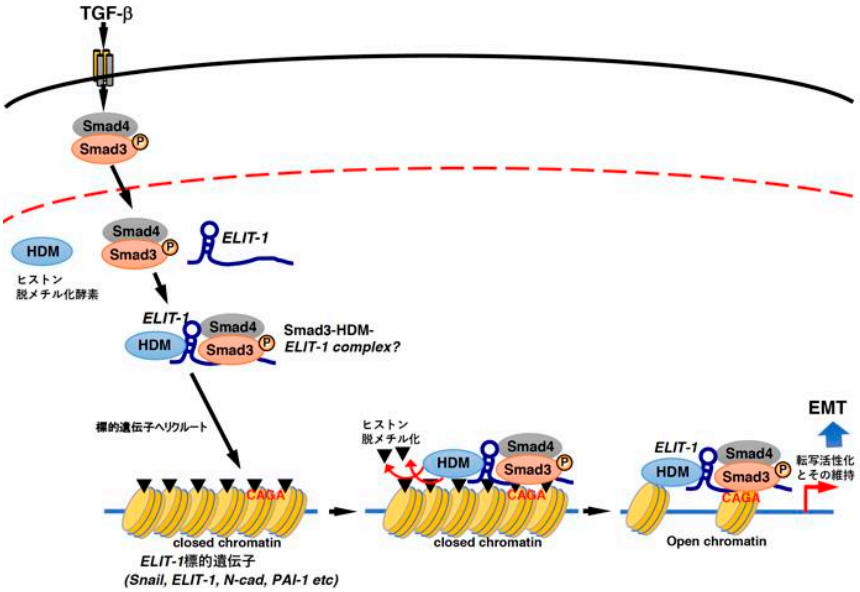
28　ヒストン脱メチル化の遺伝子特異性を担う長鎖ncRNA	北川　雅敏

【目的】我々はTGF-βで誘導され上皮間葉転換（EMT）に関与する新規長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）として *ELIT-1*（EMT-promoting lncRNA induced by TGF-1）を見出した。*ELIT-1* はTGFβ刺激に反応する多種の細胞株で誘導された。*ELIT-1* 遺伝子の上流にSmad結合配列があり、TGF-β－Smad経路を介して *ELIT-1* は転写誘導された。*ELIT-1* の機能においては、*ELIT-1* はTGF-β－Smad経路による *Snail*、*N-cadherin*、*vimentin*、等のEMT関連遺伝子の転写を促進し、EMTを正に制御していることが示唆された。*ELIT-1* は標的遺伝子のプロモーターへのSmad3のリクルートを促進することにより *Smad3* の遺伝子発現を助けるlncRNAであることが示唆された。一般に転写活性な遺伝子上ではヒストンのメチル化修飾の変動によりクロマチン構造の弛緩が誘導されるが、このエピゲノム制御の遺伝子特異性のメカニズムは不明である。我々は *ELIT-1* がエピゲノム因子と結合して、TGF-β－Smad3経路の標的遺伝子のエピゲノム制御を担っていると考え、本研究でそれを検証する。

【方法】1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析はマイクロアレイによって行った。2. *ELIT-1* との相互作用の解析をRIPアッセイによって行った。3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析をレポーターアッセイおよびChIPアッセイによって行った。4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析をRIPアッセイによって行った。

【結果】1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析：マイクロアレイにより発現遺伝子解析を行い、ジーンオントロジー解析を行ったところ、*ELIT-1* の標的経路の多くはTGF-βの標的経路であることが判明し、*ELIT-1* はTGF-β経路の正の調節因子であることが示された。2. RIPアッセイによる *ELIT-1* とSmadの相互作用の解析：RIP-qPCR解析により、TGF-β刺激により *ELIT-1* は選択的にSmad3と結合することが示唆された。3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析：Smad結合配列を持つレポーター活性はTGF-β刺激により上昇し、*ELIT-1* のノックダウンで抑制された。標的遺伝子の上流領域に対するTGF-β依存的なSmad3の結合は *ELIT-1* のノックダウンにより抑制された。*ELIT-1* はTGF-β依存的にSmad3として結合し、Smad3の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進し、遺伝子発現を活性化してEMTの誘導に機能することが判明した。4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析：RIPアッセイによって *ELIT-1* とヒストン脱メチル化酵素（HDM）の結合を見出した。*ELIT-1* がHDMと結合してTGF-β－Smad3経路の標的遺伝子特異的なエピゲノム制御を担っている可能性が示唆された。

