

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770168

研究課題名(和文)染色体分離を制御するノンコーディングRNAとその作用機序の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of non-coding RNA in regulation of chromosome segregation

研究代表者

井手上 賢(Ideue, Takashi)

熊本大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：20420250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト染色体セントロメア領域を構成するSatellite I領域から産出されるノンコーディングRNAであるSatellite I RNAについて、その機能を解析した。Satellite I RNAをノックダウンした細胞では染色体分離の異常を示す。このRNAには染色体分離のキー因子であるAurora Bが結合し、そのリン酸化活性とセントロメアへの局在を制御されることを見出した。

Satellite RNAに結合する因子を探索するため、Satellite RNPをプルダウンし、ともに沈降してきた因子を質量分析で同定した。そのうちRBMXのノックダウンは染色体分離の異常の表現型を示した。

研究成果の概要(英文)：Satellite I RNA is noncoding RNA transcribed from human centromeric repetitive sequence. Depletion of this RNA caused the abnormal nuclear morphology due to defects in chromosome segregation. We founded that Aurora kinase B, a key factor of chromosome segregation binds to this RNA. Aurora B was regulated kinase activity and localization through binding to this RNA. To identify interaction factors to satellite I RNA, we performed pulled down of Satellite I RNA. Several interactors were identified from pulled down products by LC/MS analysis. Depletion of RBMX, one of interaction protein, showed phenotype of defect in chromosome segregation.

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：RNA 染色体分離 ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

トランスクリプトーム解析のひろがりにより、タンパク質をコードしない多数のノンコーディング RNA (ncRNA) の存在が明らかとなり、その機能についての研究が進められるようになっていた。

ヒト染色体セントロメア領域は、反復配列に富む構造から成り、そこから ncRNA が産出されていることは報告されていたが、その機能は明らかではなかった。

分裂酵母において、セントロメア領域から産生される ncRNA と RNAi 因子が、この領域のヘテロクロマチン形成に関与することが明らかになっており、ヒトのセントロメア由来 ncRNA にも、セントロメア領域においてなされる制御への何らかの関与が予想された。

研究代表者はアンチセンスオリゴを用いてヒトセントロメア領域由来 ncRNA (サテライト I RNA) のノックダウンに成功し、ノックダウン細胞が葡萄状房様小核 (Grape shape phenotype) と呼ばれる、一つの細胞が無数の小核を持つ異常な核の形態を示すことを明らかとし、この RNA に染色体分離過程に関わる何らかの機能が有ることを掴んでいた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトのセントロメア領域から産生される ncRNA の機能、特に染色体分離過程への役割について、その分子メカニズムを明らかにすることを目指した。またこの RNA に結合する因子を同定し、それら因子の染色体分離過程への機能を調べると共に、セントロメア由来 RNA をコアとした RNA-タンパク質複合体が制御する新しい染色体分離メカニズム像を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

HeLa 細胞から回収した RNA から、RT-PCR によりサテライト I RNA を簡便に検出することに成功した。

サテライト I RNA の生体内での機能を解析するため、HeLa 細胞を用いて、サテライト I RNA に対するアンチセンスオリゴを導入することで、この RNA をノックダウンした。

サテライト I RNA ノックダウン表現型の形成過程を調べるため、Histone H2B-GFP 発現 HeLa 細胞で RNA をノックダウンし、Grape phenotype が形成される様子をタイムラプス解析により追跡した。

染色体分離のキー因子として知られる Aurora B を RNAi によりノックダウンした。

AuroraB のサテライト RNA との結合の有無を調べるため、抗 Aurora B 抗体を用いた免疫共沈を行った。

サテライト I RNA ノックダウン時における Aurora B の細胞内局在への影響を、Aurora B の抗体染色により精査した。また Aurora B のリン酸化活性への影響もウエスタン解析により精査した。

サテライト I RNA 結合因子を同定するため、アンチセンスオリゴを用いて、サテライト I RNA をプルダウンしサテライト RNP を精製した。RNA と共にプルダウンしてきたタンパク質因子を質量分析にかけ、サテライト I RNP 構成成分候補として同定した。そのうちのひとつ RBMX について、RNAi によるノックダウン、免疫共沈を行い、サテライト I RNA との関係性を考察した。

