

ポリフェノールによるマイクロ RNA プロセシングと癌の制御機構

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻

杉本(永池) 崇

1. 研究の目的と背景

マイクロ RNA (miRNA) は 20 塩基程度の小分子 RNA であり, 標的となるメッセンジャー RNA (mRNA) に結合してその翻訳を抑制する役割を持つ (図 1)(1).

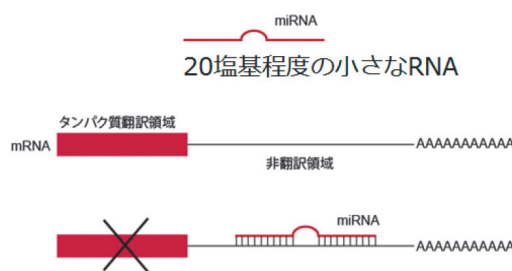


図 1 miRNA による翻訳抑制

ヒトではこれまで 1000 種類以上の miRNA が見つかったが, その中でも let-7 は細胞の発生分化や癌抑制だけでなく, 糖代謝やアポトーシスなど様々な高次生命現象を制御する miRNA である (2). let-7 の生合成では, まず核内で一次転写産物が合成され, Drosha により切断を受けて前駆体 let-7 (pre-let-7) となる. pre-let-7 はその後, 細胞質内に輸送され, Dicer により更に切断を受けて成熟型 let-7 となる. 成熟型 let-7 は標的遺伝子の発現を抑制することにより, 癌を抑制して細胞の正常化の維持に関わる (図 2). 以前から, 特定の癌細胞種では let-7 の発現量

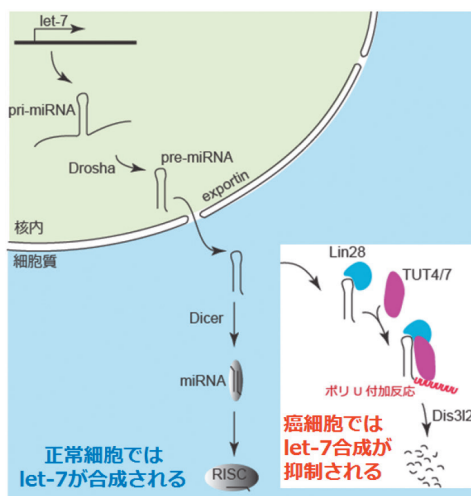


図 2 癌細胞で観察される pre-let-7 のポリウリジル化と let-7 合成抑制

が顕著に低いことが知られていたが, 近年の研究から, これらの細胞では pre-let-7 の 3' 末端がポリウリジル化され Dis3l2 と呼ばれるエクソヌクレアーゼにより分解されるため, 成熟型 let-7 の生成が抑制される現象が発見された (図 2).

このことから pre-let-7 のポリウリジル化は細胞の癌化を引き起こす機構として注目されている. この反応には, ポリウリジル化酵素 (TUT4 あるいは TUT7) と RNA 結合タンパク質 Lin28 が関与しており (図 2) (2), 本反応を制御可能な薬剤の開発は新たな癌治療薬の開発につながる可能性がある.

ポリフェノールは, お茶やコーヒー, 野菜などほとんどの植物類に含まれ, 私達が日常的に摂取しているものである. ポリフェノールはラジカルスカベンジャーとして機能することで抗酸化作用を示す (参考文献 (3) など). 1990 年代初頭には「フレンチパラドックス」を発端とする健康ブームを引き起こし, その効能が注目されてきた. また, 癌細胞の増殖を抑制することを示す報告も多数なされており (参考文献 (4) など), 新たな癌治療薬の開発につながることも期待される.

ワインや茶などに含まれるポリフェノールの一種であるタンニン酸も癌抑制の効果を有する ((5) など). タンニン酸はポリ ADP リボース (pADPr) 分解酵素 (PARG) の阻害剤として機能することから (6), 細胞内の pADPr 量を調節することにより, 癌を抑制している可能性がある. pADPr がタンパク質に結合するポリ ADP リボシル化はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり, 標的タンパク質の活性を抑制する. 筆者らはこれまでにポリウリジル化酵素 TUT7 がポリ ADP リボシル化されること, それによりポリウリジル化酵素活性が抑制されることを見出している (図 3, 未発表データ). このことから, 細胞内にタンニン酸が取り込まれると, TUT7 のポリ ADP リボシル化が誘導され pre-let-7 のポリウリジル化を抑制するのではないかと仮説を立てた.