TGF-β－Smad3－*ELIT-1* axisとヒストン脱メチル化酵素のリンクの可能性



28. ヒストン脱メチル化の遺伝子特異性を担う長鎖 ncRNA

北川　雅敏

浜松医科大学 医学部 医学科 分子生物学講座

Key words：長鎖ノンコーディング RNA，TGF-β，ヒストン脱メチル化，転写因子

緒　言

ヒトのゲノム情報が明らかになり、コーディング遺伝子産物の機能に関しては多くの知見が蓄積されてきた。しかしながら生命現象の未知の部分は多く、生命現象の多様なプロセスはタンパク質をコードする遺伝子だけでなく、タンパク質をコードしないゲノムにも重要な機能があることが想起される。この部分においてマイクロ RNA や長鎖ノンコーディング RNA（lncRNA）などの機能性ノンコーディング RNA（ncRNA）の関与が大きいと考えられる。マイクロ RNA については多くの研究報告があるが、ヒト細胞で数万あると予想されている lncRNA については、機能が報告されているものは数%にすぎず、まさにゲノムのブラックボックスである。lncRNA は miRNA と結合してその機能を抑制する報告が多い。一方でタンパク質相互作用の仲介をして、細胞内構造体の構成成分となったり、多様なタンパク質と結合したりして、シグナル伝達、転写制御、DNA 複製などの細胞内プロセスに機能し、発生、細胞増殖及び癌の進展等様々な生命現象に関与することが示唆されている。

我々は、ヒト B 型肝炎ウイルス（HBV）の複製に伴い発現上昇する lncRNA をマイクロアレイ解析により解析した。その結果、HBV の複製に伴い顕著に発現増加する新規 lncRNA を見出した。その後の解析で、この lncRNA は細胞運命制御に重要な機能を持つ TGF-β によって誘導されることを見出した。Huh7 や A549 などの細胞では TGF-β 刺激により細胞形態が紡錘形に変化する上皮間葉転換（EMT）が誘導されるが、この lncRNA を siRNA でノックダウンすると TGF-β 刺激による EMT 誘導が阻害された。これらの結果を総合してこの新規 lncRNA を *ELIT-1*（EMT-promoting lncRNA induced by TGF-β-1）と命名した［1］。

EMT はがん細胞の浸潤、転移や薬剤耐性などの悪性化形質獲得機序の一つである。TGF-β が EMT を誘導することは以前から知られていた。TGF-β 刺激により Smad 経路を介して Snail の発現が誘導され、上皮系遺伝子である E-カドヘリンの発現が抑制される。一方で Smad の標的遺伝子で間葉系遺伝子であるビメンチンや N-カドヘリンの発現が誘導され、間葉系の細胞へと転換する。

TGF-β による *ELIT-1* の誘導は、TGF-β 刺激で EMT が観察されるという報告のある、肝臓がん細胞 Huh7、肝がん細胞 HepG2、肺がん細胞 A549、乳がん細胞 MCF7 および MDA-MB231、乳腺上皮細胞 MCF10A で、発現量および発現誘導程度の差はあるが *ELIT-1* の誘導が観察され、TGF-β による *ELIT-1* 誘導に普遍性があることが示唆された。さらに TGF-β による *ELIT-1* 遺伝子の転写制御機構の解析を行ったところ、*ELIT-1* 遺伝子の上流転写制御領域には複数の CAGA 配列があることがわかり、ChIP-アッセイにより、これらの部位に Smad3 が TGF-β 依存的に結合することがわかった。また、TGF-β による *ELIT-1* の誘導は TGF-β 受容体阻害剤および Smad3 阻害剤（SIS3）で阻害され、TGF-β －Smad 経路で *ELIT-1* が誘導されることが判明した［1］。

