

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18570157  
 研究課題名（和文） 機能性RNAの生合成過程に関する研究

研究課題名（英文） A study of functional RNA biogenesis

## 研究代表者

牛田 千里 (USHIDA CHISATO)  
 弘前大学・農学生命科学部・准教授  
 研究者番号：50250593

研究成果の概要：多細胞生物における内在性 ncRNA の合成や局在を決定する分子メカニズムの解明、制御機構の理解を目指し、またこれらについての新たなシステムの発見を期待して、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の新規 ncRNA の転写や局在を解析した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝情報複製・転写装置・再編・制御・non-coding RNA

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、RNA 干渉の発見や、それにつづく miRNA の同定、それらが関与する生命現象の多様性や、マウス cDNA 解析による膨大なアンチセンス RNA の存在が明らかとなり、ncRNA の重要性が俄にクローズアップされてきていた。siRNA、miRNA の合成に関与する因子の同定や合成メカニズムの解析が進む一方で、他の新規 ncRNA の機能や生合成経路に関しては依然不明の点が多く残されており、国内外を問わず ncRNA に関する多くの研究が miRNA、siRNA を対象としたものであった。申請者は本研究開始以前に線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の新規 ncRNA 候

補を数十種類得ていた。これらの中には miRNA や siRNA、mRNA-like ncRNA には属しないと予想されたものも多く含まれており、申請者はそれらの機能や構造の解明に取り組んできた。

## 2. 研究の目的

細胞内には予想外に多種多様な ncRNA が存在し、様々な生命現象に関わっていることを示す例が次々と発見されてきている。生命の全体像を把握するためには、DNA やタンパク質だけに注目していたのでは不十分であり、ncRNA についてもその機能は勿論のこと、生

体内での合成から分解に至るまでの挙動について理解を深めることが必須である。

本研究課題では、複雑な遺伝子ネットワークの中で ncRNA が如何に合成され、機能する場にたどり着くかという問題を明らかにすることを目的とした。特に、既知 RNA ファミリーには属さないことが予想された新しいタイプの機能性 ncRNA (いずれも 50-500 nt) を解析の対象に加えることで、新たな RNA 合成メカニズムの発見や、RNA 合成制御システムの解明へとつなぐことを目指した。

### 3. 研究の方法

線虫には 50-500 nt の大きさをもつ ncRNA が約 100 種類存在する。これらの約半数は機能未知であり、その生合成経路も定かではない。本研究開始当初は CeR-2 RNA もその一つであったが、最近の申請者らの研究により、これが rRNA のプロセッシングに関連した働きをもつことがわかってきた。本研究課題は、広く ncRNA の生合成経路について解析を進めることを目的としたものであるが、具体的に研究を進めるにあたって、CeR-2 RNA 遺伝子 (*cer-2a*) を中心に据えた。その理由は、CeR-2 RNA コード領域上流に進化的に保存された配列 (cer2CE) が存在すること、cer2CE に類似した配列は他の RNA 遺伝子上流にも存在すること、これらの RNA の中には組織特異的な発現を示すものや、CeR-2 RNA とは異なる細胞内局在を示すものがあることがわかっており、CeR-2 RNA の転写や局在を決定する機構を解明することにより、他の RNA の生合成経路やその制御についても大きなヒントを得られると考えたからである。用いた方法は下記 (1) ~ (3) である。

#### (1) cer2CE と既知プロモーターとの配列比較

cer2CE を既知の線虫プロモーター配列、とくにコードする領域から同様の距離に位置するようなプロモーターの配列と比較した。

#### (2) 免疫沈降法による RNA キャップ構造の同定

$\alpha$ TMG 抗体を用いて、線虫の RNA 抽出液に対して免疫沈降実験を行った。対照実験として、U3 snoRNA (ポジティブコントロール)、U6 snRNA (ネガティブコントロール) を用いた。

(神戸大学、藤原俊伸准教授との共同研究)

#### (3) cer2CE を用いたゲルシフトアッセイ

cer2CE を含む DNA 断片を放射性同位体で標識し、線虫の細胞抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。また、反応液に標識していない DNA 断片を加えることにより、競合実

験を行い、*cer-2a* 上流のどの領域にトランスに働く因子が結合しているか調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) cer2CE と PSE の配列比較