そこで, 本研究ではタンニン酸を含むポリフェノール化合物群が pre-let-7 のポリウリジル化反応に及ぼす影響の解析を実施することにした.

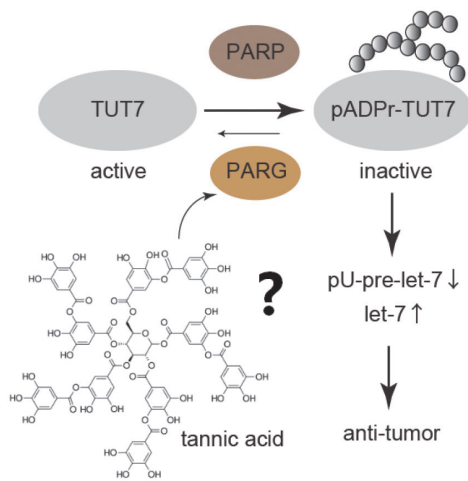


図3 タンニン酸による pre-let-7 ポリウリジル化反応の抑制仮説

2. 研究の方法

(1) TUT7 安定発現細胞株の樹立と TUT7 のアフィニティー精製

TUT7 発現プラスミド (pcDNA5-SBP-TUT7) は TUT7 の N 末端に SBP タグを付加するように設計しており, Flp-In™ T-REx™-293 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした. pcDNA5-SBP-TUT7 を保持した細胞はハイグロマイシン (100 µg/ml) により選別を行った.

SBP-TUT7 安定発現細胞株を 10 枚の 10 cm プレートで培養し, 500 ng/ml のドキサイクリンを含んだ培地で 48 時間培養して SBP-TUT7 発現を誘導した. その後, 回収した細胞から抽出液を調製し, SBP-TUT7 をストレプトアビジンビーズ (GE Healthcare) により精製した (2 mM のビオチンで溶出).

(2) 試験管内ポリ U 付加反応

試験管内 pre-let-7 ポリウリジル化反応は 37°C で 20 分を行った. 反応には UTP, pre-let-7 ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP で 5' 末端をラベル化), リコンビナント Lin28A 及び SBP-TUT7 溶出液を用いた. 反応後, RNA を回収して尿素入りのポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した. ポリウリジル化された pre-let-7 は, BAS-5000 イメージング装置 (Fuji Film) により検出を行った.

(3) 定量 RT-PCR 法による細胞内ポリ U 付加反応の解析

RNA の定量のために定量 RT-PCR を実施した. ポリウリジル化された RNA の解析には, 100 ng の全 RNA から adaptor-oligo(dA)₁₄ プライマーによる逆転写を行った (PrimeScript RT reagent kit (TAKARA) を使用). 続く定量 PCR は, adapter プライマーと遺伝子特異的プライマーを用いて行った (SYBR Premix Ex Taq II (TAKARA) を使用). 成熟型 let-7 の定量には 10 ng の全 RNA を用い

TaqMan miRNA assay (Life Technologies) を行った. これらのデータは RNU48 で補正した.

3. 研究内容と実施経過

「1. 研究の目的と背景」で述べた仮説を検証するために TUT7 の安定発現細胞株から細胞抽出液を調製した. 細胞抽出液中には pADPr 合成酵素 (PARP) と pADPr 分解酵素 (PARG) どちらも含有されている. その後, タンニン酸共存下で TUT7 のアフィニティー精製を行った. その結果, タンニン酸存在下では, TUT7 が, 本来の分子量より高分子量側に検出された (図 4, 左上). 当初, この高分子バンドはポリ ADP リボース (pADPr) が結合した TUT7 が蓄積したことによると考えていたが, 精製後に pADPr を分解する酵素を外から加えて処理しても消失しないことや, 精製時にタンニン酸だけでなく, pADPr の基質となる NAD⁺ を加えても高分子 TUT7 のパターンに変化がなかった. このことから, タンニン酸が PARG を阻害することによりポリ ADP リボシル化された TUT7 が蓄積したとは考えにくい. ポリフェノールはタンパク質への結合能を有する (7) ことから, 高分子量側のバンドは TUT7 の翻訳後修飾によるものというよりはタンニン酸が TUT7 に直接結合したことによる可能性がある. 同様の結果が, もう一つの pre-let-7 ポリウリジル化酵素である TUT4 を用いた際にも観察された (図 4, 左上).