本研究では、我々の見出した新規 lncRNA *ELIT-1* はどのようなメカニズムで標的遺伝子の転写誘導に機能するのか？を *ELIT-1* と Smad の相互作用、そして、*ELIT-1* および Smad とエピゲノム因子の相互作用に注目して解析し、特異的遺伝子発現に機能する lncRNA を明らかにすることを目標とする。

方　法

1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析

肝臓がん細胞株 Huh7 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA を、RNAiMax を用いてトランスフェクションして、10 ng/ml の TGF-β で刺激し、48 時間後細胞を回収し RNA を調製し、アジレント社のマイクロアレイにより *ELIT-1* の標的遺伝子の解析を行った。

2. RIP アッセイによる *ELIT-1* と Smad の相互作用の解析

1 の結果から *ELIT-1* の標的遺伝子は TGF-β の標的遺伝子と大きく重複することがわかり、*ELIT-1* が TGF-β－Smad 経路における正の制御分子として機能していることが示唆された。そこで *ELIT-1* と Smad 結合を検証した。まず HEK293 細胞において *ELIT-1* と FLAG-Smad2 あるいは FLAG-Smad3 を強制発現し、ライセートを調製、FLAG-抗体で免疫沈降 (IP) して、RT-qPCR で *ELIT-1* を測定することで両者の結合を検証した（RIP-qPCR）。また、同様の実験において局在性を調べるために、細胞質分画と核分画に分けて解析した。さらに内因性の *ELIT-1* と Smad の結合を検証するために、Huh7 細胞を TGF-β で刺激し、Smad 抗体で IP し RT-qPCR で両者の結合を検証した。

3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析

レポーターアッセイによる解析 : 2 の結果から *ELIT-1* は Smad3 と結合して機能することが示唆された。よって Smad 結合配列を持つレポータープラスミド 3TP-Lux、(CAGA)$_{12}$-MLP-Luc、4xSBE-Luc を用いて、*ELIT-1* のノックダウンの効果を解析した。実際には A549 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA をトランスフェクトし、24 時間後にこれらのレポーターを導入し、その 24 時間後に TGF-β 刺激を行い、さらに 24 時間後に回収してルシフェラーゼ活性を測定した。また、*ELIT-1* を過剰発現させ、その標的遺伝子の転写活性に対する効果を同様の系で解析した。

ChIP アッセイによる解析 : *ELIT-1* および Smad の標的遺伝子である *Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1*（*ELIT-1* 自身も Smad の標的）の上流領域の Smad 結合領域に対する PCR プライ マーを設定した。Huh7 細胞に *ELIT-1* siRNA あるいはコントロール siRNA を導入し、TGF-β で刺激 1.5 時間後に細胞を集めてクロマチン分画を調製し、*Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1* などの上流領域に対する Smad3 の結合を ChIP-qPCR で解析し、*ELIT-1* のノックダウンの影響を解析した。

4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析

これまでの結果から *ELIT-1* は TGF-β－Smad 経路における正の制御分子として標的遺伝子の転写促進に機能していることが示唆された。一般に、転写活性化状態のクロマチンでは H3K4me3 および H3K36me3 の増加と、H3K9me3 および H3K27me3 の低下が起こり、クロマチン構造を緩めている可能性が高い。ヒストンのメチル化状態の制御はヒストンメチル化酵素群およびヒストン脱メチル化酵素群（HDM）によって調節されているが、それらの遺伝子特異性がどう決められるのかは不明の点が多い。

そこで *ELIT-1* と HDM の結合を検証した。まず HEK293 細胞において *ELIT-1* と複数の FLAG-HDM を強制発現し、ライセートを調製、FLAG-抗体で免疫沈降（IP）して、RT-qPCR で *ELIT-1* を測定することで両者の結合を検証した（RIP-qPCR）。また、同様の実験において局在性を調べるために、細胞質分画と核分画に分けて解析した。さらに内因性の *ELIT-1* と HDM の結合を検証するために、Huh7 細胞を TGF β で刺激し、HDM 抗体で IP し RT-qPCR で両者の結合を検証した。

