

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590326

研究課題名(和文)形態形成における非コードRNAの機能とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the function of non-coding RNA in the morphogenesis

研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA, YUKIKO)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80345040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： エンドセリン-1/エンドセリン-A受容体(Ednra)シグナルが第1鰓弓では下顎のアイデンティティを決定する。下顎の上顎化が見られるEdnraホモ接合体マウスにlong noncoding RNAのEvf2を発現させると、下顎骨遠位の低形成が増強した。In vivo, in vitroの検討から、Evf2がエンドセリン-1/エンドセリン-A受容体シグナルの主要な遺伝子の発現を直接または間接的に調節していると考えられた。その機序として、DNAメチル化及びメチレーションを介したlong noncoding RNAの働きが考えられた。

研究成果の概要(英文)： Endothelin-1/Ednra signal determines mandibular identity. Ednra homozygotes exhibited homeotic transformation of the lower jaw into an upper jaw. When we expressed the Evf2 of long noncoding in the Ednra homozygous by RMCE (recombination mediated cassette exchange), the distal part of mandible was aggravated. Evf2 controls the expressions of principal genes under Endothelin-1/Ednra signaling directly and indirectly. DNA methylation and long non-coding RNA were possibly suggested as the underlying mechanism.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・医科学一般

キーワード： エンドセリン 下顎形成 非コードRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年の網羅的な転写産物の解析により、千個以上の lncRNA が存在することが明らかになってきた。(Kapranov P et al., Science 316:1484, 2007; Ponjavic J et al., Genome Res. 17:556, 2007) その中でも、相当数の lncRNA が形態形成時に細胞特異的に発現調節されており、ヒトの疾患との関連も示唆されている。また、遺伝子間より産生される lncRNA は進化的に保存されているものが多い。

我々はこれまで、エンドセリン-1 (ET-1) /ET-A 受容体(ETAR)シグナルが、頭頸部の形態形成において神経堤細胞の運命決定を制御する因子として働き、特に第1鰓弓では下顎のアイデンティティを決定することを、ET-1 ノックアウトマウス(KO) を用いて証明してきた(Kurihara Y et al., Nature 368:703, 1994; Kurihara Y et al., J Clin Invest 96:293, 1995; Ozeki H et al., Mech Dev 121:387, 2004)。また、Cre-変異 lox を用いた Recombinase mediated cassette exchange (RMCE) によるノックインの系を構築し、ETAR 遺伝子座に ETAR cDNA をノックインすると完全に表現型が rescue されるが、ET-B 受容体(ETBR) cDNA では一部のみしか rescue されず、顎顔面の形態形成においては ETAR と ETBR の間には互換性がなく、ETAR 選択的に Gq/11 を介したシグナル伝達が起こること(Sato T et al., Development 135:755, 2008) さらに ET-1 シグナルによるホメオボックス遺伝子 Dlx5 /Dlx6 の発現誘導が第1鰓弓における下顎の誘導に必要十分であることを示した(Sato T et al., PNAS 105:18806, 2008)。一方、同じ染色体領域でタンデムに並んでいる Dlx5 と Dlx6 の遺伝子間領域に転写開始点が存在する lncRNA “Evf2” が報告されている(Feng J et al., Genes Dev 20:1470, 2006)。我々は最近、Evf2 を ETAR 遺伝子座にノックインすると、

ET-1/ETAR KO マウスにおける Dlx5/Dlx6 発現低下がより顕著になり、下顎の表現型がより重篤になることを見出した。このことは、Evf2 が生体内で Dlx5/Dlx6 遺伝子発現を調節する機能を有していることを示すのものであり、そのメカニズムを明らかにすることは、まだ知られていることの少ない lncRNA の新たな分子機能と生理的意義の解明に大きく貢献するものと考えられた。

## 2. 研究の目的

形態形成において ET-1/ETAR シグナルの下で機能していると考えられる long non-coding RNA (lncRNA) の Evf2 に注目し、その作用メカニズムを検討する。

さらに、まだ知られていない他の機序を推測するため、ETARKO、Evf2KI、野生型マウスの鰓弓間の DNA チップ、マイクロ RNA チップの結果を詳細に検討し、そこで動く遺伝子群から機能を推測し検証するとともに、ET-1/ETAR シグナル下で下顎形成に重要な Dlx5,6 蛋白に注目し、Dlx5,6 蛋白に結合する lncRNA を検出し、さらに複合体を形成する蛋白を同定する。これらの研究により、lncRNA による形態形成の未知の機構を解き明かすとともに、lncRNA の作用機序と生理的役割について、新しい知見を提供したい。

