

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791374

研究課題名 (和文) ノンコーディング遺伝子 *U50HG* および U50 snoRNA によるリンパ系機能制御研究課題名 (英文) Involvement of non-coding gene *U50HG* and U50 snoRNA in lymphatic system

研究代表者

添野 雄一 (SOENO YUUCHI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70350139

研究成果の概要 (和文)：リンパ系組織で高発現する U50 snoRNA の生理機能を明らかにする目的で、U50 (mU50)欠損マウスを作出し、C57BL/6 系統へバッククロスして表現型解析を行った。欠損マウスでは mU50 による rRNA メチル化も減少しており、野生型と比してリンパ腫等の異常が有意に高まっていた。また、*U50HG* プロモータ領域の解析では、リンパ系細胞での U50 発現における c-MYC, BCL6 の関与を見出した。

研究成果の概要 (英文)：To elucidate the not-yet-known function of U50 snoRNA we generated an mU50-deficient mouse line. In this mouse line, mU50-targeted methylations on the rRNA were reduced as with the reduction of mU50 expression. The mU50-deficient mice were indistinguishable from wild-type littermates at sight, but some of those animals were prone to have defects in lymphatic organs. Regarding to the strong U50 expression in hematopoietic lineages, promoter analyses revealed the involvement of c-MYC and BCL6 in the transcription of the host-gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

低分子核小体 RNA (snoRNA) はリボソーム翻訳装置の成熟に働くノンコーディング RNA であり、酵母からヒトまで幅広い生物種で見出

されている。真核生物の snoRNA は宿主遺伝子のイントロン内にコードされており、その転写・スプライシング産物から独自のプロセッシングを経て成熟 RNA 分子となる。成熟

snoRNA はリボ核タンパクと複合体 (snoRNP) を構築して核小体に局在している。それぞれの snoRNA 分子特異的な塩基配列 (ガイド配列) を介して rRNA 前駆体の標的部位に相補結合し、酵素活性を持つコアタンパクがヌクレオチドを修飾・切断する。snoRNP は snoRNA 分子中のコンセンサス配列により box C/D 型と H/ACA 型とに大別されており、機能的にはリボース 2'-O-メチル化とシュードウリジル化を触媒する。snoRNA の宿主遺伝子はリボソームタンパク (RP) などの翻訳関連分子として、それ自身が転写・翻訳されることもあるが、タンパクをコードしないノンコーディングの宿主遺伝子も見つかっている。

研究計画立案当時では、臓器特異的に働く snoRNA や作用未確定の snoRNA が相次いで見出されており、高等生物における snoRNA の生理的役割の再検討とともに疾患の成り立ちとの関連について関心が高まっていた。高等生物における分子機能解析に向けては欠損動物モデルを樹立することが必須となるが、それまでの snoRNA 欠損モデルは酵母にとどまっており、単一の snoRNA を欠損したマウスモデル等は報告されていなかった。

U50 欠損マウス作出に先立ち、我々は U50 のマウスオルソログ (mU50) の検索から、マウスゲノムでは *mU50HG-a* および *mU50HG-b* の 2 種類の宿主遺伝子があることを見出した。FISH 解析により、両宿主遺伝子はマウス 9 番染色体 E 領域に近接して配置されていることも明らかにした。マウスゲノムデータベースにおける *mU50HG-b* マッピング領域が FISH 解析結果と符合し、ゲノム構造解析からも *mU50HG-b* が *U50HG* オルソログに相当すると考えられた。一方、*mU50HG-a* 遺伝子座は、研究開始当時整備中であったゲノムデータベースでは染色体上にマッピングされていなかった。これらの研究到達状況を踏まえて、

我々は *mU50HG-b* インترون中の mU50 配列を欠損させたマウスモデルを作出した。この欠損マウスでは *mU50HG-b* 遺伝子構造は保たれた状態であり、ノンコーディング RNA として機能未知である宿主遺伝子自体の転写は正常に行われるよう工夫した。

