

転移 RNA メチル化とがん転移の分子基盤研究

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

富田 耕造

1. はじめに

BCDIN3D蛋白質はメチル基転移ドメインを有する蛋白質であり、乳癌細胞において発現が向上しており、癌転移にも関与していることが報告されてきた (Liu *et al.*, 2007)。また、BCDIN3Dの発現向上と乳癌予後不良との関連性も報告されてきている (Yao *et al.*, 2016)。

数年前この酵素が特定のがん抑制miRNAの前駆体 (pre-miR145など) の5'-リン酸基をジメチル化する活性を有することが報告された。5'-リン酸基のジメチル化によって、前駆体miRNAは*in vitro*においてDicerによるプロセッシングが抑制され、結果として、成熟miR-145の発現が抑制されることが報告された。また、乳癌細胞においてBCDIN3DをshRNAでノックダウンすることにより、乳癌細胞の浸潤性が抑制されることも報告された。

これらのことからBCDIN3D蛋白質ががん抑制miRNAの前駆体をメチル化することによって、成熟がん抑制miRNAの発現を抑制し、その結果、乳癌の発生、癌転移が引き起こされる可能性が示唆された (Xhemalce *et al.*, 2012)。

本研究課題では、メチル基転移酵素BCDIN3D蛋白質による基質RNAの特異的認識機構、RNAメチル化の制御機構を明らかにすることを目指した。

2. 方法

まず、私たちはSBPタグ付きのBCDIN3Dを恒常的に発現するHEK293細胞を樹立した。BCDIN3Dの免疫沈降実験によりBCDIN3Dと相互作用する (共精製されてくる) 蛋白質、RNAの解析を行ったところ、BCDIN3Dに70~80ntの長さのRNAが特異的に強く結合していることを見出した。

30年ほど前に、ヒトおよびハエの細胞質tRNA^{His}の配列が報告されており、tRNA^{His}の5'-リン酸基がモノメチル化されていることが報告されていた。そこで、tRNA^{His}特異的なプライマーを用いてRT-PCRをおこなったところ、tRNA^{His}がBCDIN3Dに結合していることが明らかになった。さらにそのRNAの質量分析から、確かにtRNA^{His}がBCDIN3Dに結合していることを確認した。また、5'-末端のリン酸基がモノメチル化されていることが明らかになった。

これらの結果から、私たちは、BCDIN3Dは細胞質tRNA^{His}を基質として、その5'-末端のリン酸基をメチル化する活性を有するのではと考えた。

大腸菌で発現して、高度に精製した組換えBCDIN3Dを用いた*in vitro*のtRNA^{His}転写産物のメチル化反応を行ったところ、BCDIN3Dはpre-miR145転写産物よりも100倍以上も効率よくtRNA^{His}転写産物の5'-リン酸基をメチル化することも見出した。さらに、反応産物の質量分析から、BCDIN3DはtRNA^{His}転写物の5'-リン酸基をモノメチル化し、ジメチル化はできないことも明らかになった。

CRISPR/Cas9システムを用いて、BCDIN3D遺伝子破壊細胞を2ライン樹立した。作製したBCDIN3D遺伝子破壊細胞では、tRNA^{His}の5'-末端のリン酸基のメチル基が完全に欠損していることも明らかにした。さらに、BCDIN3Dをこれらの遺伝子破壊株で発現させると、この修飾が復活することも明らかにした。なお、BCDIN3D遺伝子破壊細胞では、がん抑制miRNAであるmiR145の発現が亢進されていないことを確認した。

BCDIN3Dは細胞質に局在することから、BCDIN3Dの (本来の) 基質はtRNA^{His}である可能性が強く示唆され、tRNA^{His}の5'-リン酸基をメチル化が、乳癌発生の転移性と相関があると推測するに至った。本研究課題ではこれらの申請者らの研究結果に基づき、さらにBCDIN3DによるtRNA^{His}の特異的認識機構の解明を生化学的、および構造生物学的手法を用いて解析した。

