

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370093

研究課題名(和文)核マトリクス・ノンコーディングRNA複合体によるエピジェネティックな発現制御解析

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms of epigenetic gene regulation by a complex of nuclear matrix protein and noncoding RNA

研究代表者

中川 真一 (Nakagawa, Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川RNA生物学研究室・准主任研究員

研究者番号：50324679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトやマウスのゲノムからは大量のタンパク質をコードしないノンコーディングRNAが転写されている。それらの多くは、クロマチン制御因子と複合体を形成し、エピジェネティックな遺伝子発現を制御しているのではないかと考えられている。本研究ではX染色体の不活性化を制御するノンコーディングRNAであるXistの染色体局在を制御する核マトリクスタンパク質、hnRNP Uに注目した機能解析を行い、hnRNP UがXist以外のノンコーディングRNAによるエピゲノム制御にも関わっていること、hnRNP Uをノックダウンした細胞では複数の相同染色体特異的な遺伝子発現が影響を受けることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the human and mouse, vast majority of the genome is transcribed into RNAs, producing a huge number of non protein-coding RNAs. These noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes, and are assumed to regulate epigenetic gene expression. In this study, we have performed functional analysis of a nuclear matrix protein hnRNP U that regulate chromosomal localization of Xist, a renowned noncoding RNA involved in the X chromosome inactivation. We found that hnRNP U also regulates the chromosomal localization and function of noncoding RNAs such as Kcnq1ot1 and Airn, and the allele-specific expression of the imprinted loci were impaired upon depletion of hnRNP U. We also performed genome-wide gene expression analysis of the hnRNP U depleted cells, and found that multiple allele-specific expression were also disturbed. We found a novel noncoding RNA expressed from the allele-specific locus, and its transcripts were also associated with the chromosome in a mono-allelic manner.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：核マトリクス hnRNP U インプリンティング アリル特異的発現

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスのゲノムからはタンパク質をコードしないノンコーディング RNA が大量に転写されている。それらの機能は長らく不明であったが、クロマチン制御因子と複合体を形成し、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わっているのではないかとこの考え方が、最近になって提唱されるようになってきた。たとえば、代表的なエピジェネティックな遺伝子発現制御の例として、哺乳類のメス個体で見られる X 染色体の不活性化があげられる。これは、2 本ある X 染色体のうち 1 本が完全に不活性化され、X 染色体を 1 本しか持たないオス個体と遺伝子発現量を同じにする機構であるが、この染色体レベルでの遺伝子発現を制御しているのが、Xist と呼ばれるノンコーディング RNA である。Xist は将来不活性化される片方の X 染色体から発現し、その染色体全体を覆い尽くす。続いてクロマチン制御因子であるポリコム群複合体等が呼び込まれ、最終的にゲノム DNA までメチル化された不活性化 X 染色体が出来上がる。このように、X 染色体の形成に応じて進行する現象については詳細な研究がなされているが、実際に、どのようにしてノンコーディング RNA とクロマチン制御因子の複合体が染色体へと呼び込まれるのか、そもそもどのようにして Xist が染色体全体を覆い尽くすことが出来るのか、そのメカニズムについては良く分かっていなかった。我々の研究室では、Xist の染色体局在を制御するような因子をスクリーニングし、核マトリクスタンパク質である hnRNP U を同定した。hnRNP U をノックダウンした細胞では、Xist は染色体に局在する事が出来ず、核質全体に拡散する。また、その際 X 染色体上への不活性化型クロマチン修飾の濃縮も消失し、X 染色体の不活性化も起きない。hnRNP U はその分子内に RNA 結合ドメインと DNA 結合ドメインの両方を持っており、そのどちらかが欠けても Xist の染色体局在を制御する事が出来ない。これらの観察事実は、hnRNP U が Xist と染色体 DNA の両方に結合し、両者を「のり」の様に結びつけていることを示している。

このように、hnRNP U が Xist の染色体局在およびその機能のために必須である事は明らかにされたものの、hnRNP U によるクロマチン制御は Xist 特異的な現象なのか、それともその他のクロマチン修飾関連のノンコーディング RNA も hnRNP U によって制御されているのか、その点に関しては謎として残されていた。

2. 研究の目的

本研究においては、hnRNP U が Xist 以外のクロマチン修飾制御に関わるノンコーディング RNA の染色体局在や機能を制御しているかどうか明らかにするとともに、その作用機序を解明する事を旨とした。