## 2. 研究の目的

U50 とノンコーディング宿主遺伝子 *U50HG* は、300 種を超えるヒト snoRNA の中で唯一リンパ腫の染色体転座と関連して見出された経緯から、リンパ・免疫システムの恒常性を指標にした分子動態の解析に供することのできる貴重な実験モデルと考えられ、snoRNA 欠損マウス作出の着想に至った。したがって本研究では、リンパ腫細胞株および我々の作出した mU50 欠損マウス (以下  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスと表記) を用いて、U50 分子発現の制御と生理的機能、分子欠損によるリンパ系システムの異常と病態の解明を目指した。申請した 2 年間での到達目標として、リンパ細胞での U50 発現様式 (*U50HG* ホスト遺伝子転写) と実際のリンパ装置 (胸腺・脾臓・リンパ節) における U50 snoRNA 分子の局在・動態を明らかにすること、snoRNA 機能解明を目的として各種臓器での U50 発現と rRNA メチル化レベルとの相関を検証すること、 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスの加齢ともなう表現型変化を調べることにより mU50 欠損状態が動物個体の生理機能に及ぼす影響を明らかにすることを設定した。

## 3. 研究の方法

作出した  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスは日本歯科大学生物科学施設で交付期間 (2 年間) にわたり系統交配を続けて C57BL/6 系統へのバッククロスを完了した。この飼育途上において、ヌル・ヘテロ型動物を用いた実験を継続した。

全ての実験操作は日本歯科大学組換え DNA 実験安全委員会および生物科学実験委員会のガイドラインに従って行った。試料採取に際しては麻酔による安楽死後速やかに臓器を摘出し、病理組織学的解析には 4%ホルムアルデヒド固定あるいは OCT コンパウンド包埋後、冷アセトンにて凍結した。RNA 解析では摘出後ただちに液体窒素冷凍し-80°Cで保存した。

$\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウス表現型解析では、対照となる野生型群とともに最長 100 週齢までの飼育・観察を行った。リンパ球成熟のモニタリングでは、野生型および  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> 成体マウスから末梢血を微量採取し、Vetscan 装置(茶谷産業)により血液性状を検査した。

造血系組織における mU50 高発現細胞の同定には FISH および分画した細胞のノザン解析を行った。B リンパ球採取の目的では B220 抗体-磁性ビーズ (Invitrogen) と FACS を併用した。RNA は ISOGEN 試薬 (Nippon Gene) にて抽出し、ノザン解析および cDNA ライブラリー作製に供した。ホスト遺伝子および関連転写因子の発現変化は RT-PCR およびリアルタイム PCR にて検証した。mU50 発現に関しては、<sup>32</sup>P 標識プローブを用いたノザンプロットで検出した。rRNA メチル化を調べる目的では、蛍光標識オリゴマーを用いたプライマーエクステンションを行い、電気泳動後、Typhoon 装置 (GE lifesciences) で検出した。

*U50HG* 転写制御因子の解析では、ヒトリンパ腫細胞株を用いて ChIP 法とレポーターアッセイを行った。細胞株 (Ramos, U937) は 10%ウシ胎仔血清を添加した RPMI1640 培地に懸濁し、5%炭酸ガス雰囲気下、37°Cで培養した。

#### 4. 研究成果

(1) mU50 欠損マウスの解析  
ジーンターゲティングによる *mU50HG-b*<sub>Δ</sub>

mU50 の組換え染色体 (変異アレル) と野生型アレルとの対を持つヘテロ個体同士を掛け合わせて変異アレル対を持つ個体 ( $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウス) を得た。 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスは雌雄共に野生型との外見上の差異は認められず健常な発育を示し、交配・妊娠・出産も可能であった。発育成長を通して  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスの体重推移は雌雄共に野生型より若干低い傾向を示したものの、野生型とほぼ同様であった。

野生型では、ノザン解析に供した全ての臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、膵臓、腎臓、脾臓、胸腺、リンパ節、骨髄) において mU50 発現シグナルが見られ、特に造血系組織 (胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄) において高発現していることが確認できた。一方、 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウス (10 週齢時) の各種臓器におけるノザン解析では、これら全ての臓器で mU50 シグナルの減少が認められ (脾臓・リンパ節では野生型の 6-7%まで減少)、リアルタイム PCR 解析においても 5 サイクル以上の差 (32 分の 1) として検出された。この mU50 低発現状態は加齢個体 (60 週齢まで確認) でも維持されていた。リアルタイム PCR 解析では、 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウス脾臓で *mU50HG-b* 発現量は野生型と同レベルであり、ホスト遺伝子転写は維持されていることも確かめた。これらの結果は *mU50HG-b* の発現量が *mU50HG-a* を大きく上回っていることを示しており、ゲノム構造から推定した通り *mU50HG-b* がヒト *U50HG* のオルソログであることが支持された。尚、ヘテロ個体では mU50 は野生型と  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスの中間の発現量を示し、変異アレルが母方由来 (-/+) と父方由来 (+/-) の個体とを比較した場合でも両者の mU50 発現パターンに違いは見られなかった。この結果からホスト遺伝子領域がインプリンティング制御されている可能性を除外できた。