続いて, 高分子側にシフトした TUT7 及び TUT4 の酵素活性を試験管内で解析することにした. pre-let-7 のポリウリジル化反応は RNA 結合タンパク質 Lin28 と TUT7/

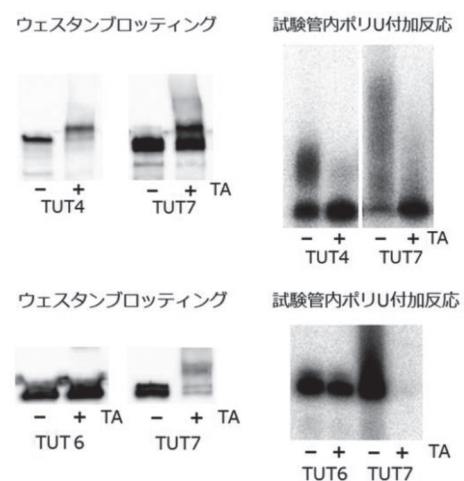


図4 タンニン酸 (TA) 存在下で細胞抽出液からアフィニティー精製した際に観察される高分子 TUT7/4 とその酵素活性

上段: TUT7 と TUT4 の解析結果. 試験管内ポリ U 付加反応は 32P ラベルした pre-let-7 を用いた.

下段: TUT7 と TUT6 の解析結果. 試験管内ポリ U 付加反応は 32P-UTP の U6 snRNA (TUT6 の基質 RNA) への取り込みを解析した.

TUT4が基質RNAとなる pre-let-7 とコアの複合体を形成して進行するRNA合成反応である。そこで pre-let-7, リコンビナント Lin28 及び TUT7/TUT4 を混合してポリウリジル化反応を行い, その効率を解析した。その結果, 高分子側の TUT7/4 によるポリウリジル化反応の効率が顕著に低下することが明らかとなった (図4, 右上)。一方, 同様の処理を他のポリウリジル化酵素ホモログ (TUT6) についても行った。その結果, タンニン酸は TUT6 によるポリウリジル化反応には大きな影響を及ぼさないことが分かった (図4, 下)。

また, タンニン酸がポリウリジル化反応の複合体形成に及ぼす影響をゲルシフトアッセイにより解析した。図5に示したように, TUT7, Lin28, pre-let-7 による複合体形成効率はタンニン酸の有無で大差がないことが分かった。このことから, タンニン酸は TUT7 の触媒活性を阻害していることが示唆される。

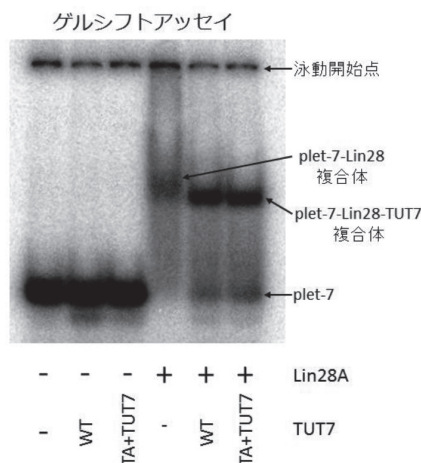


図5 ポリウリジル化反応複合体形成

タンニン酸を含む TUT7 (TA+TUT7) の反応複合体形成効率を調べた

次に, タンニン酸による阻害効果が細胞内でも観察されるか解析を行った。モデル細胞として Lin28 を発現している HeLa 安定発現細胞を用いて, 全 RNA 画分を精製し, リアルタイム RT-PCR によりポリウリジル化された pre-let-7 の定量を行った。図6に示したように, タンニン酸

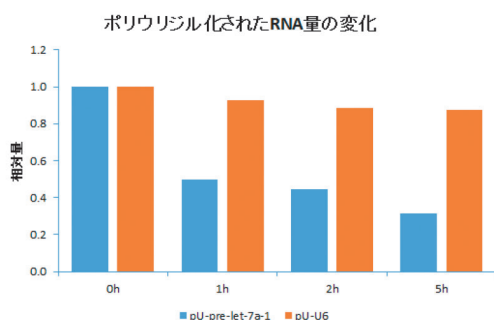


図6 タンニン酸が細胞内ポリウリジル化RNA量に与える影響の解析

は TUT6 によりポリウリジル化される U6 snRNA には, 大きな影響を与えないが, TUT7/4 によりポリウリジル化される pre-let-7 の量は経時的に減少していくことが明らかとなった。この結果は, 試験管内ポリウリジル化反応の結果 (図4) と矛盾しないものであり, 細胞内でもタンニン酸が TUT7/TUT4 による pre-let-7 ポリウリジル化反応を特異的に阻害することが示唆される。