3. 結果

細胞質 tRNA^{His} は他の tRNA 種と比較した時に、ユニークな特徴を有している。tRNA^{His} は前駆体 tRNA からプロセスされた後、その 5' 末端に tRNA^{His} 特異的なグアニン転移酵素 (tRNA^{His} Guanylyltransferase:) によって、3' から 5' の方向にグアノシンが付加される (G-1) (Gu *et al.*, 2003)。結果、通常の tRNA はアクセプターステムの長さが 7ヌクレオチド(nt)であるが、tRNA^{His}のみ 8nt の長さをもつ。また、アクセプターステムの上部は G-1:A73 とミスペアが存在する。tRNA^{His} 転写産物変異体を用いたメチル化の反応速度解析から、BCDIN3D は tRNA^{His} の G-1、G-1:A73 ミスペア、8nt アクセプターステム、3' -CCA を認識することが明らかになった。また、アンチコドン領域はメチル化に影響を与えないことも明らかになった。したがって、BCDIN3D は tRNA^{His} のみにみられる特徴を認識していることが示唆された。

4. 考察

tRNA は mRNA の遺伝暗号とアミノ酸を結び付けるアダプター分子としても役割の他に、シトクロム C と結合することによって、カスパーゼ活性化を抑制し、細胞死を抑制することが最近報告された (Mei *et al.*, 2010)。また、ごく最近、ストレスに応答して生じる tRNA の断片 (tRF) が遺伝子発現制御に関わっていることや、tRNA の修飾が tRF の生合成や siRNA 生合成経路制御に関わっていることなどが報告されてきており、高次生命現象発現と tRNA の新規機能が密接に関わっていることが認識されつつある (Keam & Hutvagner, 2015)。

tRNA には通常の RNA と比べて修飾されたヌクレオチドを多く含む。最近では、tRNA のアンチコドンの 3' 側の塩基のメチル基が欠損すると、ストレスに応答してその tRNA が切断され、生じた tRF が Ago へ集積されるとともに、RNAi 経路に影響を及ぼすことも酵母を用いた実験系で報告されている (Durdevic *et al.*, 2013)。また、乳ガン細胞では、特定の tRNA から生成される tRF が、原ガン遺伝子 mRNA 安定性を上昇させる特定の RNA 結合蛋白質と競合して結合することにより、ガン転移が起きにくくなっていることも報告されている (Goodarzi *et al.*, 2015)。ごく最近には、乳ガンや前立腺ガン細胞などの一部で、tRNA^{His} がアンチコドンで切断されていることが報告された (Honda *et al.*, 2015)。

もしかすると、tRNA^{His} の 5' -末端リン酸基のメチル化によって、tRNA^{His} に由来する tRF 生成が制御され、未知の経路でガン遺伝子、ガン転移関連遺伝子発現制御に関わっているのかもしれない。

古典的な non-coding RNA である tRNA の知られざる機能を発掘する可能性を秘めていると期待している。また、BCDIN3D に結合する低分子 RNA が他にもあり、それらの 5' -末端リン酸基がメチル化されることにより、その低分子 RNA の関与する生体内遺伝子発現が制御されているのかもしれない。本研究は、ガン発生、転移と tRNA のメチル化の相関の可能性の分子基盤解明でなく、新たな tRNA の機能、遺伝子発現制御機構を発掘する可能性を秘めた基盤研究であり、また、将来のガンなどに対する診断、薬剤開発の基盤となる研究でもある。

5. 発表論文

学会発表:

Kozo Tomita

Methylation of 5' -phosphate of cytoplasmic tRNA^{His} in human
26th tRNA Conference (2016 9.4-8, Jeju, Korea) Invited

Anna Martinez & **Kozo Tomita**

Recognition of tRNA^{His} by tRNA^{His} specific methyltransferase, ThMTase
26th tRNA Conference (2016 9.4-8, Jeju, Korea)