

RNA 代謝機構が関与する病態の分子機構解明

大分大学医学部細胞生物学講座

花田 俊勝

【目的と背景】

哺乳類における高次システムは非常に複雑な制御を受けており、これらの破綻が様々な病態に関与すると考えられている。Messenger RNA(mRNA)、transfer RNA(tRNA)、ribosomal RNA(rRNA)と、さらに最近新たに見出された機能性small RNAの代謝機構は様々なストレス環境に応じて高度に調節され、遺伝子発現、タンパク質の生合成調節に関与している。近年、RNAの代謝調節に関与する分子が神経変性疾患や発癌等の疾患に関与しているという報告が相次いでおり、新たな病態機構の解明と治療への応用が期待される。しかしながら、それらの分子がどのような機構によって様々な病態の発症につながるのかほとんど解明されていない。申請者らは、2007年に哺乳類で初めてRNAキナーゼとして報告されたCLP1に着目し¹⁾、独自の遺伝子改変マウスを作成して機能解析を進めてきた。CLP1はtRNA前駆体スプライシング酵素複合体中で分子間をつなぐアダプターの役割を持ち、そのキナーゼ活性はtRNA前駆体の成熟化と異常なpre-tRNA断片の排除に重要であることが判明した。さらに興味深いことにCLP1キナーゼ活性欠損ノックインマウスは進行性の運動ニューロン病を呈し、その原因は異常なtRNA断片 (tRNA fragments: tRF) の蓄積による運動ニューロン細胞へのストレスであることが判明し、新たな病態機構の可能性を提唱した(図1)²⁾。一方、CLP1と同様にRNAキナーゼ活性を持つNucleolar protein 9 (NOL9)は核小体に局在しrRNAの成熟化機構に重要であることが示唆されており³⁾、実際に申請者らがNOL9遺伝子欠損胎児繊維芽細胞(MEF)を用いてrRNA前駆体の成熟化を検討したところ、プロセシングの遅延とリボソーム大サブユニットを構成する28Sと5.8Sの成熟rRNAの減少を認めた。しかしながら、その分子機構におけるキナーゼ活性の意義については不明である。本研究において、これらのRNAキナーゼ分子の生体内機能を詳細に検討して、その機能破綻による疾患との関連を解明し、治療創薬につながる研究を目指す。

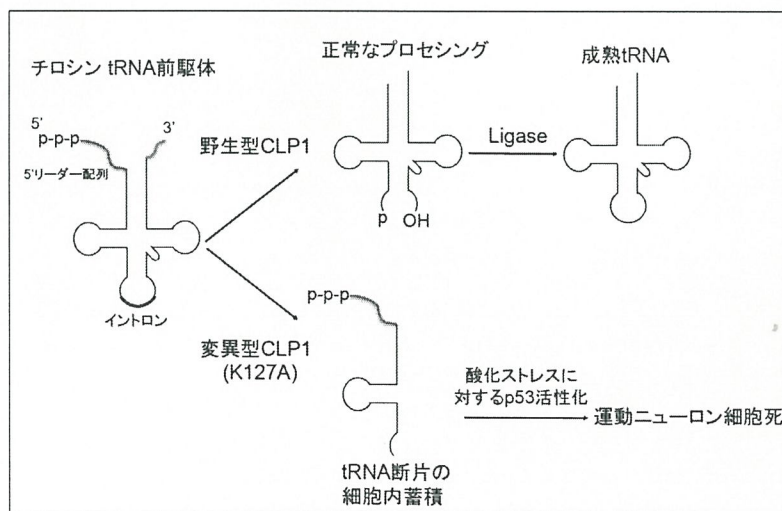


図1. CLP1はtRNA前駆体スプライシング酵素複合体の一構成要素であり、そのキナーゼ活性はtRNA前駆体の成熟化機構に重要である。キナーゼ活性を欠失した変異型CLP1(K127A)細胞では、tRNA前駆体のプロセシングにおいて5' exonを含むtRNA前駆体断片(特にTyrosine tRNA前駆体由来)の細胞内蓄積が生じる。これにより、酸化ストレスの際のp53活性化が増強され、運動ニューロン細胞死が誘導される。