4. 研究成果

ヒト染色体セントロメア領域 (図 1A) から産生されるノンコーディング RNA、サテライト I RNA の機能を解析するため、まずはこの RNA の検出を試みた。RT-PCR により簡便に検出する系を確立した (図 1B)。細胞分画および FISH 解析の結果、この RNA は細胞の核内、とくにセントロメア領域に輝点を形成して

局在することが明らかとなった(図1C)。

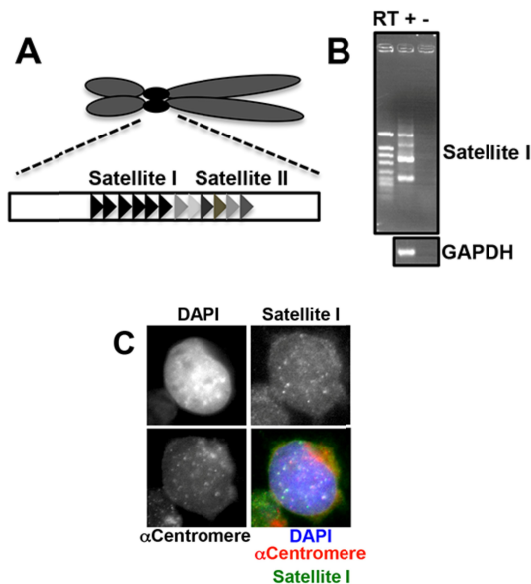


図1. ヒトセントロメア領域の模式図(A)、サテライトRNAの検出(B)、細胞内局在(C) Ideue et. al. Genes to Cells 2014.より一部改変

Histone H2B-GFP 発現 HeLa 細胞に対し、サテライト I RNA ノックダウンを行い Grape phenotype が形成される様子をタイムラプス解析により追跡した。結果、通常の細胞では、染色体の凝集、赤道面への整列、分離、脱凝集の順で染色体分離がなされるのに対し、ノックダウン細胞では、凝集した染色体が、いつまでも赤道面に整列せず、分離しない。分離しない染色体がそのうち脱凝縮してそれぞれが小さな核を形成するといった現象が見られた。この結果からサテライト I RNA は染色体分離の制御に何らかの働きを持つと考えた。

サテライト I RNA が染色体分離に関わる可能性を考えたことから、この過程のキー因子として知られる Aurora B との関連を調べることにした。Aurora B を RNAi によりノックダウンするとサテライト I RNA ノックダウン細胞と同様の Grape phenotype が高頻度で出現した。この結果から、サテライト I RNA が Aurora B と同じ制御に関わっている可能性を考えた。細胞周期の分裂期に同調した HeLa 細胞の抽出液から、抗 Aurora B 抗体で免疫沈降を行ったところ、その沈降産物内からサ

テライト I RNA が検出されたことから(図2A)、サテライト RNA には Aurora B が結合すると結論づけた。免疫染色を行うと、Aurora B は分裂期の細胞において、染色体上ならびにセントロメア上にシグナルが検出されるが、サテライト RNA ノックダウン細胞においては、このシグナルが消失した(図2B)。この結果は Aurora B がサテライト RNA に結合することで正しい染色体上の局在を可能にしていることを示している。さらにサテライト RNA ノックダウン細胞では、Aurora B の自己リン酸化能が亢進し、その標的因子の一つである Histone H3 のリン酸化状態もまた上昇していることがウエスタン解析から明らかになった(図2C)。この結果は Aurora B がサテライト RNA に正確なリン酸化活性をもコントロールされることを示している。この RNA により染色体分離のキー因子である Aurora B は活性と局在の両方を制御されている。

