた。これらの結果は、ALKBH ファミリー分子により特徴的な RNA 修飾制御がなされていることを示すものである。ALKBH1 は mRNA レベルではあるが肺癌で、ALKBH8 はタンパク質レベルで膀胱癌や乳癌で高発現していることが明らかとなっている。よって癌と ALKBH ファミリー分子により制御される RNA エピジェネティクスとの関係が本研究により明らかとなった。

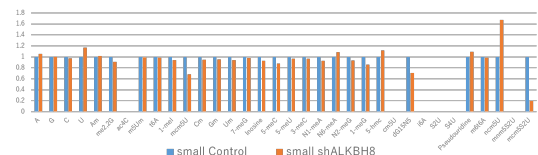


図5 ALKBH8 shRNA により制御される RNA 修飾の質量分析装置による解析

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)

Ueda Y, Ooshio I, Fusamae Y, Kitae K, Kawaguchi M, Jingushi K, Hase H, Harada K, Hirata K, Tsujikawa K.
AlkB homolog 3-mediated tRNA demethylation promotes protein synthesis in cancer cells.
Sci Rep. 2017 Feb 13;7:42271. doi: 10.1038/srep42271.

〔学会発表〕(計 8 件)

長谷 拓明, 大塩 郁幹, 上田 裕子, 北惠 郁緒里, 木本 瑞基, 西本 愛, 犬伏 智子, 辻川 和文 ALKBH6 による RNA メチル化制御の検討
日本薬学会第 137 年会

大塩 郁幹, 上田 裕子, 長谷 拓明, 北惠 郁緒里, 神宮司 健太郎, 島ノ 江知樹, 趙 雨桐, 里 章平, 藤井 晋太郎, 藤田 和利, 植村 元秀, 野々村 祝夫, 辻川 和文
RNA epigenetics 解析と膀胱癌における RNA 修飾酵素 AlkB homolog 8 の機能
日本薬学会第 137 年会

上田 裕子, 大塩 郁幹, 長谷 拓明, 北惠 郁緒里, 河口 恵, 小垣 考弘, 神宮司 健太郎, 辻川 和文
がん細胞における AlkB homolog 3 (ALKBH3) による RNA メチル化修飾制御の意義
第 39 回日本分子生物学会年会

長谷 拓明, 大塩 郁幹, 上田 裕子, 北惠 郁緒里, 西本 愛, 犬伏 智子, 木本 瑞基, 古川 龍彦, 辻川 和文
RNA epigenetics による生体制御の基盤的研究
日本分子生物学会年会

大塩 郁幹, 上田 裕子, 北惠 郁緒里, 河口 恵, 仲井 秀一, 深田 宗一朗, 原田 和生, 平田 収正, 辻川 和文
ABH family 分子による RNA エピジェネティクス制御
日本薬学会第 135 年会

川上 竜司, 塚田 陽平, 北惠 郁緒里, 神宮司 健太郎, 上田 裕子, 辻川 和文
AlkB homolog 8 (ABH8) のノックダウンにより膀胱癌細胞に誘導されるアポトーシス経路の解明
第 37 回 日本分子生物学会年会

上田 裕子, 川上 竜司, 神宮司 健太郎, 古川 龍彦, 辻川 和文
ABH3 による RNA 脱メチル化制御の破綻が膀胱癌の進行に寄与する
第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会

西本 愛, 大塩 郁幹, 河口 恵, 小垣 孝弘, 小林 巧明, 北惠 郁緒里, 神宮司 健太郎, 上田

裕子, 深田 宗一朗, 中田 渡, 藤田 和利, 植村 元秀, 野々村 祝夫, 辻川 和文
腎癌における RNA エピジェネティクス意義
日本薬学会 136 年会

〔図書〕(計 1 件)

Tsujikawa K.
Regulation of RNA methylation and epigenetic effects by the ALKBH family
Seikagaku. 2016 Jun;88(3):322-7.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/xibaoshengli/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻川 和文 (TSUJIKAWA Kazutake)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 10207376