

Title	RNA epigenetics解析と癌におけるRNA修飾酵素AlkB Homologue 8の働き
Author(s)	大塩, 郁幹
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59501
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (大塩 郁幹)

論文題名

RNA epigenetics解析と癌におけるRNA修飾酵素AlkB Homologue 8の働き

論文内容の要旨

DNA二重らせん構造の発見から50年を経た2003年、ヒトゲノム解析が完了した。様々な生命現象がDNA配列の変化として説明できるようになった一方、それ以上にDNA配列の変化だけでは説明できない現象の存在が示されてきた。これらDNAの塩基配列の違いによらない後天的な修飾により遺伝子発現の多様性を生み出す仕組みは「エピジェネティクス」と呼ばれ、DNA塩基のメチル化、ヒストンのアセチル化やメチル化などにより制御されている。エピジェネティクスの制御異常は癌の発生、悪性化の原因となると考えられ、その制御機構の分子レベルでの解明とその研究成果に基づく新規癌治療薬の創成研究が展開されている。一方近年、細胞内のタンパク質量は必ずしもmRNAの量と相関しないことが明らかになり、mRNAの転写後の制御が遺伝子の発現に重要である可能性が示唆されている。例えば、細胞内のRNAは100種類を超える修飾のバリエーションを持つことが報告されており、RNA修飾を介した遺伝子発現の転写後制御メカニズムの存在が考えられてきた。肥満との関連が知られていたFat mass and obesity associated protein (FTO) 遺伝子が、mRNA中のN6-methyladenosine (N6-meA) の脱メチル化酵素であり、RNA修飾と疾患との関連が報告されたことを皮切りに、N6-meAの修飾酵素とその生理的機能が次々と明らかになってきた。研究が進むにつれ、mRNA中のN6-meAは幹細胞の分化や概日リズムの調節、さらには様々な疾患に関わっていることが分かってきた。mRNA以外のRNA修飾の役割としては、ミトコンドリアtRNAアンチコドンループ上のゆらぎ部位での修飾欠損がミトコンドリア病の原因となることなどが報告されている。以上の知見を元に、RNA修飾変化により制御され、遺伝子の発現を転写後に調節するメカニズムとして「RNAエピジェネティクス」という新たな概念が提唱された。しかしながらRNAエピジェネティクス研究は開始されたばかりで不明な点がまだまだ多く残されている。一方、我々は種々の癌においてDNA/RNA修飾酵素であるAlkB Homologue (ABH) ファミリー分子が特徴的に高発現していることを明らかにし、ABHファミリー分子の治療標的分子としての評価を行っている。これまでも癌においてRNAメチルトランスフェラーゼをはじめとするRNA修飾付加酵素が高発現しているという事実は知られていたが、これらの研究はあくまでも癌におけるRNA修飾酵素の発現上昇を認めるに留まり、特定の修飾に限らないグローバルなRNA修飾レベルの変化、その生理的意義や詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的としたものではなかった。また、RNA修飾ヌクレオシドの同定や定量方法としては2次元薄層クロマトグラフィーが選択されてきたが、定量性の低さや放射性標識の必要からもたらされる実験の煩雑性が問題であった。しかし近年、質量分析装置を用いた測定がRNA修飾ヌクレオシドの同定や定量のための非常に強力なツールであると認識されつつある。

そこで、本研究ではまず質量分析計を用いてRNA中の修飾ヌクレオシド定量法を構築した。これを元に、ヒト正常組織由来total RNAに含まれるRNA修飾ヌクレオシドを定量したところ、修飾ヌクレオシドの種類、含有量は組織ごとに様々であった。修飾ヌクレオシドのRNA種指向性を明らかにするために、ヒト正常腎臓由来large RNAとsmall RNAに含まれる修飾ヌクレオシドを比較すると、多くの修飾ヌクレオシドがsmall RNA分画において含有量が高かった。この結果は、rRNA、mRNAと比較してtRNA、miRNAが豊富に修飾を受けていることを意味する。次に癌とRNA修飾との関係を調べるために、腎癌臨床検体由来RNA中の修飾ヌクレオシドの定量を行った。腎癌臨床検体由来large RNA分画の癌部では非癌部と比較して種々の修飾ヌクレオシドの含有量が増加していた。また、small RNA分画の癌部では非癌部と比較して多くの修飾ヌクレオシドの含有量が減少していたが、2'-O-methyladenosineの含有量は増加していた。