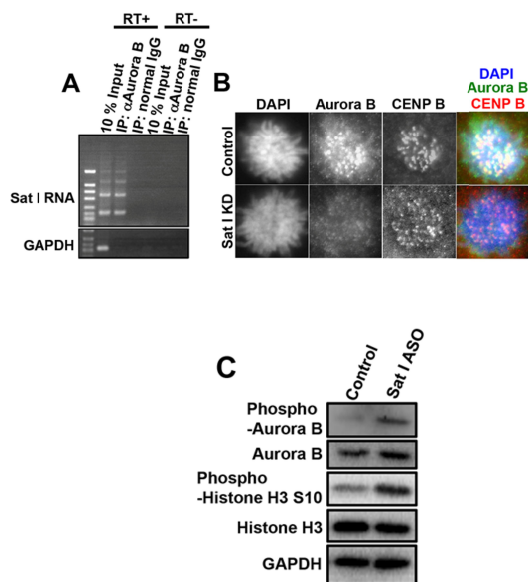
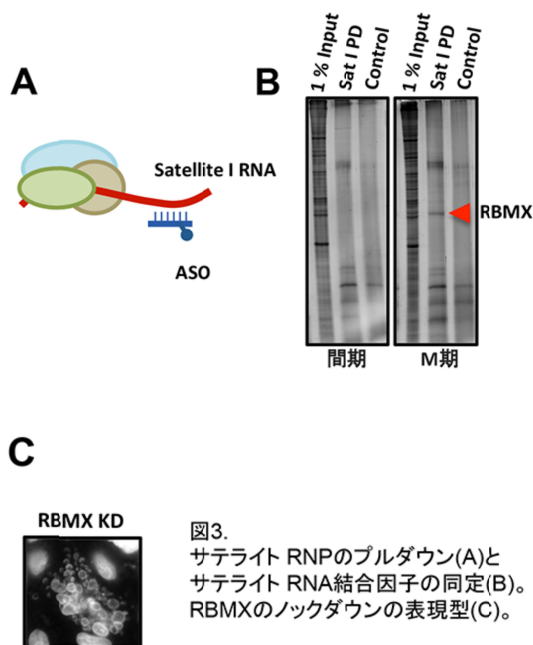


図2. Aurora B免疫沈降産物からのサテライトRNAの検出(A)、サテライト RNAノックダウンによる Aurora B の細胞内局在(B)、およびリン酸化活性への影響(C) Ideue et. al. Genes to Cells 2014.

Aurora B の他にも、この RNA に結合し染色体分離に働くタンパク質因子を同定するため、サテライト RNP の単離を試みた(図3A)。アンチセンスオリゴを用いてサテライト RNA のプルダウンを行い、プルダウン産物に含まれるタンパク質を質量分析にて決定した。細胞周期の間期と分裂期からそれぞれプルダ

ウンを行ったが、沈降産物の構成が間期と分裂期では異なっていたことから、サテライト RNP は細胞周期依存的にその構成を変化させていると考えられる(図 3B)。本研究期間では、サテライト RNP 構成因子候補として同定された RBMX について解析を行った。RBMX は RNA 結合モチーフをもつ因子で、RNA スプライシングに作用するという報告はあったが、これまで染色体分離に関わる機能は報告されていない。RBMX の免疫沈降によりサテライト RNA が共沈したことから、確かにこの因子がサテライト RNA に結合しているといえた。この RBMX を RNAi によりノックダウンすると高頻度に Grape phenotype が出現したことから(図 3C)、今回同定したサテライト RNA 結合因子が、RNA と共に染色体分離に関わる可能性を示すことが出来た。この他にも結合因子を多数同定しており、これらの解析を通して RNA-タンパク質複合体による染色体分離制御のより詳細なメカニズムの解明が期待される。



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)

〔雑誌論文〕(計1件)

T. Ideue, Y. Cho, K. Nishimura and T. Tani.

“Involvement of satellite I RNA associating with Aurora B in regulation of chromosome segregation “

Genes to Cells. 査読あり2014

DOI: 10.1111/gtc.12149.

〔学会発表〕(計15件)

1.Y. Cho, T. Ideue, K. Nishimura, T.Tani.

“Involvement of centromeric non-coding RNA in regulation of chromosome segregation.”

