

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23890025

研究課題名（和文）

長鎖ノンコーディング RNA の機能発現における核小体の関与

研究課題名（英文）

Roles for nucleolus in the function of long noncoding RNA

研究代表者

岸本 宏之（岸本 恕征）(KISHIMOTO HIROYUKI)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：50344750

研究成果の概要（和文）：核小体と lncRNA の関連性は強く示唆されているが、そのメカニズムについてはほとんど不明のままである。本研究は lncRNA の局在制御に関わる核小体因子のスクリーニング・同定することにより lncRNA の局在制御機構の一端が明らかになることが期待される。

研究成果の概要（英文）： Although relationships between lncRNA and nucleolus have been implicated, the molecular mechanism is not described yet. In this project the regulation of lncRNA localization will be explored by screening nucleolar proteins which is involved in the function of lncRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：lncRNA, 核小体, X 染色体不活性化

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読によって、高等脊椎動物の生物学的複雑さを担っている本体は、非コーディング領域から転写されるノンコーディング RNA であると考えられるようになって来た。次世代シーケンサーによる網羅的な解析によって、新しいノンコーディング RNA が次々同定されそのデータベースが蓄積されている。siRNA、miRNA に代表される低分子 RNA については世界中で精力的に研究が進められ、遺伝子発現調節の分子メカニズムが紐解かれつつある。一方で、長鎖ノ

ンコーディング RNA (long noncoding RNA、以下 lncRNA) がどのように遺伝子発現制御を行っているかについてはほとんどが明らかになっていない。lncRNA は、Kcnq1ot1 や Airn などのインプリントノンコーディング RNA のように一つの転写産物によって数百から数千、X 染色体不活性化にいたっては染色体丸ごとの遺伝子発現を制御しており、そのメカニズムを解明することは、発生学上興味深いだけでなく現在最も重要な研究課題の一つであり、lncRNA に関連する疾患の理解・治療法の開発、lncRNA を利用した遺伝子工学・次世代の遺伝子治療、さらに細胞

リプログラミングなど再生医療への貢献も期待される。

研究代表者は今までに、代表的な lncRNA である XIST による X 染色体不活性化に必要な核内環境について解析し、XIST が形成する不活性化クラスター構造に遺伝子領域を取り込むときに、染色体の三次元構造を変換する核マトリクスタンパク質 SATB1 が必須の役割を果たしていることを示した (Agrelo et al., *Dev Cell*, 2009)。さらに細胞の分化系譜の決定に重要と考えられている核マトリクスタンパク質 Cux1 も XIST と協調的に働くことを見出した (Kishimoto et al., 投稿中)。これらの研究によって XIST による染色体不活性化に必要な核内環境が徐々に明らかとなっているが、一方で XIST の局在化の制御メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

XIST は体細胞においては常に不活性 X 染色体上に局在するが、細胞分裂の M 期に入る前に消失し、分裂後の G1 期において新たにクラスターを形成する。この消失は非常に速い反応であることから、何らかのメカニズムによって XIST が積極的に分解もしくは排除されていると考えられる。この XIST の局在制御機構を明らかにする目的で、間期の XIST の局在を変化させる細胞外刺激、ストレスなどを検索したところ、核小体の崩壊と XIST の消失が強い相関を示すことを見出した (図 1)。細胞分裂における XIST の消失の時期は核小体の崩壊とほぼ一致するので、この結果から核小体因子が核小体の崩壊に伴って核質に移行し XIST の消失を引き起こしていることが考えられた。

不活性 X 染色体は、Barr 小体として発見された当初から、高い頻度で核小体近傍に存在すること、核小体の活動レベルに応じてその局在が変化することが報告されている (Barr et al., *Nature*, 1949)。近年になってこの不活性 X 染色体の核小体近傍への局在化が XIST 依存的であり、また細胞周期により変化することが示されている (Zhang et al., *Cell*, 2007)。lncRNA の Kcnq1ot1 によってインプリントの制御をうける Kcnq1 遺伝子座はやはり高頻度に核小体近傍に存在すること、この頻度は発生段階、細胞種によって変化することが報告されている (Pandey et al., *MolCell*, 2007)。このように核小体と lncRNA による不活性化の関連性は強く示唆されているが、そのメカニズムについてはほとんど不明のままである。

一方、本研究グループでは、新規核小体因子 Nucleomethylin (NML) を同定し、NML を含む複合体 eNoSC が、エネルギー状態に応じて rDNA の転写活性を制御すること (Murayama et al., *Cell*, 2008)、MYBBP1A の核内局在は核小体の RNA 量の変化によっ

