

プレス通知資料（研究成果）



国立大学法人
東京医科歯科大学
TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY

報道関係各位

2022年12月13日

国立大学法人東京医科歯科大学

「RNA結合タンパク質LIN28Aによる転写後調節を介した血管新生制御機構を解明」 — 低酸素誘導因子HIF1 α のRNA階層を介した新規制御メカニズムの発見 —

【ポイント】

- 医学・生物学において注目される LIN28A を、低酸素誘導因子 HIF1 α の発現を上昇させる RNA 結合タンパク質として発見しました。
- LIN28A が mRNA 上の「UGAU」という標的配列に直接結合して mRNA を安定化させることで HIF1 α のタンパク質の発現が上昇する新規制御メカニズムを示しました。
- LIN28A は癌の血管新生を亢進させることを明らかにしました。
- RNA 結合タンパク質による転写後調節を標的としたがんの病態解明と新規治療戦略への応用が期待されます。

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野の浅原弘嗣教授、栗本遼太講師、内田雄太郎 MDPHd コース学生ら、および、東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 心肺統御麻酔学分野の内田篤治郎教授、山本寛人講師の研究グループは、福岡大学産科婦人科学の宮田康平准教授、東京農工大学工学研究院の稲田全規准教授ら、武蔵野大学人間科学部人間科学科の五島直樹教授との共同研究で、RNA 結合タンパク質 LIN28A^{*1}が HIF1A mRNA 上の UGAU 配列への直接結合を介した mRNA の安定化により低酸素誘導因子 HIF1 α ^{*2}の発現を上昇させることで、癌の血管新生が亢進することを明らかにしました。この研究は、米国国立衛生研究所、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業(AMED-CREST、AMED-LEAP)、並びに文部科学省科学研究費補助金の支援のもとおこなわれたもので、その研究成果は、国際科学誌 Journal of Biological Chemistry に、2022年12月9日にオンライン版で発表されました。

【研究の背景】

腫瘍はストレス環境下において代謝・シグナル伝達等を変化させることで、腫瘍の生存に適するように遺伝子発現制御が変化させることが知られています。特に低酸素環境においては、低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factors: HIFs)の安定化によって腫瘍の生存に必要となる血管新生関連因子などの遺伝子発現が亢進することが、腫瘍の進展に大きく寄与すると報告されており(Semenza et al, Cell 2012)、この HIFs の発見に

よって 2019 年度のノーベル生理医学賞の受賞にまで至りました。HIFs の中でも HIF1 α は腫瘍の生存の鍵となるタンパク質として重要であり、Von-Hippel-Lindau タンパク質を介した翻訳後制御による制御機構、PI3K-Akt 経路を介した転写制御などが報告されてきました (Maxwell et al, Adv. Exp. Med. Biol. 2001)。その一方で、遺伝子発現制御の他の重要なステップとして転写後制御機構があります。転写後制御とは、microRNA や RNA 結合タンパク質といった転写後制御因子が、標的遺伝子の mRNA 上の *cis*-element^{*3} と呼ばれる配列に直接結合することで、翻訳の亢進・減衰、および mRNA の安定化・分解を介して発現制御を行うステップで、標的遺伝子の安定的な発現・細胞の恒常性維持において非常に重要な役割を果たします (Uchida et al, Journal of Biochemistry 2019)。しかしながら、HIF1A mRNA 上の *cis*-element を介した転写後制御機構は依然として解明が不十分であり、制御に重要な *cis*-element の同定とその制御因子の同定が求められていました。そこで本研究グループは、HIF1 α の発現を制御する RNA 結合タンパク質を細胞ベースでスクリーニングすることによって、HIF1 α を転写後調節により制御する RNA 結合タンパク質の同定を試みました。

【研究成果の概要】

HIF1 α の発現を転写後調節により発現を上昇させる遺伝子を探索するため、HIF1A 遺伝子の 5' UTR と 3' UTR とを搭載したルシフェラーゼレポーターを作製し、RNA 結合タンパク質 1127 種類を細胞に導入することで遺伝子スクリーニングを行いました。その結果として、HIF1 α の発現を上昇させる候補 RNA 結合タンパク質として LIN28A を同定しました。(図 1)