結果および考察

1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析

マイクロアレイにより発現遺伝子解析を行い、TGF-β の刺激で発現変動する遺伝子のうち、327 の遺伝子が発現上昇し、138 の遺伝子が発現低下することがわかった。*ELIT-1* の標的遺伝子としては、376 の遺伝子が発現上

昇し、280 の遺伝子が発現低下した。TGF-βと *ELIT-1* の標的遺伝子として共通に正に制御されているものは 134、負に制御されているものは 49 遺伝子であった（表 1）。ジーンオントロジー（GO）解析を行ったところ、*ELIT-1* の標的経路の多くは TGF-β の標的経路であることが判明し、*ELIT-1* は TGF-β経路の正の調節因子であることが示された。しかしながら *ELIT-1* の標的遺伝子で TGF-β の標的遺伝子でないものも少なからず存在し、canonical な *ELIT-1* の機能が TGF-β－Smad－*ELIT-1* axis であるとすると、non-canonical な機能もあることが示唆され、その解明は今後の課題と考えている。

表 1. TGF-β の標的遺伝子と *ELIT-1* の標的遺伝子の比較

	*TGFβ−1*の標的遺伝子の数（特異的遺伝子の数）	*ELIT−1*の標的遺伝子の数（特異的遺伝子の数）	両者に共通な標的遺伝子の数
正に制御される遺伝子	327 (193)	376 (242)	134
負に制御される遺伝子	138 (89)	280 (231)	49

2. RIP アッセイによる *ELIT-1* と Smad の相互作用の解析

RIP-qPCR 解析により、*ELIT-1* が FLAG-Smad3 と結合することが判明した。興味深いことに FLAG-Smad2 とは結合しないことが判明した。細胞分画の実験の結果、TGF-β シグナル依存的に核内で *ELIT-1* と FLAG-Smad3 の結合が見られた。また、内因性 *ELIT-1* と内因性 Smad3 の結合が見られ、TGF-β 刺激によりその結合は増強された。一方で、内因性 Smad2 と内因性 *ELIT-1* とは結合はほとんど見られなかった。以上の結果より、TGF-β 刺激により *ELIT-1* は選択的に Smad3 と結合することが示唆された。

3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析

レポーターアッセイによる解析： Smad 結合配列を持つレポータープラスミド 3TP-Lux、$(CAGA)_{12}$-MLP-Luc、4×SBE-Luc を用いて、*ELIT-1* のノックダウンの効果を解析したところ、TGF-β 刺激により上昇した転写活性は *ELIT-1* のノックダウンで抑制された。また、各レポーターの TGF-β 刺激依存的な転写活性は *ELIT-1* の過剰発現によって増強された。

ChIP アッセイによる解析：*Snail*、*vimentin*、*PAI-1*、*ELIT-1* 遺伝子の上流領域に対する TGF-β 刺激依存的な Smad3 の結合は *ELIT-1* のノックダウンにより抑制された。

これまでの結果を考え合わせると、*ELIT-1* は TGF-β によって Smad 経路を介して誘導される。誘導された *ELIT-1* は TGF-β 依存的に Smad3 として結合し､Smad3 の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進し、遺伝子発現を活性化して EMT の誘導に機能する。このように TGF-β－Smad－*ELIT-1* axis は TGF-β シグナルのポジティブフィードバック経路を形成すると考えられる［1］。

4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析

RIP アッセイによって *ELIT-1* とヒストン脱メチル化酵素（HDM）の結合を検証した。*ELIT-1* と複数種類の FLAG-HDM を強制発現し、FLAG- IP して、結合している *ELIT-1* を測定したところ、ある HDM が結合することを見出した（図 1）。現在、内因性の *ELIT-1* と HDM の結合を検証中である。また、その HDM が Smad の標的遺伝子プロモーター領域に *ELIT-1* によってリクルートされるか？また、標的遺伝子のヒストンのメチル化状態がその HDM のリクルートに伴い変化するかついて、ChIP アッセイで解析中である。

以上のように、*ELIT-1* が Smad3 及び HDM と結合することにより、ヒストンメチル化の遺伝子特異性を担い、Smad3 特異的な遺伝子の転写の促進を介して TGF-β－Smad 経路を正に制御する lncRNA であるか、について現在さらに検証している。

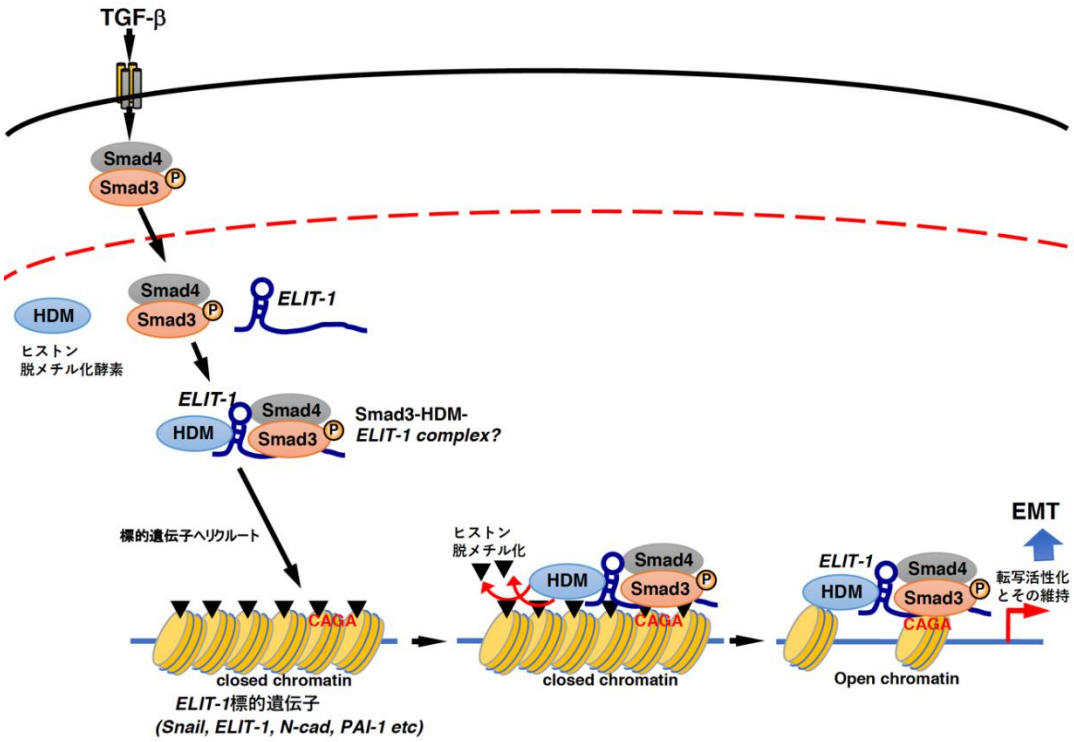


図1. TGF-β－Smad3－*ELIT-1* axisとヒストン脱メチル化酵素のリンクの可能性
TGF-βは受容体に結合し、Smad2/3をリン酸化して活性化する。Smad3－Smad4 複合体は核内に移行し、*ELIT-1*と結合する。*ELIT-1*との結合によりSmad3－Smad4複合体の標的遺伝子へのリクルートは促進され、転写が亢進することが 判明した。ヒストン脱メチル化酵素（HDM）もSmad3－*ELIT-1*と結合する可能性が示唆され、Smad3の標的遺伝子へターゲットされてヒストン脱メチル化を介した遺伝子発現に関与するのではないかと考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、浜松医科大学医学部分子生物学講座の大畑樹也助教および酒井聡である。

文　献

1） Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Uchida C, Aoshima T, Niida H, Suzuki T, Inoue Y, Miyazawa K, Kitagawa M. Long Noncoding RNA *ELIT-1* Acts as a Smad3 Cofactor to Facilitate TGFß/Smad Signaling and Promote Epithelial-Mesenchymal Transition. Cancer Res. 2019 Jun 1;79(11):2821-2838. PMID: 30952633 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3210.