

Title	癌細胞におけるAlkB homolog3(ALKBH3)によるRNAメチル化修飾制御の意義
Author(s)	上田, 裕子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72184
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (上田 裕子)

論文題名

癌細胞におけるAlkB homolog3(ALKBH3)によるRNAメチル化修飾制御の意義

我々はこれまでに、前立腺癌の治療標的分子として2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenaseドメインを有するDNA/RNA 脱メチル化酵素prostate cancer antigen-1(PCA-1)を同定し、前立腺癌細胞株を用いた*in vitro*, *in vivo*解析において、PCA-1の発現抑制が癌細胞の増殖抑制作用を示すことを報告している。PCA-1は、大腸菌のAlkBと高い類似性を示すヒトALKBHファミリーに属するタンパク質であり、現在ALKBH3と呼ばれている。

本研究では、ALKBH3が、前立腺癌のみならず他の癌種においても高発現しているか検討を行った。正常膀胱、膀胱上皮内腫瘍(以下PanIN)および膀胱癌の臨床検体について、抗ALKBH3の抗体で免疫組織化学染色を行ったところ、ALKBH3は、正常膀胱、PanIN のグレード1では、陽性率が低い一方で、PanINのグレード2、3および膀胱癌と悪性化に伴いALKBH3の陽性率が高くなることを見出した。さらに、膀胱癌術後検体116例について、免疫組織化学染色を行い、ALKBH3の陽性率20%以上をALKBH3低発現群、陽性率50%以上を高発現群として術後の予後を比較したところ、ALKBH3高発現群で術後の予後が有意に低下していた。膀胱癌細胞株PANC-1を用いた*in vitro*, *in vivo*解析において、ALKBH3の発現抑制が癌細胞の増殖抑制作用、並びに抗腫瘍作用を示し、膀胱癌においてALKBH3が腫瘍促進的に機能していることを明らかにした。

ところで、RNAは転写後に様々な修飾を受けることが知られおり、100種類を超える多様な修飾が存在する。これらRNA修飾は、transfer RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA), ribosomal RNA (rRNA)をはじめとする様々なRNAに存在し、それぞれのRNAが細胞内で適切に機能する上で非常に重要であると考えられている。

近年、修飾塩基に対する抗体の開発と次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析の進歩により、RNA修飾塩基の局在や機能が徐々に明らかとなってきた。最も解析が行われているm6Aは、mRNAにランダムに存在するのではなく、3'非翻訳領域 (3'-untranslated region : 3'-UTR)やストップコドン周辺に集中して存在することが明らかとなった。さらに、m6Aは、メチル化酵素METTL3, METTL14, WTAP、脱メチル化酵素obesity-associated protein (FTO), AlkB homolog 5 (ALKBH5)により可逆的にメチル化が制御されることが明らかとなった。またm6Aを認識しその機能を果たす分子としてYTHDF1-3が同定された。これら認識分子は、m6Aを目印としてYTHDF1, YTHDF3はmRNAの翻訳促進に、YTHDF2はmRNAの分解に寄与している。m6Aの制御分子機構が明らかとなる中で、m6A修飾が幹細胞の分化、概日リズムの調節、癌を含む疾患と関連があることがわかってきた。このように、遺伝子発現がRNA修飾変化により制御される機構は「エピトランスクリプトミクス」という新たな概念として提唱され始めている。しかしながら、多くのRNA修飾の生物学的意義やその制御分子機構さらには疾患との関連性について十分に明らかとなっていない。

一方、ALKBH3は、メチル化剤により誘導されたRNAのm1A, m3Cも脱メチル化しRNA損傷修復酵素として機能することが知られおり、新たなエピトランスクリプトミクス制御分子として機能することが推測された。そこで、本研究では、ALKBH3によるRNA脱メチル化制御基質の同定を試みた。カイコを宿主としてALKBH3のリコンビナントタンパク質の合成を行い、作製したリコンビナントALKBH3とPANC-1細胞株由来total RNAを反応させ、ヌクレオシド分解したのち、質量分析計で22種類のRNA修飾塩基の測定を行った。その結果、ALKBH3は、2-OG, Fe(II)存在下において、m1A, m3Cを脱メチル化する一方、DNAにおいてその存在がよく知られるm5Cは脱メチル化しなかった。さらに、ALKBH3がどのようなRNA種由来の修飾塩基を基質とするのか、tRNA, mRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNAの6種類のRNA画分をもちいて検討を行った。その結果、脱メチル化作用に強弱はあるものの、すべてのRNA画分において、ALKBH3はm1Aとm3Cを脱メチル化し、tRNAについては、m6Aも脱メチル化することが明らかとなった。m6Aは、mRNAに最も多く存在し、ALKBHファミリー分子に属するALKBH5, FTOで脱メチル化されることが知られている。そのため、ALKBH3と

ALKBH3のm6Aに対する脱メチル化作用について比較したところ、ALKBH3がtRNAのm6Aを脱メチル化するのに対して、ALKBH5はmRNAのm6Aを脱メチル化し、両者のRNAに対する指向性が異なることが明らかとなった。これらの結果より、ALKBH3はRNA種の中でとりわけtRNAの脱メチル化制御に重要であることが示唆された。

tRNAには、m1A、m3Cのみならず多種多様な修飾が存在する。またtRNAには、アンチコドンが共通で骨格配列の異なるtRNA遺伝子(tRNA isodecoder)が存在し、その数は約600にも上る。近年のシーケンス技術の進歩により、これらtRNA isodecoderごとの転写後修飾に関する情報がデータベースに蓄積されつつある。ALKBH3がどのような種類のtRNA isodecoderの、どの位置の修飾を制御するのか抗m1A抗体と次世代シーケンサーを用いて同定を行った。その結果、101種のtRNA isodecoderにおいて、A58のm1AがALKBH3により脱メチル化制御される可能性が示された。