【方法】

1) *in vitro* transcription

各 tRNA 断片の合成には、ScriptMAX Thermo T7 Transcription Kit (TOYOBO) を用いた。終濃度 $1 \mu\text{g} / 20 \mu\text{l}$ となるように鋳型オリゴ DNA を反応液 (10x basal reaction buffer、5x Accelerator solution、25mM rNTPs mixture、RNase inhibitor、Thermo T7 RNA polymerase) に加え、 37°C で 2 時間インキュベートさせた。エタノール沈殿法により各 tRNA 断片を回収し、RNase free water で各 tRF を溶解させた。tRF 合成に使用した DNA テンプレートは以下の通りである。

5' tyrosine tRF: 5' -TAATACGACTCACTATAGGGGTGCTTCCCTTCGATAGCTCAGCTGGTAGAGCGGAGGACTGTAG -3'

3' tyrosine tRF: 5' - TAATACGACTCACTATAGGGATCCTTAGGTCGCTGGTTCGATTCCGGCTCGAAGGA-3'

Isoleucine intron tRF: 5' - TAATACGACTCACTATAGGGTGACAGTGCGAGCGGAGCA -3'

2) トランスフェクション

CRISPER / Cas9 システムによる細胞株のゲノム編集には、NEPAGENE を用いた。SH-SY5Y ヒト神経芽細胞株 (〜80%コンフルエント) を PBS で洗浄後、0.2% トリプシン / 0.02% EDTA を添加し、細胞を剥がし

た。血清入りの培地を添加後、15 ml のコンカルチューブに細胞を移し、1,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、Opti-MEM 培地を加えて懸濁後、遠心した。ペレットを Opti-MEM 培地に再懸濁した後、セルカウントを行った。再度遠心し上清を除いた後、細胞濃度が 1.0×10^6 cell / 100 μ l になるように、Opti-MEM 培地を加えた。100 μ l の細胞懸濁液に 10 μ g のプラスミド DNA を添加し、キューベツト (2mmgap) の中に細胞懸濁液を入れ、NEPAGENE を用いてトランスフェクションを行った (Poring Pulse : 電圧 175 V、パルス幅 2.5 ms、パルス間隔 50 ms、Transfer Pulse : 電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms)。トランスフェクションした細胞を 6 ウェルプレートに移し、24 時間後に 2 μ g / ml の濃度のピューロマイシンで、2 日間セクションを行った。

tRNA 断片の細胞へのトランスフェクションには、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher) を用いた。Opti-MEM 培地に Lipofectamine RNAiMAX Reagent と各 tRF (終濃度 25 pmol / μ l) を混合し、室温で 5 分間インキュベートした。6 ウェルプレートに 1.0×10^5 cell の SH-SY5Y を播種し、24 時間培養させ、各 tRNA 断片の混合液を 1 ウェル当たり 250 μ l 添加した。

3) SILAC 法を用いた tRNA 断片結合タンパク質の同定

12C6 または、13C6 L-リジンと L-アルギニンを含む培地で培養した SH-SY5Y を破碎し (12C6 または 13C6 タンパク質破碎液を、それぞれ、light 破碎液、heavy 破碎液とする)、タンパク質濃度を 60 μ g / μ l に調製した。終濃度 1 μ g / 100 μ l となるように Tyrosine tRNA 3' 側断片と Tyrosine tRNA 5' 側断片をそれぞれ light 破碎液と heavy 破碎液に添加し、プロナーゼ (Roche) で消化した。それぞれの液を等量ずつ混合し、15% SDS-PAGE によって分離した。銀染色 MS キット (Wako) を用いて、タンパク質断片を検出し、バンドを切り出した。切り出したタンパク質断片は、還元アルキル化及びトリブシン消化して、Nano LC/MS/MS により分析を行った。軽いアミノ酸及び重いアミノ酸でラベルされたペプチドは、化学的に同一であるので、逆相クロマトグラフィーにおいて同時に溶出され、同時に MS 分析される。得られた MS スペクトルにおける、軽いおよび重いタンパク質に由来するペプチドのピーク強度の比率から、実験サンプル中のタンパク質の発現量の変化を検出することができる。

4) NOL9 遺伝子改変マウスの作成

NOL9 遺伝子の exon4,5,6 を loxP 配列で挟み、Cre リコンビナーゼにより DNA 欠失が生じるように設計したジーンターゲティング法にて作成した。この NOL9-flox マウスと MMTV-Cre とを交配し、乳腺細胞特異的 NOL9 ノックアウトマウスを作成した。