LIN28A は癌の抑制に重要な microRNA let-7 の分解を誘導することによって癌関連因子の発現を亢進させることが報告されています。しかし、本研究においては、let-7 の分解をすることができない LIN28A の変異体 (ZFm) を用いた解析、および let-7 の強制発現実験により、LIN28A による HIF1 α の発現上昇が let-7 の分解に依存しないこと、let-7 が HIF1 α の発現を制御しないことを明らかにしました。(図 2)

そこで、LIN28A による HIF1 α の発現制御メカニズムを同定するために、RNA-Seq による Transcriptome 解析、核酸アナログであるチオウリジン (s4U) を用いた mRNA の分解速度を Transcriptome wide に定量する手法である SLAM-Seq、および RNA 結合タンパク質が結合する領域を Transcriptome wide に同定する手法である Enhanced crosslinking immunoprecipitation (eCLIP) 法を用いることで、RNA 結合タンパク質としての機能を統合的に解析しました。その結果として、LIN28A が HIF1A mRNA の 3' UTR 上の UGAU という *cis*-element を認識して mRNA を安定化させることによって HIF1 α の発現を亢進させることを明らかにしました。(図 3)

最後に、LIN28A が HIF1 α の発現を亢進させることによる生理的意義を探索するため、血管密度試験をヌードマウスに皮下移植した腫瘍に対して行ったところ、LIN28A の発現によって血管新生が亢進している様子を明らかにしました。(図 4)

これらの結果により、LIN28A が microRNA let-7 の分解に非依存的に、UGAU モチーフを持った *cis*-element への直接の結合を介して HIF1 α を転写後制御することにより、癌の血管新生亢進に寄与することを明らかにしました。

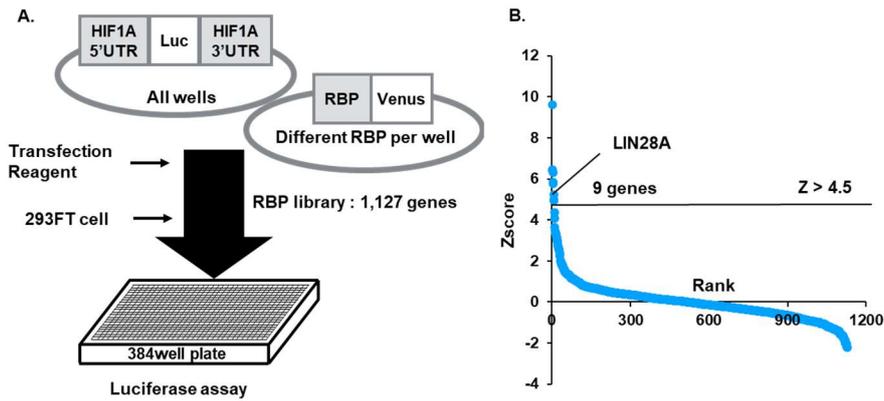


図 1 HIF1 α の転写後制御因子を探索する RNA 結合タンパク質のスクリーニング

RNA 結合タンパク質スクリーニングにより HIF1 α の発現を上昇させる候補遺伝子として LIN28A を同定

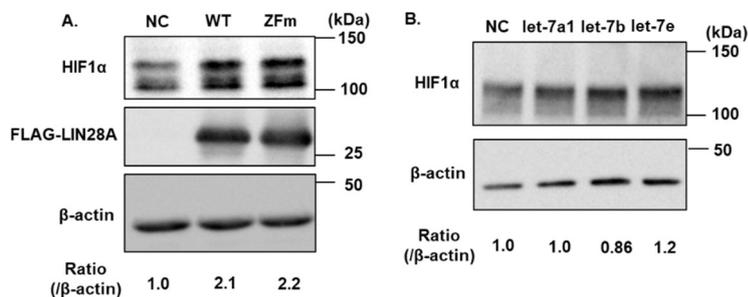


図 2 LIN28A の変異体および let-7 を発現させたときの HIF1 α タンパク質発現の定量

A. Negative Control (NC)、および LIN28A の野生型 (WT)、let-7 を分解できない変異体 (ZFm) を発現したときの HIF1 α タンパク質の発現変化をウエスタンブロットティングにより定量した。B. Negative Control (NC)、および microRNA let-7 を発現したときの HIF1 α タンパク質の発現変化をウエスタンブロットティングにより定量した。