本研究により、膵癌においてALKBH3が腫瘍促進的に機能することを示し、ALKBH3が生理的にメチル化されたRNAに対する脱メチル化酵素として機能し、特にtRNAの脱メチル化制御に深く関わっていることが明らかとなった。そこで、ALKBH3が、tRNAの脱メチル化制御を介して、癌細胞の生存にどのように寄与しているか検討を行うこととした。癌細胞は、タンパク質合成を包括的に制御、あるいは癌細胞の生存に有利となるようなmRNAの翻訳を選択的に制御することが近年明らかにされつつあり、タンパク質の翻訳制御は、癌進展において重要な要素の一つとされる。そこで、癌細胞においてALKBH3がtRNAの脱メチル化制御を介したタンパク質の翻訳制御に関与する可能性を検討した。*in vitro*翻訳効率評価系において、ALKBH3で脱メチル化させたtRNAでは、脱メチル化させていないtRNAを添加した場合と比べて、ルシフェラーゼ活性が有意に上昇しており、ALKBH3がtRNAの脱メチル化を介してタンパク質の翻訳効率を上昇させる可能性が示された。細胞レベルでの検討では、膵癌細胞株PANC-1において、ALKBH3を発現抑制すると、主としてtRNAを含むsmall RNAのm1Aの蓄積と新規タンパク質合成能の低下が認められた。

tRNAの修飾の役割の一つにtRNA構造の安定性への寄与が挙げられる。通常tRNAは、細胞内で正確な立体構造を形成することで安定化し、この立体構造に変化が生じるとRNA分解酵素により分解されると考えられている。そこで、ALKBH3によるtRNAの脱メチル化制御がtRNAの安定性に寄与しているのではないかと考え、ALKBH3発現抑制時のアンチコドン別のtRNAの発現解析を行った。その結果、コントロールと比べて、ALKBH3発現抑制により、検出された50種のtRNAのうち、発現低下していたtRNAは16種であり、そのうち14種類がALKBH3で脱メチル化されるm1Aを含むtRNAであった。この結果により、ALKBH3による脱メチル化制御の破綻が、基質となるtRNAの安定性を変化させ、tRNAの分解を惹起し、発現量低下の一因となった可能性が示された。

さらに、ALKBH3の発現抑制により、どのようなタンパク質の合成が影響を受けるのかを網羅的遺伝子発現解析とタンパク質発現解析により検討を行った。PANC-1細胞株において、ALKBH3発現抑制により、タンパク質の発現量がコントロールに比べて有意に低下しており、かつmRNAの発現変化がないものが20種類存在し、その中には、翻訳の場となるリボソームを構成するタンパク質、プロテアソームを構成するタンパク質が含まれており、これらは、特に翻訳過程においてALKBH3による制御を受けると考えられた。

本研究では、難治性の癌である膵癌臨床検体においてALKBH3が高発現していることを示し、ヒト膵癌細胞株を用いた解析から、ALKBH3が膵癌の病態に促進的に機能していることを示唆した。さらに、これまでメチル化剤により誘導されたメチル化RNAの脱メチル化酵素として知られていたALKBH3が、生理的にメチル化されたRNAも基質として特異的に脱メチル化活性を有することも認めた。さらにtRNAの脱メチル化に着目し、膵癌細胞株を用いた解析により、ALKBH3の発現抑制が、tRNAの脱メチル化制御を介してタンパク質翻訳制御していることを明らかにした。これらの研究結果はALKBH3の高発現がエピトランスクリプトミックスのかく乱を介して膵癌の発症や悪性化に関わる新しい機序を示すものである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (上田 裕子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 辻川 和丈
	副 査	特任教授 八木 清仁
	副 査	教授 藤尾 慈
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>膵癌は現在最も難治性の癌であり、その5年相対生存率は10%に満たない。よって膵癌の発症・悪性化機序の解明に基づく革新的治療創薬が切望されている。本研究では前立腺癌術後組織の癌部で高発現する遺伝子として発見されたAlkB homolog 3 (ALKBH3)が膵癌においても高発現していることの発見に基づき、その分子機能の解明へと展開させた。その結果以下の知見を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ALKBH3は、膵癌臨床検体において高発現しており、術後予後不良と高い相関性を示した。 2. 膵癌細胞株PANC-1を用いたin vitroおよびin vivo解析において、ALKBH3の発現抑制が癌細胞の増殖抑制作用ならびに腫瘍退縮作用を示した。 3. ALKBH3は、膵癌細胞株PANC-1由来のtRNA, 5S rRNA, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNAおよびmRNAにおいて2-oxoglutarate, Fe(II)依存的に1-methyladenine (m1A), 3-methylcytosine (m3C)を脱メチル化し、tRNAについてはN⁶-methyladenine (m6A)も脱メチル化した。 4. ALKBH3は、特定のtRNAの58位のm1Aを脱メチル化した。 5. In vitro翻訳系において、ALKBH3で脱メチル化したtRNAは翻訳効率を上昇させた。 6. ALKBH3を発現抑制した膵癌細胞株PANC-1では、m1Aの増加と新規タンパク質合成能の低下が認められた。その際、アンチコドン別tRNAの発現量が低下していた。 7. ALKBH3を発現抑制した膵癌細胞株PANC-1では、リボソームおよびプロテアソームを構成するタンパク質が翻訳レベルで発現低下していた。 <p>このように本研究は、生命科学領域においてエピトランスクリプトミクスという新たな概念の展開に大きな成果をもたらし、さらにALKBH3の分子機能解明から膵癌の革新的な治療薬の創製に繋がることを示した。よって、博士(薬学)の学位論文に値すると認める。</p>		