この結果は癌とRNAエピジェネティクスの相関性を示すものである。さらに、癌においてRNA修飾レベルの変化が果たす生理的な役割を明らかにするため、tRNAの修飾酵素として働くABH8の機能解析を行った。大腸菌のタンパク質AlkBは、Fe(II)と2-oxoglutarate (2-OG)の存在下、メチル基をヒドロキシル化することでホルムアルデヒドとして脱離させDNA、RNAの脱メチル化を行うタンパク質である。AlkBのヒトホモログであるABHファミリー分子の特徴はAlkBと同様に2-OG, Fe(II)-oxygenaseドメインを持つことで、DNA、RNAのメチル化損傷に対する修復酵素と考えられており、ABH1-7まで7つのファミリー分子の存在が確認されていた。我々がクローニングした新規ABHファミリー分子ABH8は膀胱癌において高発現しており、その発現は癌の悪性度と相関していた。BBNを用いた膀胱癌化学発癌モデルにおいて、ABH8 TG

マウスでは膀胱重量の有意な増加と癌細胞の筋層浸潤の亢進が見られた。これらのことから、ABH8は膀胱癌形成・悪性を促進する因子であることが明らかとなり、*in vivo*においてもRNAエピジェネティクスが癌において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。ABH8ノックダウンUM-UC-2細胞ではアポトーシスが誘導されるが、その作用はセレノプロテインであるTXNRD1、2の発現抑制を介したROSの産生亢進である可能性が示唆された。ABH8はtRNAアンチコドンループ上のuridineの修飾を担う酵素として知られている。この部分の修飾はコドン-アンチコドン間対合の精度を向上させ、タンパク質翻訳の効率や精度に重要であることが示されている。ABH8はtRNAの修飾を介し、セレノプロテインの1種であるTXNRDファミリー分子の発現を翻訳レベルで調節することで活性酸素種(ROS)の産生を制御しており、この機構が膀胱癌細胞の生存に影響を与えている可能性が示された。これにより、RNAエピジェネティクスが癌において果たす生理的意義の一端が示された。

以上の結果より、RNAエピジェネティクスは正常細胞とともに癌においても重要な役割を果たしていることが示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 塩 郁 幹)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 辻川和丈
	副 査	教授 八木清仁
	副 査	教授 藤尾 慈
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究では、RNAの後天的修飾による遺伝子の翻訳制御であるRNAエピジェネティクス解析法を構築し、正常組織や癌と関係性を世界で最初に調べたことを目的とした。さらに新規にクローニングしたAlkB homolog 8 (ABH8) の膀胱癌における発現と、膀胱癌細胞における機能解明も目指した。その結果、以下に示す結論を得た。</p>		
<ol style="list-style-type: none"> 1) ヒト正常組織由来total RNAに含まれるRNA修飾ヌクレオシドの種類、含有量は組織ごとに様々である。 2) ヒト正常腎臓由来large RNA (約200塩基以上) とsmall RNA (約200塩基以下) に含まれる修飾ヌクレオシドを比較すると、small RNA分画の方が修飾ヌクレオシドの含有量が高く、mcm5Uのようにsmall RNA分画のみでしか検出されない修飾ヌクレオシドも認めた。 3) 腎癌臨床検体由来large RNA分画では非癌部と比較して癌部において3-meC、5-meC、7-meG、I、Me2、2G、m5Um、1-meIの含有量の増加を認めた。 4) 腎癌臨床検体由来small RNA分画では非癌部と比較して癌部において3-meC、5-meC、N1-meA、N6-meA、N1-meG、N2-meG、7-meG、5-meU、I、Y、Me2、2G、ac4C、m5Um、t6A、1-meI、mcm5Uの含有量の低下とAmの含有量の増加を認めた。 5) 新規AlkB homologueファミリー分子ABH8は膀胱癌で高発現しており、in vivoにおいてABH8の高発現は膀胱癌の増殖および浸潤を促進させた。 6) In vitroにおいてABH8をノックダウンした膀胱癌細胞株において細胞増殖抑制およびアポトーシスが誘導された。 7) ABH8をノックダウンした膀胱癌細胞株においてタンパク質の新規合成能が低下しており、SILAC-質量分析法とgene arrayの組み合わせにより、ABH8が翻訳レベルでその発現を制御している遺伝子としてTXNRD1を同定した。 8) ABH8をノックダウンした膀胱癌細胞株においてTXNRD1、TXNRD 2の減少と活性酸素種の産生亢進を確認した。 		
<p>以上、本論文はRNAエピジェネティクスの研究に新たな展開をもたらすとともに、RNAエピジェネティクス制御分子であるABH8が膀胱癌の新規治療標的分子となることを示すものであり、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。</p>		