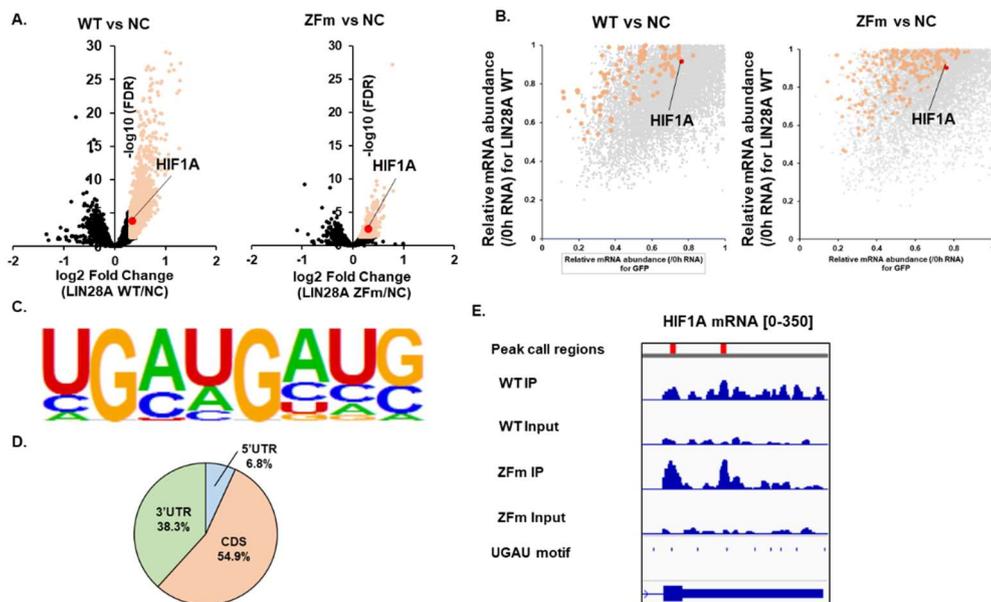


図 3 RNA 結合タンパク質としての LIN28A の統合的解析

A. Negative Control (NC)、野生型の LIN28A (WT)、および変異体の LIN28A (ZFm) を発現したときの Transcriptome 解析 B. Negative Control (NC)、野生型の LIN28A (WT)、および変異体の LIN28A (ZFm) を発現

したときの SLAM-Seq による mRNA の安定性変化の解析 C. eCLIP より同定された LIN28A が結合する部位のモチーフ配列 D. eCLIP より同定された LIN28A が結合する mRNA の部位の分布図 E LIN28A (野生型、変異体)が HIF1A に結合している部位と UGAU モチーフ配列部位の図示 (eCLIP)

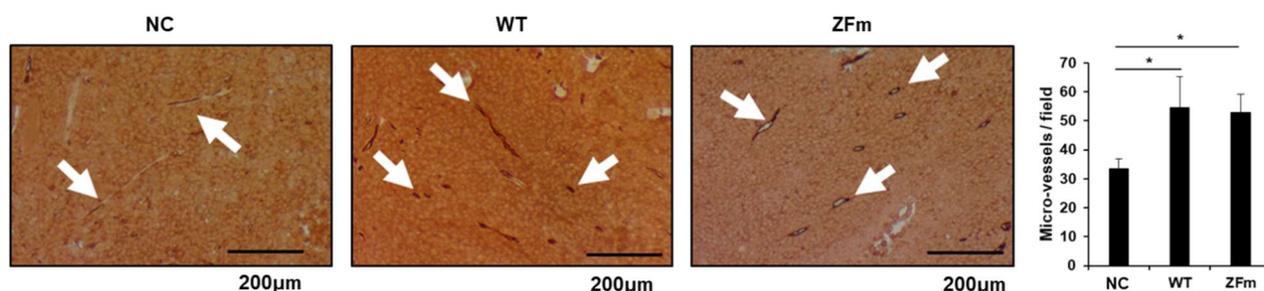


図 4 皮下移植腫瘍に対する血管新生の評価

Negative Control (NC)、野生型の LIN28A (WT)、および変異体の LIN28A (ZFm)を発現させた細胞のマウスへの皮下移植モデルに対する血管新生の様子

【研究成果の意義】

研究グループは、RNA 結合タンパク質 LIN28A が腫瘍抑制 microRNA である let-7 の分解を介さず、mRNA 上の”UGAU”という新規同定 cis-elementに直接結合することで HIF1 α の発現を上昇させ、血管新生を亢進させる新規制御メカニズムを明らかにしました。(図 5)本研究成果は、幹細胞制御や腫瘍制御においてその重要性が知られる LIN28A の新たな一面を明らかにするとともに、血管新生の阻害などを介した新規癌治療などの発展研究への寄与が期待されます。