【結果】

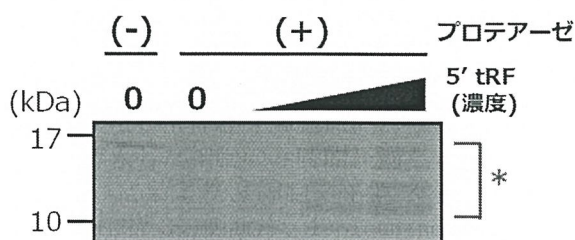
5' Tyrosine tRNA 断片は酸化ストレスを増強する

RNA キナーゼである CLP1 の活性を欠損させたマウスでは神経変性を発症するが、そのマウスの細胞内には Tyrosine tRNA 5' 側断片が主に蓄積しており、また酸化ストレスに対して p53 の活性化 (マウス p53-Ser18 のリン酸化) が増強していた。トルコで発見されたヒト CLP1 変異の家系では、マウス同様に進行性の神経変性疾患である橋小脳低形成を発症していることが報告された⁴⁾。さらに細胞内には Isoleucine tRNA intron 断片が多く蓄積していた⁴⁾。一方、Schaffer らは Tyrosine tRNA 3' 側断片の細胞内蓄積が神経変性疾患を惹起する主な原因であると提唱した⁵⁾。これらの報告から実際に tRNA 断片自体が p53 を活性化するか、どの tRNA 分子が最も病態に関与するかを検証するため、マウス線維芽細胞に tRNA 断片を導入して酸化ストレス刺激を行いウエスタンブロット法で検討した。その結果、Tyrosine tRNA 5' 側断片が酸化ストレスに対して p53 の活性化を増強していた。ヒト神経芽細胞株 SH-SY5Y においても同様の実験を行ったところ、やはり Tyrosine tRNA 5' 側断片が p53 の活性化を増強していた。さらに tRNA 断片を導入したヒト神経芽細胞株に、レチノイン酸で神経細胞の分化誘導をかけたところ、Tyrosine tRNA 5' 側断片を導入した細胞のみ時間経過とともに有意に細胞数が減少した。

これらの結果より、細胞ストレスを惹起する可能性が報告されていた Tyrosine tRNA 5' 側断片、Tyrosine tRNA 3' 側断片、Isoleucine tRNA intron 断片のうち、実際に p53 の活性化を増強し細胞死に影響を及ぼす tRNA 断片は Tyrosine tRNA 5' 側断片であることが判明した。

5' Tyrosine tRNA 断片に結合する分子の同定

次に、Tyrosine tRNA 5' 側断片がどのような分子メカニズムによって細胞ストレスを増強するのかを明らかにするため、プロテアーゼプロテクションアッセイ法を応用した解析を行った。この手法は、タンパクが化合物と結合すると構造が変化するため、タンパク分解酵素による分解能に変化が生じることを利用して化合物が直接結合するタンパクを同定する手法である。本手法を用い、チロシン tRNA 5' 側断片とヒト神経芽細胞溶液を混合したものにプロナーゼを加えたものを SDS page で電気泳動し、直接結合するタンパク群を探索した結果、チロシン tRNA 5' 側断片に特異的なバンドを認めたため (図 2)、同部位のプロ



テオーム解析を施行した。今後はプロテオーム解析で検出されたタンパク質の解析を行い、p53 との関連性について検討を進めていく。

図 2. 5' Tyrosine tRNA 断片を用いたプロテアーゼプロテクションアッセイ

NOL9 の生体内機能についての解析

乳腺細胞における部位特異的 NOL9 ノックアウト

トマウスを樹立した。乳腺特異的 NOL9 マウスの Medroxyprogesterone acetate(MPA) と dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)を用いたマウス乳癌モデルにおいても、乳癌の増悪傾向を示した。よって、NOL9 は癌抑制遺伝子である可能性が新たに示された。現在、その分子メカニズムを明らかにするため解析を進めている。NOL9 キナーゼ活性欠損マウスの作製を試みた。NOL9 のキナーゼ活性部位は exon5 に存在するため、exon5 に変異を入れるべく exon4 と exon5 の間に neo 遺伝子および loxP 配列をジーンターゲティング法により導入し、キメラマウスを作製した。しかしながら、その後 neo 遺伝子と loxP 配列が挿入されたゲノム部位が NOL9 mRNA のスプライシングに重要な配列を含んでいたと思われ、ノックインではなくノックアウト状態になりホモ接合体の個体が得られないことが判明した。そこで、新たにターゲティングベクターを作製し直して neo 遺伝子および loxP 配列を exon3 と exon4 の間に挿入した。最終的に NOL9 キナーゼ活性欠損マウスの作製に成功し、現在 C57BL/6J の遺伝子バックグラウンドへの戻し交配と並行して解析を進めている。

