

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年 9月 30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 東京医科歯科大学

住 所 東京都文京区湯島 1-5-45

研究者氏名 栗本 遼太

(研究課題)

新規 mRNA 修飾による悪性腫瘍の浸潤・転移能制御の解明とその創薬基盤の確立

令和5年 1月23日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究報告】

【背景】

RNA の修飾は、真核細胞においては 130 を超える種類が存在し、tRNA の成熟生成を通して生命の根幹をなしている。mRNA 内にもこれら RNA 修飾が多数存在し、悪性腫瘍の病態に深く関与していることが報告されて来ているものの、その全貌は未だ不明である。申請者は、tRNA の修飾シュードウリジン化を担う酵素の一つである TruB1 が、tRNA だけではなく microRNA や mRNA にも結合して機能していることを報告した (Kurimoto, et al. *EMBO J.* 2020)。これら tRNA 修飾酵素及び RNA 修飾のさらなる解明のため、tRNA 修飾を担う酵素複数の遺伝子について RNA-タンパク質結合の包括的な解析である CLIP スクリーニング解析を実施したところ、メチル化 GTP の一つを形成する酵素 (仮称 tRBPU) についてその結合が強く認められた。興味深いことに、この tRBPU は、上皮間葉転換 (EMT) を誘導する遺伝子の coding sequence 領域に高頻度に結合していた。そこで肺がん細胞において tRBPU を RNA 干渉を用いてノックダウンしたところ、顕著に EMT が誘導され、in vitro 及び in vivo において共に顕著な浸潤能の亢進、転移能の亢進が認められた。さらに、公共データベースを用いて single cell RNA シークエンス解析を行ったところ、EMT 形質を有する肺がん細胞において tRBPU の発現が低い傾向が見られた。また、tRBPU の酵素活性型変異を用いて検証したところ、この傾向は tRBPU の酵素活性依存的であることが明らかとなった。そこで、本研究課題においては、tRBPU の標的遺伝子と、RNA 修飾が果たす役割を網羅的に明らかにするとともに、tRBPU を標的とした RNA 修飾制御を通じた新しい創薬基盤を確立することを目的とする。

【結果】

1). tRBPU の標的遺伝子の解明と RNA 修飾が及ぼす機能の解明

tRBPU は、細胞質内に局在し、酵素活性依存的に EMT 形質を抑制していると考えられるが、その標的遺伝子及びその RNA の修飾部位の機能は未だ明らかでない。そこで、RNA 修飾が標的 mRNA へ及ぼす機能を、RNA の安定性や翻訳能へ及ぼす影響を解析することにより明らかにする。

1-①. RNA 安定性: SLAM-seq

上記核酸同位体を用いて新生 RNA を標識しシークエンス解析を行う手法を用いて、tRBPU の存在・非存在下に RNA の安定性を網羅的に評価した。SLAM-seq の結果と CLIP で同定された遺伝子との統合解析の結果から、tRBPU による明確な RNA 安定性への影響は確認されなかった。

1-②. 翻訳能: リボソームフットプリンティング

リボソームの結合した翻訳中の mRNA (Monosome) の情報と、翻訳の停滞により生じる Disome に含まれる RNA 情報を用いて翻訳能の解析を網羅的に行った。その結果、tRBPU のノックダウンによって一部の mRNA において翻訳能の亢進が認められた。CLIP との統合解析の結果、MAPK 関連遺伝子において tRBPU との結合とともに翻訳能への影響が確認された。

1-③. RNA 修飾の同定

tRBPU の担う RNA 修飾は、tRNA に存在することは報告されているものの、未だ mRNA に存在するか明らかになっていない。そこで同修飾核酸への抗体を作成するため、キャリアタンパク質の結合を行った。この他、Nanopore シークエンサーの深層学習を継続して行なっている。

2). tRBPU を標的とした RNA 修飾制御を通した創薬基盤の確立

tRBPU は高度に肺癌の EMT を制御しており、有力な創薬の標的遺伝子である。EMT の克服により、多くの癌における薬物療法抵抗性の克服、転移の抑制などの効果が期待される。そこで申請者は、nanoluciferase を構成する短鎖ペプチド (HiBIT) をゲノム編集技術によって癌細胞の tRBPU 遺伝子の C 末端へ挿入し、tRBPU のタンパク質発現を nanoluciferase によって迅速かつ定量的に検出する細胞を樹立した (HEK293 細胞、A549 細胞)。この細胞を用いて、約 1200 の化合物 (LOPAC) について治療実験を行い、tRBPU のタンパク質発現を上昇させる候補化合物を複数同定した。さらに、siRNA library を用いて、tRBPU の上流制御遺伝子の候補を探索するため、ChIPAtlas 等のデータベースから推測された 200 遺伝子について HiBIT スクリーニングを行い、複数の候補遺伝子を同定した。

【謝辞】

公益財団法人がん研究振興財団からのご支援を賜り、本研究を遂行することができました。この場をお借りして深謝いたします。