## 3. 研究の方法

### 1. ETARKO、Evf2KI マウスの解析

(1) Evf2 の発現をリアルタイム PCR, ノーザンプロット、in situ hybridization を用いて詳細に検討する。

Evf2KI マウスは形態的には、出生時に ETARKO で見られる下顎の異常が Evf2KI で強くなっている見えるので、骨軟骨染色の結果をスコア化し統計処理を施すことにより客観的に示す。また、Evf2 は、上顎や頭蓋底など ETAR プロモーターにより広範囲に異所性発現しているため、これらの発現部位に由来する組織に変化があるかを詳細に観察する。

(2) 第一鰓弓をはじめとして、表現型の現れている部位における関連遺伝子 (Dlx2、Dlx5/6、HAND2 など) の発現動態を *in situ* ハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR にて検討する。また、Evf2 の標的の一つの ml56i, ii エンハンサー活性を、レポーターマウスを用いた LacZ 染色にて評価することによって、Evf2 の作用発現に必要な遺伝子環境条件を明らかにする。ml56i に作用する核転写因子その他を検討するため、P19 細胞による Luc assay の系を用いる。

## 2. Evf2 の機能と分子メカニズムの解析

下記の4項目について、生体 (遺伝子改変マウス胚の鰓弓) と培養細胞のそれぞれまたは一方で検討する。培養細胞は ET-1/ETAR シグナルカスケードの主要な遺伝子の発現を既に確認済みのヒト肺癌由来 Lu134 細胞と、導入遺伝子の発現効率の良い COS 細胞や P19 細胞等を適時使い分けて、*in vitro* でも生体での現象を模倣することを心がけて実験を組む。

### ) エピジェネティクス修飾

DNA のメチル化に関しては、ターゲット領域の一つである ml56i エンハンサー付近を中心に検討する。また、標的遺伝子部位での ChIP アッセイにより H3K4 や H3K27 のメチル化状態が ETARKO と野生型で違うか検討するとともに、ポリコーン複合体 (PRC2) に含まれる H3K27 のメチル化酵素 EZH2、SUZ12 や、CoREST/REST 抑制複合体に含まれる H3K4me2 の脱メチル化酵素 LSD1 を細胞内で強制発現させ RNA-IP により Evf2 が検出されるか検討する。また、検出されるのであれば、逆に、ピオチンラベル Evf2 で pull down し蛋白が検出されるか検討し、Evf2 と相互作用する因子を同定する。

### ) small RNA の産生

データベース検索からは現在のところ Evf2 から small RNA が生成されるというエビデンスはないが、Evf2 をプローブとして miRNA の Northern を施行する。

### ) 他の RNA の small RNA 生成やスプライシングへの関与

ETARKO、Evf2K、野生型間の胎児鰓弓のマイクロ RNA チップの結果から Evf2 の有無で発現が並行して動く microRNA があれば、鰓弓においてその前駆体の発現と比較し、Evf2 がその生成に関わっているか推測する。候補となる RNA 前駆体があれば、Evf2 とともに適当な細胞に導入し、microRNA 生成の変化があるかどうかを確認する。

### ) paraspeckle への関与

核内コンパートメントの一つである paraspeckle は、paraspeckle 蛋白と lncRNA が結合して形成されていて、PSPC1 蛋白と NEAT1 mRNA や、P54NRB 蛋白と Ctn mRNA の結合が最近報告されている。鰓弓のアレイの結果からパラスペックル蛋白に注目し差異があれば evf2 とパラスペックル蛋白との共存・関連を検討する。

## 4. 研究成果

Evf2 は、マウス胎生中期胚においては脳・鰓弓に発現があり、肢芽・心臓では殆ど無い。しかし ETARKO では鰓弓での Evf2 の発現が大きく低下していることから、Evf2 は鰓弓での形態形成において ET-1/ETAR シグナル下にあると考えられた。下顎の上顎化が見られる *Ednra*<sup>-/-</sup> に Evf2 を発現させると、下顎歯槽骨遠位部と切歯の低形成が増強した。これは、whole mount *in situ* hybridization で *Ednra*<sup>-/-</sup> 胚の鰓弓遠位に僅かに残存していた HAND2 の発現消失に起因していると考えられた。また、鰓弓における ET-1/ETAR シグナルの主要な核転写因子 Dlx5/6 は HAND2 のエンハンサーに作用するが、その Dlx5/6 と Dlx5/6 のエンハンサー、Evf2 は相互にポジティブフィードバックループを形成していることが培養細胞と Evf2 ノックインマウスの鰓弓の両方から示された。その作用メカニズムの一つとして、ml56i エンハンサーの一部の CpG