3. 研究の方法

Air と Kcnq1ot1 はゲノム刷りこみを受けている遺伝子座から発現しているノンコーディング RNA で、それぞれ Igf2r および Kcnq1ot1 遺伝子とオーバーラップする形でアンチセンス鎖から転写している。これらの転写産物は、転写部位近傍のクロマチンと相互作用し、近隣に存在する遺伝子の相同遺伝子特異的な遺伝子発現を制御している。すなわち、これらのノンコーディング RNA が発現している染色体からは近隣の遺伝子は発現しておらず、もう片方の相同遺伝子からのみ発現している(このような、相同染色体のうち一方の染色体からのみ遺伝子が転写されていることを、アリル特異的な遺伝子発現と呼ぶ)。そこで、これらのゲノム刷り込みを制御するノンコーディング RNA の局在を蛍光 in situ ハイブリダイゼーションによって可視化し、hnRNP U を RNAi 法を用いてノックダウンしたときに、その局在に変化が見られるかどうかを調べた。また、その際、近隣の遺伝子のアリル特異的な遺伝子発現に変化が見られるかどうかを調べた。この、アリル特異的な遺伝子発現の解析には、MSM および CBA マウスの F1 ハイブリッド個体から作製された ES 細胞を用いた。これら二つの近交系マウスのゲノムを比較すると頻繁に一塩基多型が見られるので、RT-PCR の産物をダイレクトシーケンシングすることで、転写産物がどちらの染色体に由来するのかが調べることが出来る。また、より定量的な解析を行うために、遺伝子多型を検出出来るプライマーを用いて定量的逆転写 qPCR も行った。さらに、ゲノムワイドでアリル特異的な遺伝子発現の変化を調べるために、hnRNP U をノックダウンした細胞、およびコントロールの細胞から得られた RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し、ゲノムにマッピングした後に、アリル間で発現量に変化が見られる遺伝子への影響を調べた。

4. 研究成果

上述の通り、Airn や Kcnq1ot1 といったゲノム刷り込みを制御するノンコーディング RNA は、転写部位付近に局在して周辺の遺伝子発現を抑えていると考えられている。実際、in situ ハイブリダイゼーションによって Kcnq1ot1 の局在を確認したところ、これまでの報告通り、細胞あたり 1 個のドット状のシグナルが観察された。興味深い事に、hnRNP U をノックダウンすると、このドット状のシグナルは縮小し、核質に細かい点状のシグナルが観察されるようになった。(図 1)。また、同様の実験を Air に関しても行ったところ、同じく hnRNP U の発現が低下した細胞において、シグナルが核質に散らばる様子を観察することが出来た(図 1)。これらの結果は、ゲノム刷りこみを制御するノンコーディング RNA の染色体局在が一般的に hnRNP U によって制御されていることを示唆していた。

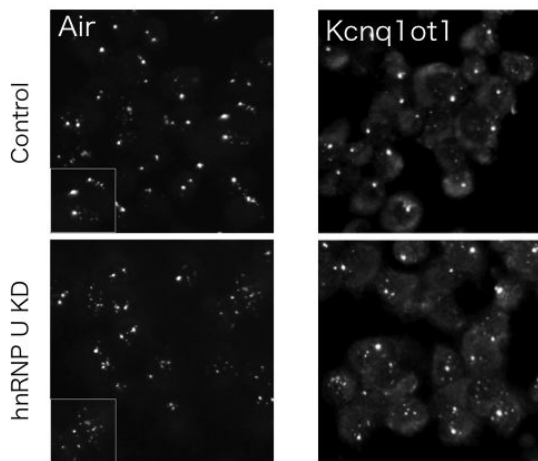


図1 hnRNP U をノックダウンした細胞における Air および Kcnq1ot1 の発現。コントロールの細胞では細胞あたり一個のドット状のシグナルが観察されるが、hnRNP U をノックダウンしたような細胞では核質に細かい点状のシグナルが多数観察される。

次に、Kcnq1ot1 の近傍にある遺伝子のアリル特異的な遺伝子発現に変化が見られるかどうかを、逆転写 PCR で得られた産物をシーケンシングする事で調べた (図2)。興味深い事に、Slc22a18、Phlda2、Cdkn1c などの遺伝子は、コントロールの細胞では母方ゲノムのみが発現していたが、hnRNP U をノックダウンすると、父方ゲノムも一部転写されるようになることが分かった (図2)。このようなアリル特異的な遺伝子発現の変化は、定量的 RT-PCR によっても確認することが出来た (図3)。



図2 アリル特異的な遺伝子発現の変化。MSM と CBA の F1 ハイブリッド由来の ES 細胞を用いて実験を行っている。アリル特異的な遺伝子発現が起きている場合、1塩基多型 (縦の影かけ) の片方みの配列が観察される。hnRNP U をノックダウンすると、それまでみられなかった父方染色体に由来する配列のシグナルが上昇している。