興味深い所見として、 $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスの各臓器における mU50 シグナル強度を比較すると、造血系組織で高発現する特徴は見られなかった。 $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスで検出される mU50 シグナルは、*mU50HG-a* に由来するものと考えられるため、マウスにおいては、両ホスト遺伝子のうちでも *mU50HG-b* のみが造血系特異的な転写制御を受けている可能性が考えられた。

mU50 の snoRNA 活性を検証するため、28S rRNA 中 2 箇所 (2613C および 2628G) のリボースメチル化をプライマーエクステンションにより検出した。解析結果では、全ての  $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウス臓器においてメチル化シグナルの減少が確認できた。この微弱なメチル化シグナルは mU50 発現減少と対応しており、rRNA メチル化は mU50 発現量に応じていることが示唆された。

## (2) $\Delta mU50_{(HG-b)}$ マウスの表現型

本実験期間では、 $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスにおける mU50 発現減少が個体発育に与える影響についても検証した。両遺伝型において 10 週齢時の臓器湿重量 (脳、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣) の比較では、雌雄共に野生型との差は見られなかった。各臓器のホルマリン固定組織切片の HE 染色所見上でも特筆すべき変化は認めなかった。

リンパ球系細胞の分化・成熟に対する影響を調べる目的では、野生型および  $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウス個体の末梢血を採取し、一般血液性状・血球測定を行った。血液生化学検査では  $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスの血球数・容積値等は正常範囲に収まっていた。同様に脾臓由来細胞の FACS 解析においてもリンパ球 (T および B 細胞) 数・組成に関して野生型との違いは見られなかった。白血球数および T-B リンパ球の割合は約 20 週間隔で 90 週齢までモニ

タリングを遂行したが、加齢変化パターンは両遺伝型で同様であった。

100 週齢を最長とした長期観察群では、腫瘍発生も含めて様々な病態を示す動物個体を剖検した。野生型と  $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスとの比較では各週齢における異状発生頻度に差異は検出されなかった。ただし、両遺伝型系統全体の比較では、 $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスにリンパ節腫大や腫瘍などの発生が有意 (Fischer-test,  $p < 0.05$ ) であり、リンパ系統を含む生理機能に何らかの差異が生じていることが示唆された。

(3) ホスト遺伝子および関連遺伝子の発現造血系組織特異的な mU50 高発現の制御機構を調べる目的では、ヒトゲノム上の *U50HG* プロモータ領域について転写制御エレメントの *in silico* 検索を行った。その結果、リンパ球分化に必須の転写制御因子である c-MYC および BCL6 の結合部位の存在を見出した。B リンパ腫細胞株 (Ramos/U937) における *U50HG* 転写活性については、ChIP 法によって CpG island 中の E-box に c-Myc が結合しうることを確かめた。U50 発現が c-MYC を介したリンパ球の分化・成熟と密接に関わっていることが示唆された。

交付期間において、snoRNA 機能に関する他研究者からの報告として、一部の snoRNA が従来知られてきた rRNA メチル化以外の機能 (スプライシング反応への関与、miRNA 様の活性など) を持つことが明らかにされた。そのため、当初の計画には含めていなかったが、rRNA 以外の mU50 標的 RNA 分子候補について検索したところ、BCL6 と c-MYC の mRNA 前駆体では 8-14 塩基の mU50 との部分相補配列を持つことがわかった。しかし、リアルタイム PCR による *Bcl6* および *c-Myc* 転写産物量の解析では、野生型と  $\Delta mU50_{(HG-b)}$  マウスと

の間には発現量の差は認められなかった。

#### (4) U50 による rRNA メチル化部位

U50 はリボースメチル化をガイドする box C/D 型 snoRNA に分類され、その標的配列 (U50 サイト) は 28S rRNA 中に近接する 2 箇所が存在する。成熟リボソームにおけるこの U50 サイトの進化的な意義について、種間にみられる rRNA との塩基配列比較を行った。その結果、U50 サイトは大腸菌から真核生物 rRNA (酵母～ヒト) に至るまで高度に保存されていた。ただし、大腸菌や酵母では U50 snoRNA オルソログは見出されておらず、U50 サイトのメチル化を示す報告もない。また、高度好熱菌リボソームの分子構造モデルからは、U50 サイトはリボソーム・サブユニット間の結合部位において突出したループを形成していることがわかった。以上の結果から、U50 による rRNA メチル化は、高等生物におけるリボソーム・サブユニット間結合の高次構造決定に関わっていると推察された。