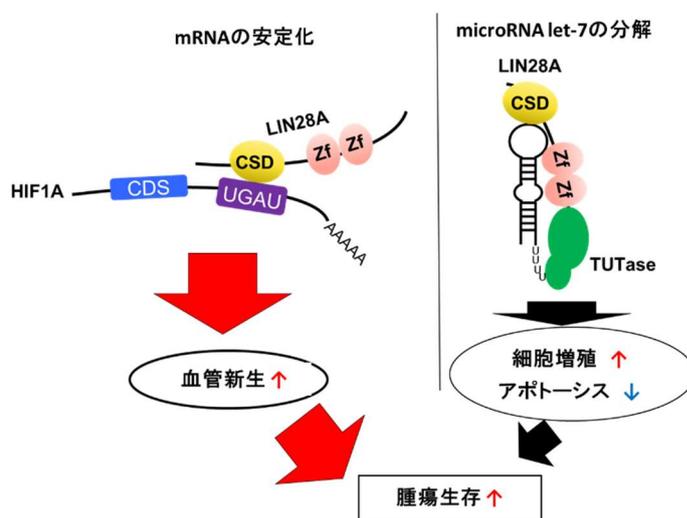


図 5 本研究において解明されたメカニズム

【用語解説】

※1 RNA 結合タンパク質 LIN28A

RNA 結合タンパク質は mRNA に直接結合することで mRNA の安定化や翻訳制御、RNA の輸送、スプライシング制御に寄与することが知られている。LIN28A は RNA 結合タンパク質の中でも最もよく知られているもののひとつで、腫瘍抑制 microRNA として知られる let-7 の分解を誘導することで、幹細胞性の維持や腫瘍形成等に

寄与することが知られている。

※² 低酸素誘導因子 HIF1 α

低酸素環境下において発現が安定化することが知られる重要な転写因子である。血管新生やエリスロポエチンの産生など、低酸素条件に応答して個体の生存に必要な遺伝子群の発現を上昇させることが知られている。

※³ *cis*-element

因子が直接結合することで標的遺伝子発現を調節することができる部位の総称。ここでは RNA 結合タンパク質が直接結合することで標的 mRNA への機能調節を行う部位のことを指す。

【論文情報】

掲載誌: Journal of Biological Chemistry

論文タイトル: RNA-binding protein LIN28A upregulates transcription factor HIF1 α by post-transcriptional regulation via direct binding to UGAU motifs

【研究者プロフィール】

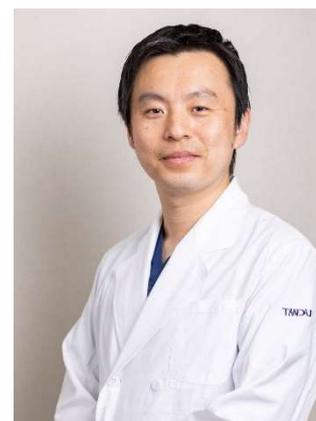
山本 寛人 (ヤマモト ヒロト) Hiroto Yamamoto

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

心肺統御麻酔学 講師

・研究領域

分子生物学(遺伝子発現)、臨床麻酔学、周術期管理学



内田 雄太郎 (ウチダ ユウタロウ) Yutaro Uchida

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生再生医学分野 MDPHD コース学生(学部六年)

・研究領域

分子生物学(遺伝子発現学)、RNA 生物学、がん生物学



栗本 遼太 (クリモト リョウタ) Ryota Kurimoto

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生再生医学分野 講師

・研究領域

分子生物学(遺伝子発現学)、RNA 生物学、がん生物学、実験病理学



浅原 弘嗣 (アサハラ ヒロシ) Hiroshi Asahara

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 教授

・研究領域

分子生物学(遺伝子発現)、発生・再生医学、整形外科学、リウマチ学



【問い合わせ先】

<研究に関すること>

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

システム発生・再生医学分野 浅原 弘嗣 (アサハラ ヒロシ)

TEL:03-5803-5015 FAX:03-5803-5810

E-mail: asahara.syst@tmd.ac.jp

<報道に関すること>

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL:03-5803-5833 FAX:03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp