

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19870036

研究課題名（和文）新規 mRNA 様ノンコーディング RNA である Gomafu の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Gomafu, the mRNA-like non-coding RNA

研究代表者

築地 仁美 (TSUIJI HITOMI)

独立行政法人理化学研究所・中川独立主幹研究ユニット・ユニット研究員

研究者番号：40455358

研究成果の概要： ゲノムから転写された RNA のうち、プロセッシングを受けた分子は mRNA となり、細胞質へ移動し、蛋白質が翻訳される際の鋳型となる。近年、細胞質へ移動することなく核内で蓄積し機能を持つ mRNA の存在と重要性が指摘されており、本研究ではその一つである Gomafu RNA の機能と核内繫留メカニズムの解析を行った。Gomafu RNA に結合する蛋白質を同定し、そのうちスプライシングに関する因子について詳細な結合様式と機能制御を解析した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

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：ノンコーディング RNA、スプライシング、mRNA、核内繫留、核外輸送、神経

## 1. 研究開始当初の背景

一連のゲノム解析の結果、ゲノムの大きさは高等生物で大きくなるのに対し、遺伝子の量、すなわち蛋白質の鋳型として働く mRNA の量は、種間でほとんど変わらないことがわかってきていた。高等生物では、遺伝子として使われるゲノムの情報は、ほんの約 2% しかない。ではなぜ高等生物では巨大なゲノムが必要だったのであろうか。一方ゲノムの大半は転写されていて、大量の RNA が細胞

内に存在することも新たにわかってきていた。そこで我々は、RNA が RNA そのものとして機能を持つ、機能性ノンコーディング RNA が、高等生物の生命現象に大変重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

細胞の遺伝情報を持ったゲノムから RNA が転写され、そのうちプレカーサー mRNA はプロセッシングを受けて成熟した mRNA になり、核から細胞質へ輸送され、タンパク質合成の鋳型となる。しかし、研究代表者の所

属する研究室では、分子の特徴としては成熟型 mRNA であるが、細胞質へ輸送されず、核内に蓄積する新規 mRNA 様ノンコーディング RNA をクローニングしていた。Gomafu と命名されたこの RNA は、成熟型 mRNA の特徴を持つにも関わらず、鋳型として以外の機能を持つことが予測される。

Gomafu は、マウス網膜組織で細胞タイプ特異的に発現する遺伝子として同定された、全長約 9 kb の、新規 mRNA 様ノンコーディング RNA である (Sone et al., 2008 *J. Cell Science*)。この分子は発生を通じて神経組織にのみ発現し、その中でも特定の神経細胞に限局して発現する。この分子の大変ユニークなところは、mRNA の特徴を持つにも関わらず、核内へ保持される、蛋白をコードしないノンコーディング RNA である、核内で新規構造体を形成する、生化学的には核マトリックスという転写や複製に関わる分子の濃縮する画分に存在する、ことである。

一般に核内で転写された前駆体 mRNA は、イントロン除去、5' 末端へのキャップ構造の付加、3' 末端への poly A 付加というプロセッシングを受けて成熟し、速やかに核外へ輸送される (Bentley, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002, 2005, for review, )。しかし Gomafu RNA は成熟した mRNA の特徴を持つにも関わらず、核外へ輸送されず、核内へ留まる。

また核内には、核小体、核スペckル、パラスペckル、PML Body、や Cajal Body 等の様々な構造体が確認されており、それらの役割は詳細に研究されている (Spector, *Cell* 2006, for review )。

しかし Gomafu RNA の局在シグナルはこれら既知構造体のマーカーとは重ならず、新規の核内構造体を構成すると考えられる (図 1)

核内に蓄積し構造体を作っている mRNA 様のノンコーディング RNA は、数個しか報告

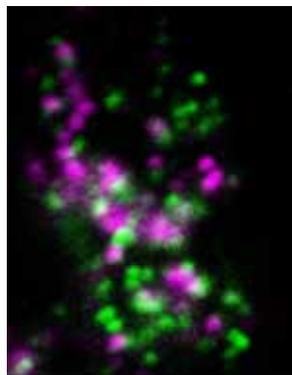


図1、Gomafu (緑) と核スペckルマーカーのSC35 (紫) は共局在しない。一つの核が示されている。

がなく、そのうち Xist RNA を除いて、機能はほとんどわかっていなかった。Xist RNA は、ほ乳類の性差による遺伝子量を補正するために必須である、大変重要な RNA である。しかしこれら長鎖 mRNA 様ノンコーディング RNA の研究は、RNA が長鎖であること、界面活性剤に難溶性であること等から、解析が困難であった。

## 2. 研究の目的

Gomafu 分子の大変ユニークなところは、mRNA の特徴を持つにも関わらず、核内へ保持される、蛋白をコードしないノンコーディング RNA である、核内で新規構造体を形成する、生化学的には核マトリックスという転写や複製に関わる分子の濃縮する画分に存在する、ことである。

細胞には不要な RNA を速やかに分解する機構があるので、Gomafu RNA が核内にドット状に局在しているという事実は、Gomafu を特異的に認識し核内で安定化させ、積極的に核内に保持する未知のメカニズムが存在していることを予想させる。興味深いことに、蛋白合成阻害剤処理により Gomafu RNA の分解が進む。このことは、半減期の短い蛋白質によって Gomafu RNA が核内で安定化していることを示している。

また、生化学的に核マトリックスという転写や複製に関わる分子の濃縮する画分に存在するという事実は、Gomafu がこれらの機能を調製する可能性を示唆する。

そこで本研究では、Gomafu RNA に結合する蛋白質を同定し、Gomafu RNA の核内保持の機構、Gomafu RNA が局在する新規核内構造体の構成成分と機能を明らかにし、神経組織における Gomafu RNA の機能の解明を目指す。それにより、核内 mRNA 様ノンコーディング RNA という分子群の機能、核内繫留メカニズムの解明を目指すことを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) Gomafu 結合タンパク質の同定

特定の分子 A に結合する分子 X を同定する場合、まず分子 A を固相化した担体と、分子 X が含まれる溶液を用いたアフィニテ

イー精製を行うのが一般的である。しかしながら核内には非特異的にRNAに結合する蛋白質が多く存在しており、Gomafu RNAを固相化した担体と核抽出液を用いた精製を行っても、非特異的に結合する蛋白質が大量に濃縮され、Gomafu RNAに特異的に結合している蛋白質を同定するのは非常に困難であることが予想される。さらに、Gomafu RNAは難容性であり、通常非イオン系界面活性剤やナトリウム、カリウム等の塩溶液では核から可溶化することが出来ない。

そこで、まず核内局所で特異的にGomafu RNAと結合している蛋白質をGomafu RNAに架橋させ、高濃度の尿素もしくはグアニジン塩の存在下で可溶化し、核酸のハイブリダイゼーションを利用してGomafu RNA/蛋白質複合体を精製することを試みる。そのような条件下では、蛋白質は変性した状態を保ったまま、核酸のハイブリダイゼーションは進行するので、精製過程における蛋白質の非特異的なRNAへの結合は抑えられるはずである。

具体的な手順としては、細胞をUV照射することで蛋白質をRNAに結合させる、Gomafu RNAをアフィニティーカラムで精製する、そこに結合している蛋白質をSDS-PAGEとMALDI-TOF質量分析法で同定する、の3段階に分けられる。

#### (2) 進化の過程で保存された領域に結合する蛋白質の同定

機能ドメインは進化の過程で保存されていることが多いため、種間でホモロジーの高い領域に着目し、配列を詳細に検討したところ、UACUAACという、7残基の繰り返し配列が存在することを見出した。これは正しく酵母のブランチポイント配列であった。ほ乳類ではそのブランチポイント配列の特異性は緩いが、酵母では厳しく決まっている。この配列は、通常イントロンにありイントロン除去のシグナルとして働く。その配列がGomafuのエクソン上に繰り返して存在したということなので、何か重要な役割を果たしているのではないかと考えられるため、結合タンパク質の同定を行う。

#### (3) Gomafuの繫留を阻害する薬剤の同定

Gomafu RNAは成熟mRNAの特徴を持つにも関わらず、細胞質へ輸送されず核内に繫留される。よってその繫留を阻害する薬剤を探求し、その薬剤の作用機序から、Gomafu RNAの核内係留メカニズムの解明を目指す。

#### (4) Gomafuの核内繫留ドメインの同定

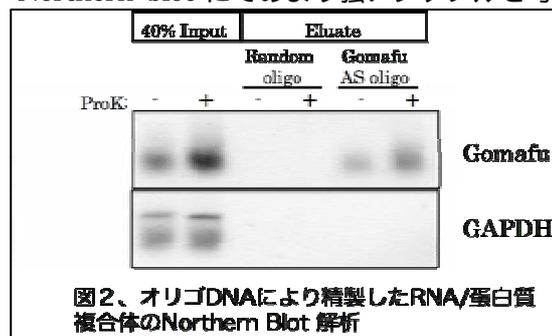
Gomafuは約9 kbの長鎖ノンコーディングRNAであるので、断片化しそれぞれを細胞へ発現させることで、どの部位が核内繫留を担っているのか確かめる。

### 4. 研究成果

#### (1) Gomafu結合タンパク質の同定を目指したGomafu/蛋白質複合体の精製

条件検討の結果、Gomafu/蛋白質複合体の精製方法を確立した。まず、細胞をUV照射することで、RNAと蛋白質を不可逆的に架橋した。次に、細胞を可溶化し、oligo d(T)カラムを用いて、mRNA/蛋白質複合体を粗精製した。長いRNAを精製するのは効率が悪かったため、まずsonicationで2 kb程に断片化した。それからGomafu全長に分布するように設計した、22種類のピオチン化アンチセンスオリゴDNAを、Gomafu RNAにハイブリダイズさせ、ストレプトアビジンビーズで沈降した。

Oligo d(T)カラムでmRNA/蛋白質複合体が精製できたかどうかは、精製物をProteinase Kで処理し、溶出されたRNAをNorthern blotにて検出することで確認した。Oligo d(T) DNAで精製し、sonicationにより断片化した、inputのmRNA/蛋白質複合体は、Gomafuに対するプローブを用いたNorthern blotにてあまり強いシグナルを与



えなかったが、Proteinase K で処理することでシグナルが増強した(図2、レーン1、2)。これは RNA/蛋白質複合体から蛋白質が除かれることで、Northern blot の検出感度が上昇したためと考えられた。すなわち、この調製した input 画分の Gomafu-RNA には、蛋白質が結合していることがわかった。この poly A(+) RNA/蛋白質複合体溶液から、Gomafu のアンチセンスオリゴ DNA で Gomafu/蛋白質複合体を精製した。コントロールのランダムオリゴで精製した場合は Gomafu が精製されないが、Gomafu のアンチセンスオリゴでは、Gomafu が精製できていることがわかった(図2、レーン3、5)。更に Preproteinase K で処理するとシグナルが上昇すること(図2、レーン6)から、蛋白質が結合した状態で Gomafu が pull down されていることが確認された。GAPDH mRNA はいずれの場合にも検出されないことから、精製の特異性が確認された(図2、下段)。

この Gomafu/蛋白質複合体の精製物を RNase A/T1 で処理し、Gomafu 結合蛋白質を溶出し電気泳動後、銀染色で可視化した。残念なことに、コントロール RNA と比較し Gomafu 特異的に結合した蛋白質が再現よく可視化されることはなかった。これは充分量の Gomafu 結合蛋白質が精製できなかったためと考えられ、この方法での結合タンパク質の同定は現実的ではないことがわかった。

## (2) 進化の過程で保存された領域に結合する蛋白質の同定

(1)の方法で Gomafu の全長 RNA に結合する蛋白質は単離できなかったため、別のアプローチで Gomafu 結合タンパク質を同定することにした。Gomafu の種間でホモロジーの高い領域に、UACUAAC という7残基の繰り返し配列が存在することを見出した。これは正しく酵母のブランチポイント配列であった。ほ乳類ではそのブランチポイント配列の特異性は緩いが、酵母では厳しく決まっている。この配列は、通常イントロンにありイントロン除去のシグナルとして働く。その配列が Gomafu のエクソン上に繰り返して存在したということなので、何か重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

そこで7残基が3回繰り返し返す部位の RNA を合成し、ここに結合する蛋白質を同定することを試みた。コントロールとして、7残基の2カ所に変異を入れ、ブランチポイント配列としては働かないものを用いた。合成した RNA をピオチン化標識し、細胞抽出液と混ぜて、ストレプトアビジンビーズで沈降させ、RNA を切断することで蛋白質を溶出し、銀染色で可視化した(図3)。変異を入れた RNA と比較し Gomafu の繰り返し配列に特異的に結合する蛋白質があったため、これを LC/MS/MS にて同定したところ、矢印で示した2本のバンドは Splicing factor 1 (SF1)であった。これは Western blot でも確認した。SF1 は酵母で取れた branch point binding protein のオースログであり、理にかなったものが取れてきたと考えている。