また, ウェスタンブロッティングによる解析を行ったところ, タンニン酸による処理で細胞内の TUT7/TUT4 の定常量が減少することが分かった (図7)。一方, Lin28 や他のポリウリジル化酵素 (TUT2 と TUT6) や miRNA 生合成に関わる因子 (Dicer) の定常量には変化が見られなかった。

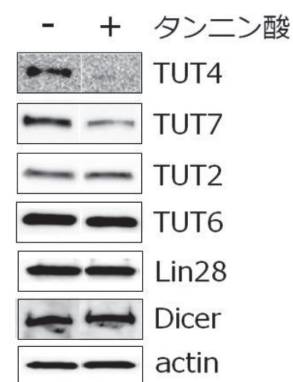


図7 タンニン酸による TUT7/TUT4 の定常量への影響

続いて, 他のポリフェノール化合物による pre-let-7 ポリウリジル化反応の阻害効果を調べることにした。本研究では, タンニン酸と, その構成化合物 (没食子酸 (GA) と 1,2,3,4,6-ペンタガロイルグルコース (PGG)) に加えて, 何種類かのポリフェノール化合物を, それぞれ試験管内ポリウリジル化反応に加えて反応効率の比較を行った。その結果, 図8に示したように, タンニン酸とその構成化合物

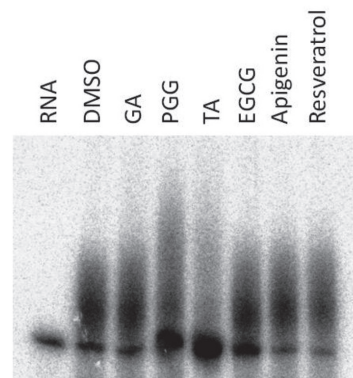


図8 様々なポリフェノール化合物がポリウリジル化反応に及ぼす影響

それぞれ, 50 μ M を反応に使用した。

GA: Gallic acid, PGG: Pentagalloylglucose,

TA: Tannic acid, EGCG: Epigallocatechin gallate

物である PGG を加えた時のみ、反応効率が顕著に低下することが分かった。したがって、ポリウリジル化反応の阻害効果は特定のポリフェノールに見られるものであると考えられる。

4. 研究から得られた結論・考察

近年の研究からポリフェノールが miRNA の発現量を調節することが明らかになっている(8)。例えば、EGCG は let-7 の発現を上昇させることが報告されている(9)。ところが、転写段階と転写後プロセッシング段階のどちらにも影響を及ぼすかなど作用機序の詳細が分からないものがほとんどである。最近の研究から、Apigenin は MAP キナーゼを阻害して TRBP のリン酸化及び活性を抑制することにより、転写後レベルで miRNA の合成を制御することが明らかにされた(10)。また、レズベラトロールは DNA 転写の制御に関与していることが報告された(11)。

本研究ではタンニン酸及び PGG が pre-let-7 のポリウリジル化反応を抑制する活性を有することを明らかにした。タンニン酸は pADPr 分解酵素の阻害剤であることから、TUT7 のポリ ADP リボシル化を蓄積させることにより pre-let-7 のポリウリジル化を抑制するという仮説に基づいて解析を行ったが、少なくとも細胞抽出液を用いた解析では仮説の実証には至らなかった。細胞内の解析が不十分なため、本仮説を完全に否定することは出来ないが、少なくともタンニン酸が TUT7 に直接作用して阻害効果を有することを明らかにすることが出来た(図 8)。また、タンニン酸で細胞を処理すると細胞内での TUT7/TUT4 の定常量が特異的に減少した(図 7)。これは、ポリ ADP リボシル化された TUT7/TUT4 が蓄積した結果、分解を受けやすくなったか、タンニン酸が TUT7/TUT4 に結合することで分解を促進した可能性がある。以上の結果から、タンニン酸を用いることにより TUT7/TUT4 を制御可能であることが示唆された。ポリウリジル化酵素を標的とした薬剤は癌治療薬の開発につながることを期待されていることから(12)、タンニン酸などのポリフェノールを基にした化合物が役立つ可能性がある。