#### (5) *mU50HG-a* ゲノム構造解析

*mU50HG-a* について、最新のマウスゲノムデータベースで再検索を実施したところ、9 番染色体 E 領域 *mU50HG-b* 遺伝子座の下流に 3 箇所マッピングされた。この 3 遺伝子座では塩基配列に変異が認められ、近傍には多数のレトロトランスポゾン配列を認めた。この染色体領域は、部分的にヒト染色体シンテニー領域を逸脱していた。今回の検索により、*mU50HG-a* はマウス種に特異的な領域に 3 つの連続するクラスターとして配置されていることがわかった。

mU50 ホスト遺伝子 (*mU50HG-a* と *mU50HG-b*) 間のプロモータ領域の配列比較では、基本転写領域よりも上流では配列類似性が低く、個々に独立した転写制御を持ちうる

ことも示唆された。このことは  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスで検出される mU50 シグナル (*mU50HG-a* 由来) が野生型での mU50 シグナル (主に *mU50HG-b* 由来) のような臓器特異性を示さない事実と合致した。マウス独自の *mU50HG-a* がヒト-マウス間の違いを生じている可能性があるため、その発現制御機構は今後検討すべき課題として捉えている。

#### まとめ

本研究では、 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウスを作出し、mU50 低発現状態と個体発育・腫瘍発症との関わりに着目した。これまでの個体観察および血液生化学検査において、個体発育における顕著な変化は認めなかった。ただし、 $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> 系統では、野生型と比してリンパ系に関わる異常 (リンパ節腫大やリンパ腫発症) が有意に高まっている事実が明らかとなった。本研究期間中には、他研究者によってヒト乳癌および前立腺癌リスク・予後と染色体上の U50 変異との関連についての報告があった。これらの報告では U50 の rRNA メチル化機能には触れていないが、U50 機能異常が病態に影響を与えうると考察している点で本研究での  $\Delta$ mU50<sub>(HG-b)</sub> マウス表現型所見と共通していた。脊椎動物では 300 種を超える snoRNA が rRNA 前駆体の化学修飾に働いており、mU50 機能の低下が個体機能阻害に直結しない可能性も想定されたが、本研究では、rRNA 上の微細な修飾変化が個体レベルでの生理活性に影響を与えることを示すことができた。本研究期間ではその明確な検証には至っていないが、mU50 が高等生物における免疫系機能の精妙な分子制御機構の一端を担うものと考えている。

#### 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 5 件)

- ① Soeno, Y., Fujita, K., Kudo, T., Taya, Y., and Aoba, T.: A mouse model lacking U50 box C/D-type snoRNA expression. The 14th Annual Meeting of the RNA Society, Madison, WI, USA, 2009.
- ② 藤田和也、田谷雄二、添野雄一、佐藤かおり、青葉孝昭：マウス二次口蓋形成では突起先端上皮の接着・癒合に MAGUK family Cask が働く、第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、新潟、歯基礎誌 51(Suppl): p102, 2009.
- ③ 添野雄一、田谷雄二、Alexander Hüttenhofer、青葉孝昭：脳特異的 snoRNA MBII-52・MBII-85 の RNA-タンパク機能複合体の検索、第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、講演要旨集 1P-922, 2008.
- ④ 藤田和也、田谷雄二、添野雄一、佐藤かおり、青葉孝昭：マウス下顎突起の正中癒合部に働くシグナルネットワークの解析、第 50 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、東京、歯基礎誌 50 (suppl.): p140, 2008.
- ⑤ 添野雄一：高次生命機構に働くノンコーディング RNA の分子動態解析、日本歯科大学歯学会研究推進フォーラム、東京、2008.

[図書] (計 1 件)

- ① 日本歯科大学生命歯学部病理学講座編 (青葉孝昭監修)、医学情報社、病態病理学入門—人体の仕組みと病気の成り立ちを理解する—、2009 年、122 頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

添野 雄一 (SOENO YUUICHI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70350139