近縁種ゲノムに保存されていた上流配列 cer2CE は、U1、U2、U4、U5 snRNA、SL RNA の各遺伝子上流にある近位配列要素 (proximal sequence element, PSE) と類似していることがわかった。このことから、CeR-2 RNA はこれらの RNA と同じ、もしくは類似したメカニズムで、RNA ポリメラーゼ II により転写されるものと予想された。

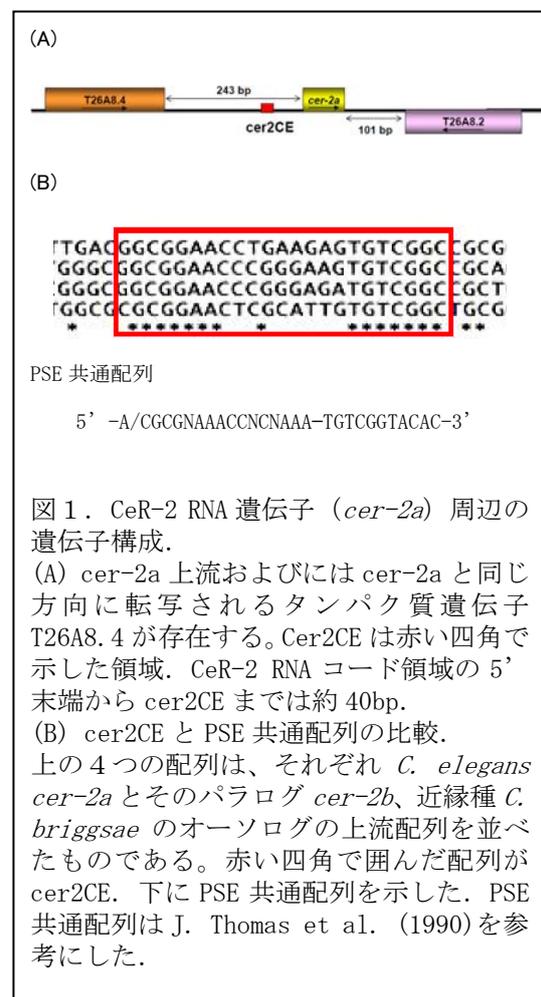


図 1. CeR-2 RNA 遺伝子 (*cer-2a*) 周辺の遺伝子構成。

(A) *cer-2a* 上流およびには *cer-2a* と同じ方向に転写されるタンパク質遺伝子 T26A8.4 が存在する。Cer2CE は赤い四角で示した領域。CeR-2 RNA コード領域の 5' 末端から cer2CE までは約 40bp。

(B) cer2CE と PSE 共通配列の比較。

上の 4 つの配列は、それぞれ *C. elegans cer-2a* とそのパラログ *cer-2b*、近縁種 *C. briggsae* のオーソログの上流配列を並べたものである。赤い四角で囲んだ配列が cer2CE。下に PSE 共通配列を示した。PSE 共通配列は J. Thomas et al. (1990) を参考にした。

#### (2) 免疫沈降法による RNA キャップ構造の同定

U1、U2、U4、U5 snRNA および SL RNA はいずれも 5' 末端に 2, 2, 7-トリメチル G キャップ (TMG) 構造をもつ。転写とキャップの付加は深く関連しており、5' 末端の構造を調べることで、着目している RNA がどの RNA

ポリメラーゼによって転写されるか推定できる。そこで、 $\alpha$ TMG 抗体を用いて免疫沈降実験を行い、沈殿に CeR-2 RNA が含まれるか否かノザンハイブリダイゼーションにより調べた。この結果、CeR-2 の 5' 末端には TMG キャップが付加していることが強く示唆さ

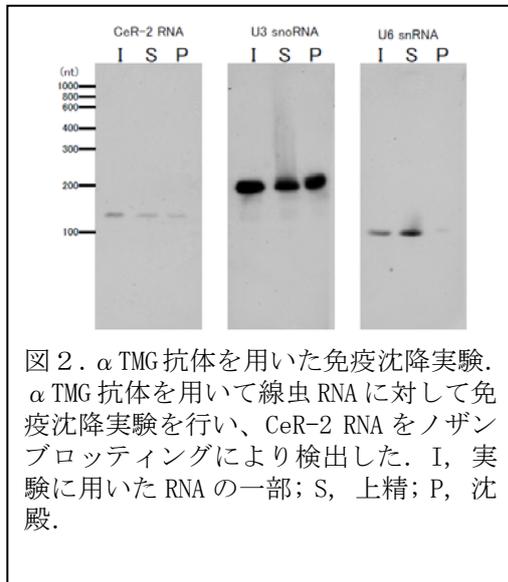


図 2.  $\alpha$ TMG 抗体を用いた免疫沈降実験。  
 $\alpha$ TMG 抗体を用いて線虫 RNA に対して免疫沈降実験を行い、CeR-2 RNA をノザンブロッティングにより検出した。I, 実験に用いた RNA の一部; S, 上精; P, 沈殿。