5. 残された課題、今後の課題

今回の研究では、没食子酸単独では阻害効果が見られず、PGG では大きな阻害効果が観察されたことから、ガロイルグルコースであることが阻害効果を有するために重要であると考えられる(図 9)。タンニン酸のどの構造部分が pre-let-7 ポリウリジル化反応の阻害効果を有しているか更に調べるために、市販品で入手可能なトリガロイルグルコースとモノガロイルグルコースを用いて TUT7 の活性への影響を解析する。また、これらの化合物が TUT7 のどの領域に結合しているか同定し、タンニン酸による TUT7 活性制御機構の詳細を明らかにする予定である。

ポリフェノール化合物は 5000 種類以上と多種多様であ

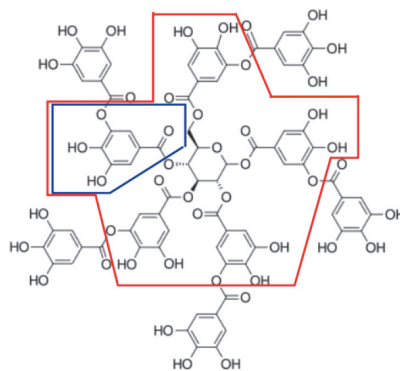


図 9 タンニン酸と構成化合物 (赤線: PGG, 青線: GA)

ることから、これらの RNA 生合成における新たな制御機構が今後明らかにされていくのではないかと予想している。ポリフェノールの生体内における作用機序を科学的に解明することはポリフェノールを含む食品の市場価値を高める効果が期待できるだけでなく、RNA プロセッシング異常により引き起こされる癌などのヒト疾患の予防・治療に繋がる食事療法の考案も出来るようになるかもしれない。また、ポリフェノールの作用機序を基に RNA プロセッシングや細胞の癌化を効果的に制御できるアナログ化合物をデザイン・合成し、新たな医薬品の開発に繋げることが可能になるのではないかと期待している。

<謝辞>

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Braun, J.E., Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2012) A molecular link between miRISCs and deadenylases provides new insight into the mechanism of gene silencing by microRNAs. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4**.
2. Thornton, J.E. and Gregory, R.I. (2012) How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends in cell biology*, **22**, 474-482.
3. Du, G., Sun, L., Zhao, R., Du, L., Song, J., Zhang, L., He, G., Zhang, Y. and Zhang, J. (2016) Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther.*
4. Yang, C.S., Wang, X., Lu, G. and Picinich, S.C. (2009) Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer*, **9**, 429-439.
5. Nam, S., Smith, D.M. and Dou, Q.P. (2001) Tannic acid potentially inhibits tumor cell proteasome activity,

- increases p27 and Bax expression, and induces G1 arrest and apoptosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**, 1083–1088.
6. Blenn, C., Wyrsh, P. and Althaus, F.R. (2011) The ups and downs of tannins as inhibitors of poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Molecules*, **16**, 1854–1877.
 7. Jobstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J.P. and Williamson, M.P. (2004) Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, **5**, 942–949.
 8. Milenkovic, D., Jude, B. and Morand, C. (2013) miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radic Biol Med*, **64**, 40–51.
 9. Yamada, S., Tsukamoto, S., Huang, Y., Makio, A., Kumazoe, M., Yamashita, S. and Tachibana, H. (2016) Epigallocatechin-3-O-gallate up-regulates microRNA-let-7b expression by activating 67-kDa laminin receptor signaling in melanoma cells. *Sci Rep*, **6**, 19225.
 10. Ohno, M., Shibata, C., Kishikawa, T., Yoshikawa, T., Takata, A., Kojima, K., Akanuma, M., Kang, Y.J., Yoshida, H., Otsuka, M. *et al.* (2013) The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep*, **3**, 2553.
 11. Yao, R., Yasuoka, A., Kamei, A., Ushima, S., Kitagawa, Y., Rogi, T., Shibata, H., Abe, K. and Misaka, T. (2014) Nuclear receptor-mediated alleviation of alcoholic fatty liver by polyphenols contained in alcoholic beverages. *PLoS One*, **9**, e87142.
 12. Lin, S. and Gregory, R.I. (2015) Identification of small molecule inhibitors of Zcchc11 TUTase activity. *RNA biology*, **12**, 792–800.