のメチル化が関与している可能性が示唆された。

さらに鰓弓のマイクロアレイの結果からパラスペックル蛋白の PSPC1 に注目した。PSPC1はEvf2と複合体を形成することができ、in vitro ではDlx5/6のエンハンサーを介して転写活性に作用し、強制発現系においてEvf2がパラスペックルの局在を変化させることを見いだした。これらによりEvf2が生体内でも、核内でパラスペックル蛋白に直接または間接的に結合して、転写調節などの機能に關与する可能性が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文](計 7件)

1. Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration.

Tonami K, Hata S, Ojima K, Ono Y, Kurihara Y, Amano T, Sato T, Kawamura Y, Kurihara H, Sorimachi H.

PLoS Genet. 2013;9(8):e1003668

2. Endothelin regulates neural crest deployment and fate to form great vessels through Dlx5/Dlx6-independent mechanisms.

Kim KS, Arima Y, Kitazawa T, Nishiyama K, Asai R, Uchijima Y, Sato T, Levi G, Kitanaka S, Igarashi T, Kurihara Y, Kurihara H.

Mech Dev. 2013 Nov-Dec;130(11-12):553-66.

3. Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling.

Arima Y, Miyagawa-Tomita S, Maeda K, Asai R, Seya D, Minoux M, Rijli FM, Nishiyama K, Kim KS, Uchijima Y, Ogawa H, Kurihara Y, Kurihara H.

Nat Commun. 2012;3:1267.

4. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement.

Arima S, Nishiyama K, Ko T, Arima Y, Hakozaki Y, Sugihara K, Koseki H, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H.

Development. 2011 Nov;138(21):4763-76.

5. Identification and developmental analysis of endothelin receptor type-A expressing cells in the mouse kidney.

Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H.

Gene Expr Patterns. 2011 Oct;11(7):371-7.

6. Calpain-6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1.

Tonami K, Kurihara Y, Arima S, Nishiyama K, Uchijima Y, Asano T, Sorimachi H, Kurihara H.

J Cell Sci. 2011 Apr 15;124(Pt 8):1214-23.

7. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice.

Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzsuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Feb;300(2):H431-9.

[学会発表](計 4件)

1. Yukiko Kurihara, Yasunobu Uchijima, Sakura Kushiya, Rieko Asai, Hiroki Kurihara

Involvement of non-coding RNA Evf2 in the endothelin signaling in branchial arch development

Cell Symposia "Functional RNA"

2012年12月3日 Sitges (Spain)

2. 第35回日本分子生物学会)

栗原 由紀子, 内島 泰信, 櫛山 櫻, 濱崎 真夏, 西山 功一, 栗原 裕基

「下顎形成におけるエンドセリンシグナル

における non-coding RNA とパラスペックル  
蛋白の作用」

2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場（福岡県  
福岡市）

3 .Yukiko Kurihara, Yasunobu Uchijima, Sakura  
Kushiyama, Hiroki Kurihara

“ Involvement of non-coding RNA: Evf2 in the  
Endothelin signaling in branchial arch  
development ”

Keystone Symposia Conference

“ Non-Coding RNAs ”

2012 年 4 月 2 日 Snowbird Cliff lodge (USA)

4 . Yukiko Kurihara, Yasunobu Uchijima,

Sakura Kushiyama, Taro Kitazawa, Rieko  
Asai, Hiroki Kurihara

Involvement of non-coding RNA : Evf2 in the  
Endothelin signaling in branchial arch  
development

第 34 回 日本分子生物学会

2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜（神奈川  
県 横浜市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗原 由紀子 (KURIHARA, Yukiko)

東京大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80345040

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

栗原 裕基 (KURIHARA Hiroki)

東京大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20221947

内島 泰信 (UCHIJIMA Yasunobu)

東京大学・大学院医学研究科・助手

研究者番号：90272426