Gomafu を発現させた Neuro2A 細胞または Hela 細胞において、Gomafu と SF1 が一部共局在を示した。よって細胞内でも両者が複合体を作り、スプライシング反応の調製等何らかの機能を果たすことが示唆された。

## (3) Gomafu の繫留を阻害する薬剤の同定

Spliceostatin A (SSA)は、もともと抗がん剤としてスクリーニングされた低分子化合物の安定誘導体で、スプライシングを阻害すること、さらに通常は核内に留まらなければならない Pre-mRNA の一部が核外へ輸送される(Kaida et al., 2008, Nat Chem Biol)。SSA を細胞に処理すると、正常蛋白質が翻訳される他に、pre-mRNA が細胞質へ異常に輸送され、異常型の蛋白質も翻訳される。そこでこの SSA をご供与頂き、Gomafu の核内係留への影響を調べた。すると、SSA 投与により Gomafu の核内繫留が阻害され、細胞質へ輸送されることが *in situ* hybridization によりわかった。これはさらに、細胞質と核を分

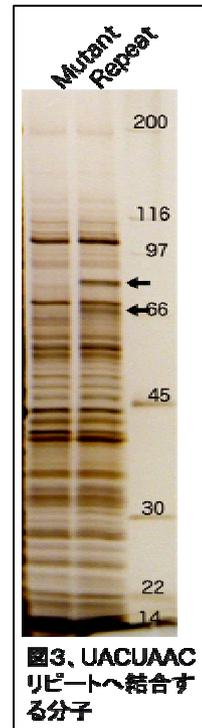


図3. UACUAAC リピートへ結合する分子

画したのから抽出した RNA の Northern 解析でも確認した。

次に、SSA 投与と未投与細胞の可溶化溶液から、SSA のターゲットする蛋白質である SF3b の免疫沈降を行い、SF3b を含むタンパク質複合体 (スプライソソーム) の構成成分が SSA 処理によりどのように変化するか調べた。その結果、特定の分子群 (主に U5 構成因子) が SSA 投与でスプライソソームから離れていることがわかった (図 4)。

これにより、Gomafu の機能や核内繫留因子とスプライシング反応に関する蛋白質の複合体の候補が見えてきた。

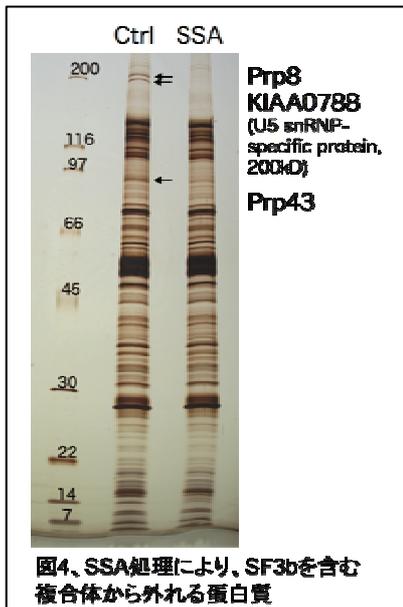


図4、SSA処理により、SF3bを含む複合体から外れる蛋白質

(4)  
)  
G  
o  
m  
a  
f  
u  
の  
核  
内  
繫  
留  
ド  
メ  
イ

ンの同定

約 9 kb である Goamfu を 1 kb ずつに断片化し、それぞれを cDNA 発現ベクターに組み込み、Hela へ発現させたところ、4 種の Gomafu-RNA 断片が核内へ繫留し、5 種類の断片は細胞質へと輸送された。これにより、核内繫留に必要なドメインが絞られた。さらに、それぞれの断片はその局在と SSA への感受性が異なり、核内繫留メカニズムの多様性が示された。

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

曾根正光、築地仁美、甲斐田大輔、吉田

稔、中川真一、「神経特異的 mRNA 様 non-coding RNA である Gomafu の核内繫留メカニズムの解析」、第 10 回日本 RNA 学会年会、2008 年 7 月、札幌

築地仁美、曾根正光、中川真一、「mRNA 型ノンコーディング RNA である Gomafu の生化学的性質の検討」、第 9 回日本 RNA 学会年会、2007 年 7 月、京都

[ その他 ]

ホームページ等

[http://www.riken.jp/lab-www/nakagawa/index\\_j.html](http://www.riken.jp/lab-www/nakagawa/index_j.html)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

築地 仁美 ( TSUIJI HITOMI )

独立行政法人理化学研究所・中川独立主幹

研究ユニット・ユニット研究員

研究者番号 : 40455358