【考察】

tRNA代謝異常に伴う神経変性疾患の原因として、tRNA断片の細胞内蓄積を報告したが、細胞ストレスを惹起する可能性のあるtRNA断片種として3種類のRNAが報告されていた。本研究では、そのうちのどのRNA種が最も細胞毒性を示すのか、細胞に導入しp53の活性化と細胞増殖抑制作用を調べた。その結果より、Tyrosine tRNA 5' 側断片が最も細胞ストレスを惹起し、神経変性疾患の原因と考えられることが判明した。さらに、Tyrosine tRNA 5' 側断片が細胞ストレスを惹起する分子メカニズムを解明するため、プロテアーゼプロテクションアッセイを行い、Tyrosine tRNA 5' 側断片に結合するタンパク質の同定を行なっている。CLP1と同様、RNAキナーゼ活性を持つNOL9分子については、その生体内機能を解明するため、遺伝子改変マウスを樹立し、解析を行なっている。乳腺細胞特異的NOL9遺伝子欠損マウスを用いた乳癌モデルでは、病態の増悪傾向を示し、NOL9が癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。また、さらにNOL9のキナーゼ活性が生体内でどのような役割を持つのか明らかにするため、NOL9キナーゼ活性欠損ノックインマウスの作製に着手し、本研究において樹立した。

近年、miRNAやlncRNA などタンパク質をコードしない様々なRNAの発見とその機能が注目されている。tRNAにおいても、次世代シーケンサーの発達により生体内にはtRNAから切り出された小RNAが大量に存在していることが認められており、その役割についてまだ不明な点が多い。tiRNAは酸化ストレスによりRNase活性を持つangiogeninが活性化しtRNAを切断することにより生じるRNA断片である。これは、タンパク質翻訳を負に制御することにより細胞をストレスから防御する機構であると報告されている⁶⁾。また最近では、精液内に含まれるtRNA断片が受精の際に卵子に対してエピジェネティックな作用により遺伝子発現に影響を与える等⁷⁾、様々な報告が相次いでいる。Tyrosine tRNA 5' 側断片も酸化ストレスにより細胞内に蓄積し、細胞死を誘導する作用があり、細胞ストレス機構の一端を担っている可能性があると思われる。

本研究では、3種のtRNA断片のうち最も細胞ストレスを惹起するRNA種を同定するとともに、in vivoにおいても神経変性等の病態の原因となることをマウスモデルにより証明する計画であった。当初、tRNA断片を過剰発現させたトランスジェニックの作製を試みたが、tRNA断片を高発現し有意に表現型を示すマウスが得られなかった。tRNAを高発現させたマウス胎児は、母体内での発生段階において早期に死亡してしまった可能性が考えられた。マウスモデルでは、発生段階を詳細に解析することが困難であるため、生体が透明であり卵ふ化後より発生段階が容易に追跡できる小型魚類モデルを立ち上げ、準備を進めている。本モデルにより、Tyrosine tRNA 5' 側断片が真の神経変性の原因であることを証明するとともに、他のRNA代謝異常が原因となりうる疾患のモデルを作製し、これらの疾患の全容解明を目指したい。

【謝辞】

本研究は、九州大学生体防御医学研究所松本雅記博士、石谷太博士との共同研究により行ないました。御助成頂いたアステラス病態代謝研究会には心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) Weitzer S and Martinez J. Nature, 447:222-226 (2007)
- 2) Hanada T, Weitzer S, Mair B *et al.* Nature, 495:474-480 (2013)
- 3) Heindle K and Martinez J. EMBO J., 29:4161-4171 (2010)
- 4) Karaca E, Weitzer S, Pehlivan D *et al.* Cell, 157:636-650 (2014)
- 5) Schaffer AE, Eggens VR, Caglayan AO *et al.* Cell, 157: 651-663 (2014)
- 6) Yamasaki S, Ivanov P, Hu GF *et al.* J. Cell. Biol., 185:35-42 (2009)
- 7) Sharma U, Conine CC, Shea JM *et al.* Science, 351:391-396 (2016)