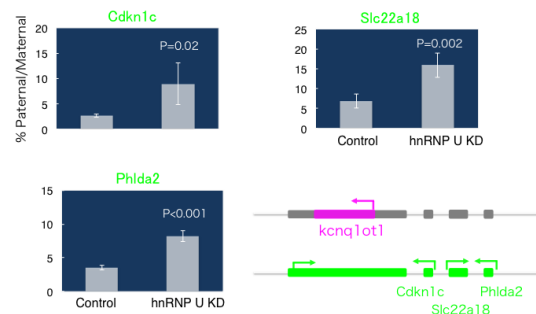
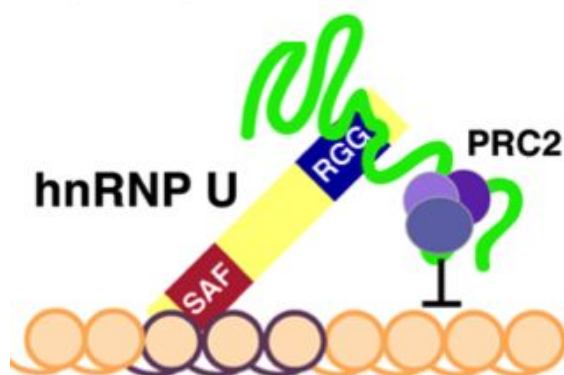


図3 hnRNP U をノックダウンした細胞における Kcnq1ot1 遺伝子近傍の遺伝子のアリル特異的な発現の変化。通常は父方の染色体からの転写産物は 5%程度を占めるにすぎないが、hnRNP U をノックダウンするとその割合が倍増する。

さらに、hnRNP U によって遺伝子のアリル特異的な発現に変化が見られるかをゲノムワイドに解析するために、コントロール、もしくは hnRNP U をノックダウンした細胞から RNA を回収し、次世代シーケンサーを用いて RNAseq 解析を行った。まず、得られたリードをマウスゲノムにマッピングし、マップされるリードの数が増える遺伝子と減る遺伝子の数 (これらは即ちそれぞれの遺伝子の発現量に相当する) をカウントすると、X 染色体においては、リードが減少する遺伝子の割合が他の染色体に比べて顕著に高いことが分かった。この結果は、hnRNP U が X 染色体の不活性化に関わっているという以前の我々の結果を強く支持するものであった。次に、1塩基置換を解析したところ、複数の遺伝子において、アリル特異的な遺伝子の発現に変化が見られることが明らかとなった。これらの結果は、hnRNP U が広く一般的に、アリル特異的な遺伝子発現制御に関わるノンコーディング RNA の染色体局在やその機能を制御している事を示していた。

我々が見出したアリル特異的な発現をする遺伝子の中には、既知のゲノム刷り込み領域以外の領域にあるものがあった。これらは、新規の刷り込み遺伝子であると考えられる。興味深い事に、その新規刷り込み遺伝子の 100 kb 以上上流の領域から、タンパク質をコードしない新規ノンコーディング RNA が転写されていることも分かった。これらの観察事実は、この新規ゲノム刷り込みが、Air や Kcnq1ot1 と同様にノンコーディング RNA によって制御されている可能性を示唆していた。そこで、この可能性を検証するために、その新規ノンコーディング RNA の局在を in situ ハイブリダイゼーションによって確認した。予想通り、このノンコーディング RNA は、2本ある相同染色体の片方からしか発現しておらず、1細胞あたり1個のドット状のシグナルを観察することが出来た。今後、hnRNP U をノックダウンしたときにこの転写産物の染色体局在が変化するか、また、このノンコーディング RNA の機能を阻害した

Imprinting-associated lncRNAs



ときにその遺伝子座付近のアリル特異的な遺伝子発現が変化するかどうかを調べる事が重要な課題となる。

以上、我々の研究によって、核マトリクスタンパク質 hnRNP U は、アリル特異的な遺伝子発現を制御するノンコーディング RNA の染色体局在や機能を幅広く制御していることが明らかとなった(図4)。

図4 核マトリクスタンパク質 hnRNP U を介したクロマチン修飾関連ノンコーディング RNA の作動モデル。これらのノンコーディング RNA は、hnRNP U と相互作用するモジュールと、PRC2 などのクロマチン修飾酵素群と相互作用するモジュールを持っている。hnRNP U は自身の RNA 結合ドメインと DNA 結合ドメインを介してクロマチン修飾関連ノンコーディング RNA を染色体 DNA に繫留させていると考えられる。

また、当初の計画に加え、不溶性の核マトリクスに分画され、大量に核内に蓄積することが知られている Neat1、Malat1 といったノンコーディング RNA のノックアウトマウスの表現型解析も行った。その結果、これらのノンコーディング RNA は必須の遺伝子ではなく、通常の飼育環境下においては特に目立った表現型を示さないことが分かった。また、レトロトランスポゾンに高い相同性を示す齧歯類特異的なノンコーディング RNA である 4.5SH RNA の機能解析を行い、この配列と相補的な配列を持つ mRNA は 4.5SH と分子間 2 本鎖 RNA を形成し、核内繫留を介して遺伝子発現を制御している事も分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

査読あり原著論文

Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T, Prasanth KV. (2012) Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA* 18, 1487-99.

doi: 10.1261/rna.033217.112.

Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. (2011) Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice.

J Cell Biol 193(1):31-9.

doi: 10.1083/jcb.201011110.

Tsuiji H, Yoshimoto R, Hasegawa Y, Furuno M, Yoshida M, Nakagawa S. (2011) Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1. *Genes Cells*.16, 479-90.

doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01502.x.

査読あり総説

Nakagawa S, Kageyama Y. (2014) Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochim Biophys Acta*. 1839, 215-22.

doi: 10.1016/j.bbarm.2013.10.009

Ip JY, Nakagawa S. (2012) Long non-coding RNAs in nuclear bodies. *Dev Growth Differ* 54, 44-54.

doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01303.x.

Nakagawa S, Hirose T. (2012) Paraspeckle nuclear bodies--useful uselessness?

Cell Mol Life Sci 69, 3027-36.

doi: 10.1007/s00018-012-0973-x

Nakagawa S, Prasanth KV. (2011) eXIST with matrix-associated proteins.

Trends Cell Biol. 2011 Jun;21(6):321-7. doi: 10.1016/j.tcb.2011.02.001.

Hasegawa Y, Nakagawa S. (2011) Revisiting the function of nuclear scaffold/matrix binding proteins in X chromosome inactivation.

RNA Biol 8, 735-9.

doi: 10.4161/rna.8.5.1636

査読無し総説

Nakagawa S, Hirano T. (2014) Gathering around Firre. *Nat Struct Mol Biol* 21, 207-8.

doi: 10.1038/nsmb.2782.

〔学会発表〕(計 8 件)

長谷川優子、中川真一 長鎖非コード RNA の局在と機能に対する RNA 結合タンパク質 hnRNP U の役割、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 03 日、神戸ポートアイランド

Shinichi Nakagawa "Functional analysis of nuclear long noncoding RNAs", Riboclub 2013, Cheribourg, Canada, September

24th,2013

中川真一「レトロトランスポゾン SINE B1 と相同配列を持つ核内ノンコーディング RNA によるグローバルな遺伝子発現制御」日本遺伝学会ワークショップ「転移因子と宿主の相互作用」, 2013 年 9 月 19 日、慶応大学日吉 キャンパス

中川真一「核内ノンコーディング RNA が制御する生理現象」第 4 回日本 RNAi 研究会、広島、2012 年 8 月 30-9 月 1 日

Nakagawa, S. " Nuclear Noncoding RNA Neat1 Regulates Corpus Luteum Development in Aged Animals", 22nd CDB meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II", Kobe, Japan, June 12th, 2012.

Nakagawa, S. "An Architectural Long Noncoding RNA NEAT1 Controls Corpus Luteum Formation in an Age-Dependent Manner", Keystone Symposia "Non-Coding RNAs", Snowbird, Utah USA, March 31-April 5, 2012.

中川真一「核内長鎖ノンコーディング RNA と疾患との関連」第 9 回 RCGM フロンティアシンポジウム「遺伝子発現制御と RNA-基礎と臨床をつなぐ分子」, 埼玉医科大学、2011 年 11 月 3 日。

Nakagawa, S. "Nonessentials for nothing? Nuclear bodies paraspeckles are not essential for animal's life" 第 63 回日本細胞生物学会大会シンポジウム、札幌、2011 年 6 月 29 日。

〔その他〕

日本語総説

中川真一、石田賢太郎「mRNA 非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入配列による転写後遺伝子発現制御 潜在的な遺伝的変異の蓄積と表現型としての多様性の急激な解放」 実験医学増刊号, 31(7) 115-121 (2013)

中川真一 「転移因子・ウイルスと宿主のせめぎ合いによりもたらされるゲノム進化」 実験医学増刊号, 31 (7), 83-90 (2013)

中川真一 核内構造体に活躍の場を求めたノンコーディング RNA たち 細胞工学, 734-739 (2011)

中川真一、影山裕二 長鎖 ncRNA 研究のはじまりの終わり 実験医学, 29 (11),1702-1707 (2011)

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/associate/rna_biol/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中川 真一 (Nakagawa Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川 RNA 生物学研究室・准主任研究員

研究者番号：50324679