れた。

### (3) cer2CE を用いたゲルシフトアッセイ

cer2CE を含む 167bp の DNA 断片 cer2CE-a (CeR-2 RNA コード領域の 5' 末端を+1 として、-142~+25 の領域) を放射性同位体で標識し、線虫の細胞抽出物もしくは核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行った。この結果、2 本のシフトしたバンド (cer2CE-I、cer2CE-II) が検出された。次に、cer2CE-a の部分配列を持つ DNA 断片 (放射性同位体による標識はしていない) を用いた競合実験を行った。この結果、CeR-2 RNA コード領域上流-142~-113 の DNA 断片 (30bp) を反応に加えることによって cer2CE-I が、cer2CE に相当する-67~-42 の DNA 断片 (26bp) を反応に加えることによって cer2CE-II が薄くなった。これらは、それぞれの領域に配列特異的に結合する因子が存在することを示唆している。

ヒトの U1、U2、U4、U5 snRNA 遺伝子上流にも PSE が存在し、プロモーターとして働く。ここに 5 つのサブユニット (SNAP190、SNAP50、SNAP45、SNAP43、SNAP19) からなる転写因子 SNAPc が結合して RNA ポリメラーゼ II による転写が始まる。ヒト U snRNA 遺伝子の場合、上流約 200 bp の位置に、もう一つ別の保存された配列、遠位配列要素 (distal sequence element, DSE) が存在する。ここに Oct-1 が結合し、PSE に結合した SNAPc に作用して、転写が活性化される。

上記ゲルシフトアッセイの結果から、cer2CE にもヒト SNAPc の線虫ホモログが結合

し、RNA ポリメラーゼ II による転写が開始されることが考えられた。そこで、ヒト SNAPc を構成する 5 つのサブユニットのアミノ酸配列をもとに、線虫ゲノムに対してホモロジー検索を行った。SNAP190 および SNAP50 に対しては、それぞれ F32H2.1、F18A11.6 が類似した配列をもつものとして同定された。SNAP45 に対しては ZK84.1 が、SNAP43 に対しては C06A8.2 と F08F3.9 の 2 つが、候補としてあがったが、配列の類似性は前者 2 つに比べると低かった。SNAP19 に類似した配列をもつタンパク質は検出されなかった。

ヒト DSE に相当する保存配列は、CeR-2 RNA 遺伝子上流、あるいは線虫 U snRNA 遺伝子や SL RNA 遺伝子には今のところ見つかっていない。しかし、本研究で得られたゲルシフトアッセイの結果は、cer2CE の上流にも配列特異的に結合する因子が存在することを示唆した。このトランス因子の同定は今後の課題として残された。これがヒト DSE に結合する Oct-1 と類似したタンパク質であるか否か、そして、cer2-a の転写に機能するか否か、また、SNAPc 相当の複合体が SNAP19 ホモログを欠いていたとしても PSE に形成され、ヒト U snRNA 遺伝子の転写と同様なメカニズムをもって、線虫でも CeR-2 RNA や U snRNA、SL RNA の転写に機能するか否か等々、今後明らかにすべき新たな課題が多く出てきた。

### (4) cer2CE と類似した配列を上流に持つ機能未知低分子 ncRNA 遺伝子の発現

線虫には cer2CE と類似した上流配列をもつ機能未知の ncRNA が数種類存在する。これらの発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析したところ、組織特異的な発現を示すものが 2 種類検出された。そこで、それぞれのの上流約 1 kbp の DNA 断片を放射性同位体で標識して、線虫細胞抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、シフトしたバンドが検出され、やはりトランスに働く因子の存在が示唆された。dI-dC を用いた競合実験ではシフトしたバンドに影響がなかったのに対し、標識していないそれぞれの DNA 断片を競合剤として反応液に加えた場合は、シフトしたバンドに変化が見られた。このことは、トランスに働く因子が配列特異的にそれぞれの RNA 遺伝子上流配列に結合している可能性を示唆している。細胞抽出液を DEAE カラムで分画した後、それぞれの画分を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、特定の画分に結合因子が含まれていることがわかった。