19th Annual Meeting of the RNA Society 2014

2014年06月3日~8日 Qubec Canada

2. 塚原千紘、牟田園正敏、森田京、知念 まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄

『セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンのスプライシング制御』

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日~6日神戸ポートアイランド

3. 西村佳菜子、井手上賢、長裕紀子、谷時雄

『スプライシング装置の染色体分離への関与』

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3日~6日神戸ポートアイランド

4. 塚原千紘、牟田園正敏、森田京、知念 まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄

『セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンのスプライシング制御』

第15回日本 RNA 学会年会

2013年07月24日~26日 愛媛 松山

5. 西村佳菜子、井手上賢、長裕紀子、谷時雄

『スプライシング因子群の染色体分離における機能』第15回日本 RNA 学会年会 2013年07月24日~26日 愛媛 松山

6. 長裕紀子、井手上賢、西村佳菜子、荒木令江、谷時雄

『染色体分離を制御するセントロメア由来 ncRNA の機能解析』

第15回日本 RNA 学会年会

2013年07月24日~26日 愛媛 松山

7. M. Mutazono, T. Ideue, M. Morita, K. Nishimura, Y. Cho, C. Tsukahara, C. Chinen, J. Nakayama, K. Ishii and T. Tani

“Involvement of the novel complex consisting

of the splicing factor Prp14p/DHX38 RNA helices and centromeric non-coding RNAs in the regulation of chromosome segregation ”

18th Annual Meeting of the RNA Society 2013
2013年06月11日~16日 Davos, Switzerland

8. 牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、塚原千紘、知念 まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄

『セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンの役割』

第 85 回日本生化学会大会

2012年12月14日~16日 福岡

9. 井手上賢、長裕紀子、西村佳菜子、谷時雄
『セントロメア由来 Satellite I RNA の染色体分離における役割』

第 85 回日本生化学会大会

2012年12月14日~16日 福岡

10. 井手上賢、牟田園正敏、塚原千紘、森田京、西村 佳菜子、長裕紀子、知念まどか、中山潤一、石井 浩二郎、谷時雄

『染色体分離におけるスプライシング因子とセントロメア non-coding RNA の新たな保存された機能』

第 85 回日本生化学会大会

2012年12月14日~16日 福岡

11. M. Mutazono, T. Ideue, M. Morita, K. Nishimura, C. Tsukahara, C. Chinen, J. Nakayama, K. Ishii and T. Tani “ Novel and conserved roles of the splicing factor PRP14 RNA helices in the noncoding RNA-mediated centromere function ” Cold Spring Harbor Meeting 2012 Regulatory & Non-coding RNAs 2012年08月28日~09月01日 Cold Spring Harbor USA

12. 牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、塚原千紘、知念 まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時 雄

『セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンの役割』

第 14 回日本 RNA 学会年会

2012年07月18日~20日 東北大学 仙台

13. 井手上賢、徳永和明、長裕紀子、西村佳菜子、中尾光善、谷時雄

『哺乳動物の染色体分離を制御するセントロメア由来 ncRNA の解析』

第 14 回日本 RNA 学会年会

2012年07月18日~20日 東北大学 仙台

14. T. Ideue, K. Tokunaga, M. Morita, K. Nishimura, M. Chinen, M. Nakao and T. Tani “ Involvement of splicing Factors in Chromosome Segregation in Mammalian Cells ”

17th Annual Meeting of the RNA Society 2012

2012年05月29日~02日

ANN ARBOR MICHIGAN USA

15. 牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、塚原千紘、知念 まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄

『スプライシング装置を介したセントロメアヘテロクロマチン形成の制御』

第 6 回日本エピジェネティクス研究会

2012年05月14~15日学術総合センター 東京

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

1. 名称：染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディング RNA を標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法。

発明者：谷時雄 井手上賢

出願人：熊本大学

番号：特願出願 2013-4705

出願年月日：平成 25 年 1 月 15 日

国内外の別： 国内

2. 名称：染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディング RNA を標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法。

発明者：谷時雄 井手上賢

出願人：熊本大学

番号：JST/JP2013/069541

出願年月日：2013,7,18

国内外の別： 国際

6. 研究組織

研究代表者 井手上 賢 (Ideue Takashi)

熊本大学 自然科学研究科 助教

研究者番号：20420250