てコントロールされており、ストレス応答時に核小体崩壊に伴って核小体から出た MYBBP1A が p53 の活性化に必要であること (Kuroda et al., *EMBO J*, 2011)、また細胞分裂後のチェックポイントにおいても核小体の崩壊に伴って放出された MYBBP1A が p53 を制御していること (Tsuchiya et al., *BBRC*, 2011) を明らかにしている。核小体における rRNA の転写は様々なストレス刺激によるシグナル伝達の下流にあり、核小体の動態はストレスに応じてダイナミックに変化していることが示されてきているが、今後は核小体の動態が細胞のエネルギー代謝・ストレス応答のみならず細胞分裂や細胞の分化など多くの現象に関与していることが明らかになっていくと考えられる。

## 2. 研究の目的

上記のような背景から、筑波大学で研究をスタートするにあたり、核小体因子による XIST の局在制御機構に注目した。本研究では XIST を消失させる因子が核小体に存在し、それが核小体の動態に応じて核質に移行して X 染色体の動態を制御していると仮定し、核小体の siRNA ライブラリーを利用したスクリーニングを行う (図 2)。これにより XIST の局在を制御している核小体タンパク質を同定し、核小体因子による XIST の局在制御のメカニズムを明らかにする。また、XIST は発生の様々な過程において負に制御されているがその実体はわかっていないので、核小体がこの負の制御に関わっているかどうかについて検討する。

このようなメカニズムは lncRNA の制御機構として一般的に働いていることが考えられるので、XIST と同様にシスではたらく lncRNA である Kcnq1ot1 や Airn も同様な制御をうけるかどうかにも検討し一般性についても解析する。

## 3. 研究の方法

既に、核小体による XIST の局在制御について基礎的な検討を行った。UV 照射や 4-NQO で細胞を処理した場合 XIST の消失がみられるが、この場合、核小体の崩壊のみならず DNA ダメージシグナルなど様々な経路が活性化されてしまっている。そこで核小体の崩壊を特異的に引き起こすためにリボソーム RNA の転写因子である TIF-IA のノックダウンを行った。TIF-IA ノックダウンによりリボソーム RNA の転写が停止し、核小体内の RNA 量が急激に低下することによって核小体が崩壊する。ヒト胎性肺胚繊維芽細胞 WI-38 に TIF-IA の siRNA を導入し核小体崩壊を引き起こしたところ、核小体の崩壊に伴って高い割合で

XISTの消失が見られた。このことは核小体の崩壊が直接XISTの消失を引き起こすことを強く示唆している。

#### ① XISTの局在を制御する核小体因子の同定

核小体はプロテオーム解析から約700種のタンパク質によって構成されていることが示されている (Andersen et al., Nature, 2006)。これらのタンパク質のうち3分の1程度がリボソーム合成に関与するが、残りのタンパク質については機能未知のものも多く、機能がある程度明らかなものについても核小体に局在する理由については不明な場合が多い。本研究グループでは、700種類の核小体タンパク質に対するsiRNAを設計・作成しライブラリー化した。このライブラリーを用いたスクリーニングによって、既に核小体崩壊に伴ってp53を活性化するMYBBP1Aを同定している (Kuroda et al., EMBO J, 2011) ことからライブラリーは有効に機能すると考えられる。そこで本研究では、TIF-IA ノックダウンによるXIST RNAの消失からXISTの局在を回復させることを指標に、lncRNAの局在を制御する核小体タンパク質のスクリーニングを行う。RNA FISHは必要とする培養スケールも小さくスクリーニングに適しているといえる。一次スクリーニングで候補に上がったそれぞれの遺伝子に関して、off-target 効果を除外するためにさらに二種類のsiRNAを作成し同様の効果が得られるかを検討することで二次スクリーニングとする。二次スクリーニングを通過した遺伝子についてはcDNAを入手して発現ベクターを作成し、これを強制発現した場合のXISTの局在に対する影響と、そのタンパク質自体の細胞内局在が核小体であるか、また核小体の崩壊に伴って核質に移行するか、さらに細胞分裂時の細胞内局在について検討する。

三次スクリーニングを通過した遺伝子に関して、XISTの局在制御のメカニズムを解析するために、XISTとの相互作用をRNA免疫沈降法を用いて検討するとともに、細胞内においてどのような複合体を形成しているかを検討する。候補遺伝子が複数あった場合、それらが同一の複合体に存在する可能性が考えられる。さらに候補遺伝子の発現によるXISTの動態を、XIST RNAの半減期、核内局在の時間変化を指標に検討する。

#### ② 核小体因子によるXISTの局在の制御の生理的な役割の解析

XISTはlncRNAとしてシスに働くのでX染色体上から離れることはないが、核の中の染色体の状態を考えればXISTが他の染色体との相互作用することを防止するメカニズムが存在すると考えられる。またマウスの初期発生において、胚盤包の未分化細胞の集団である内部細胞塊 (ICM) では、一度不活性化されていた父親由来X染色体はXISTの発

現を失い、再活性化している (Okamoto et al., Science, 2004, Mak et al., Science, 2004) ことから、XISTは何らかの負の制御を受けているものと考えられる。このようにXISTを負に制御するメカニズムは様々な局面で必要であると考えられるが、その実体は明らかになっていない。①のスクリーニングで得られた候補遺伝子はこのようなXISTの負の制御に関わっている可能性が高いので、これについて、ICMを反映した*in vitro*の細胞株であるES細胞とその分化系において、以下の方法で検討する。

メスES細胞に候補遺伝子のsiRNAを導入する。未分化状態においてはXISTはごく微量発現しているのみでRNA FISHではピンポイントで検出される。このXISTに対する影響を指標に検討する。ES細胞において内在性XISTの発現を強制的に誘導した場合X染色体の不活性化がおこるので、もしも負の制御が働かなくなれば、本来X染色体不活性化が起こらないES細胞においてX染色体の不活性化が誘導される可能性がある。さらにこの細胞を分化させたときに、分化に伴ってXISTの発現が誘導されるが、このXISTの局在さらにX染色体上の遺伝子の不活性化に影響があるかどうかを検討する。

未分化ES細胞のXISTの局在に影響が見られた場合には、再活性化における何らかの役割がある可能性が考えられるが、再活性化は培養細胞では再現することが不可能であるため、2細胞期、4細胞期のマウスの初期胚を用いて、候補遺伝子をノックダウンした場合に、再活性化が正常どおり起こるのかどうかを検討する。

#### ③ lncRNA、Kcnq1ot1およびAirnの核小体因子による制御

①で得られた候補遺伝子がXISTの局在を制御するのであれば、XISTと同様にシスに働くlncRNAであるKcnq1ot1やAirnに対しても類似の制御機構が働いていることが考えられる。特にKcnq1ot1に関してはこの遺伝子座が高確率で核小体近傍に局在することが示されている (Pandey et al., MolCell, 2007)。これらのlncRNAは母親由来しか発現しないインプリントを受ける遺伝子座の父親由来の染色体から発現し、周辺のインプリント遺伝子の発現を抑制している。このインプリントを最も強く観察できる、胚体外組織の培養細胞としてTS細胞 (Trophoblast stem cell)、また弱いながらインプリントがみられるES細胞の分化系も併用し、インプリントに対する候補遺伝子の強制発現、もしくはノックダウンの効果を検討する。異なる二種類のバックグラウンドのマウスの掛けあわせから作成したTS細胞やES細胞が既に入手可能であり、これをもちいることで、父親由来・母親由来の染色体からの転写産物を区別

して検出することが可能なのでインプリントが正常に働いているか、これら lncRNA が正常に局在しているかどうかを指標に検討する。

○ 核小体タンパク質 siRNA ライブラリーによるスクリーニングの問題点

本研究はスクリーニングからスタートしている。既に部分的に一次スクリーニングを開始し、UV 照射による XIST の消失を抑える siRNA をみつけているが、核小体崩壊に伴う XIST の消失を起こす実体が、核小体の RNA である場合には理論上スクリーニングは成立しない可能性がある。この場合も特定の核小体タンパク質を伴って機能する可能性が高いが、核質のタンパク質と協調している場合や、RNA 単独で機能している場合には siRNA ライブラリーではこの RNA は当然ながら同定できない。本研究とは並行して進めている別のプロジェクトで、核小体内のノンコーディング RNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定することを行っている。機能未知のノンコーディング RNA に関してはノックダウンのための siRNA を作成することを計画しているので、核小体タンパク質の siRNA ライブラリーによるスクリーニングがうまく行かない場合は、核小体ノンコーディング RNA をターゲットとしてスクリーニングを行う。

#### 4. 研究成果

ヒト WI-38 細胞における XIST の局在について核小体タンパク質のスクリーニングを行い、数種のタンパク質を同定した。一方で、今までの解析で主に対象としてきたマウス Xist とヒト XIST では細胞分裂の際の消失のタイミングが異なることなどから局在制御についても独自のメカニズムがある可能性が考えられるのでマウスの核小体タンパク質についても siRNA ライブラリーを作製し、スクリーニングを行っている。

現在ここで得られた候補遺伝子について機能発現のメカニズムの解析を行っている。本研究によって長年解き明かされていなかった lncRNA の局在制御機構の一端が、核小体という新たな角度から切り開くことが期待される。

#### 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)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岸本 恕征

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：50344750