## 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 2 件)

- ① Sasano, Y., Hokii, Y., Inoue, K., Sakamoto, H., Ushida, C., Fujiwara, T. Distribution of U3 small nucleolar RNA and fibrillarin during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochimie* 90: 898-907, 2008. 査読有
- ② Yusuke Hokii, Akiyoshi Kubo, Takahiro Ogasawara, Yuhkou Nogi, Akito Taneda, Risa Arai, Akira Muto, Chisato Ushida. Twelve novel *C. elegans* RNA candidates isolated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Gene* 365: 83-87, 2005. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 保木井悠介、佐藤洋旭、武藤昱、牛田千里。核小体局在を示す線虫新規ncRNA。第10回日本RNA学会年会。2008年7月23-25日。札幌コンベンションセンター。
- ② Chisato Ushida, Yuki Sugawara and Yusuke Hokii. Expression and localization of *C. elegans* CeR-5 RNA. Keystone symposium, RNAi, MicroRNA, and Non-coding RNA. March 25-30, 2008. Whistler Resort, Whistler, British Columbia, Canada.
- ③ 牛田千里、保木井悠介、菅原由起、遠藤優子、佐藤洋旭、武藤昱。線虫新規低分子ncRNAの局在解析。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会。2007年12月11-15日。パシフィコ横浜
- ④ 菅原由起、保木井悠介、武藤昱、牛田千里。線虫snoRNPタンパク質遺伝子ノックダウン株におけるsnoRNAの局在変化。第9回日本RNA学会年会。2007年7月28-31日。名古屋国際会議場。
- ⑤ 保木井悠介、笹野有未、藤原俊伸、坂本博、武藤昱、牛田千里。受精前後の卵における線虫*Caenorhabditis elegans*核小体低分子RNAの動態。第9回日本RNA学会年会。2007年7月28-31日。名古屋国際会議場。
- ⑥ 牛田千里、小笠原隆広、天川純一、遠藤優子、菅原由起、武藤昱、保木井悠介。線虫の機能RNomics。第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会。2007年5月28-30日。福岡国際会議場。
- ⑦ Hokii, Y., Sugawara, Y., Endo, Y., Mizuki, Y., Harada, F., Konno, T., Himeno, H., Muto, A., Ushida, C. Spatio temporal distribution patterns

of *C. elegans* small ncRNAs. East Asia *C. elegans* Meeting. Nov. 15-18, 2006. Hoam Convention Center, Seoul National University, Seoul, Korea.

- ⑧ 保木井悠介、笹野由未、藤原俊伸、坂本博、種田晃人、武藤昱、牛田千里。 *C. elegans* 低分子RNA CeR-2 RNAの細胞内局在と合成。日本RNA学会。2006年7月18-20日。淡路夢舞台国際会議場。
- ⑨ Yusuke Hokii, Masayoshi Shimoyama, Akira Muto, Chisato Ushida. Characterization of Cen21/CeR-2 RNA, small ncRNA localized in *Caenorhabditis elegans* nucleoli. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. June 18-23, 2006. Kyoto, Japan.
- ⑩ Chisato Ushida, Yusuke Hokii, Yuki Sugawara, Yuko Mizuki, Yuko Endo and Akira Muto. Expression of *C. elegans* novel ncRNAs. Regularoty RNAs, the LXXI Cold Spring Harbor Symposium. May 31-June 5, 2006. Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.

[図書] (計 2 件)

- ① Chisato Ushida, Yusuke Hokii. Isolation and characterization of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. John Rossi and Rajesh K. Gaur eds. Regulation of Gene Expression by Small RNAs. CRC Press, Florida, U. S. A. Chapter 7, pp. 101-122, 2009.
- ② 牛田千里、線虫にみるRNA機能の多様性、河合剛太、金井昭夫 (編集)、機能性 Non-coding RNA、第1部第2章、55-68頁、クバプロ (2006年)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田 千里 (USHIDA CHISATO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50250593