

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870442

研究課題名(和文) セントロメアRNP複合体の動態解析と染色体分離における作用機序

研究課題名(英文) Analysis for mobility and molecular mechanism of centromeric non-coding RNP in 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト染色体セントロメア領域から産出されるノンコーディング(nc)RNAについて、このRNAがタンパク質と複合体(RNP)を形成し、細胞分裂の際に、染色体分離ならびに細胞質分裂に作用する可能性について解析した。セントロメアncRNAとRNPを形成する構成因子としてRBMX, IMP-3, IQGAP1を同定し、免疫沈降実験により、RNAと結合する時期を検討した。ncRNAおよびそれぞれのRNP構成因子群について、細胞内の局在パターンの検討と、ノックダウン細胞の表現型から、これらの因子が、セントロメアncRNAとのRNP構成因子として染色体分離および細胞質分裂に関与する可能性を示すデータを得た。

研究成果の概要(英文)： Non-coding (nc)RNA transcribed from human centromere region forms RNA-Protein complex with several factors, and have a role in chromosome segregation and cytokinesis. In this study, I have identified several factors associate with centromere ncRNA and analyzed these functions in chromosome segregation and cytokinesis as a components of centromere ncRNP.

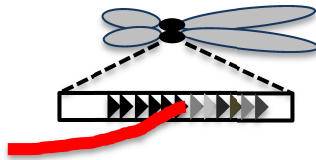
RBMX, IMP-3, IQGAP1 are identified as a components of centromeric ncRNP. IP experiment revealed that these factors associates with centromere ncRNA. Depletion of RBMX showed abnormal chromosome segregation and sister chromatid separation. IMP-3, IQGAP1 and Centromere ncRNA shows localization of central spindle and midbody which concern to cytokinesis after chromosome segregation. Depletion of ncRNA and these factors show abnormal cytokinesis in addition of defects of chromosome segregation. These results reveals that these factors have a role in not only chromosome segregation but also cytokinesis together with centromeric ncRNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノンコーディングRNA セントロメア 染色体分離 RNP 抗がん戦略

1. 研究開始当初の背景

厳密に制御される細胞分裂の諸過程の中でも、染色体を正確に分離させる仕組みの全体像はいまだ明らかではない。この過程においてセントロメアは、染色体を両娘細胞へと分離させるキネトコアが形成される領域である。ヒト染色体のこの領域は、サテライト配列と呼ばれる1ユニットが171bpの反復配列領域により構成されている。この反復構造はヒトに限らずマウスなど哺乳動物のゲノムにおいて多く見られるが、セントロメア機能における役割は未明である。近年ここからノンコーディング RNA (ncRNA) が転写されることが報告された(図1)。



(図1)本計画の対象であるヒトセントロメア領域の反復配列から産生されるノンコーディング RNA

申請者はこの機能未知なセントロメア由来 RNA を解析するため、アンチセンスオリゴを用いたノックダウンを試み、それに成功した。その結果、この RNA を欠失した細胞は、一つの細胞内に無数の小さな核を生じる葡萄房様小核と呼ばれる特徴的な表現型を示した。この表現型は細胞分裂期において、凝集した染色体が赤道面に整列せず、分離がなされないにもかかわらず、各々の染色体が脱凝集するといった異常な染色体分離が原因で出現することがわかった。この結果から申請者は、染色体分離を制御する仕組みには、RNA を介した未だ明らかとされていない制御が存在していると考えた。さらにセントロメア RNA には、分裂期キナーゼである Aurora B が、細胞周期の M 期に結合し、それにより Aurora B は正確な局在と活性を示すよう制御されることを見出した。ここで申請者は、セントロメア RNA に結合し染色体分離に関与す

るタンパク質群のさらなる同定を目指し、アンチセンスオリゴを用いてこの RNA をプルダウンすることで複合体を精製し、質量分析によってその構成因子候補を複数同定した。RNA に結合する因子群は間期と分裂期で異なっていた。これは RNA とタンパク質の複合体 (RNP) が細胞周期を通して変動することを示していた。

2. 研究の目的

本申請では、哺乳動物細胞の細胞分裂において、セントロメア領域から産出される ncRNA が、染色体分離関連因子群と細胞周期依存的に RNP を形成し、染色体分離を制御する機構を解明する。RNP を介した新たな染色体分離制御の全体像を明らかにすることを目指す。新しい染色体分離制御を明らかにすることを通して、それをターゲットとした新たな抗がん戦略の創造も目指す。

3. 研究の方法

セントロメア由来 RNA のプルダウンサンプルから質量分析により同定したタンパク質因子 RBMX, IQGAP1, IMP-3, RFRF および YBX1 について、セントロメア由来 RNP の構成因子として染色体分離並びに細胞分裂の各ステップで機能する可能性を検証した。

実験方法として、免疫沈降法によるセントロメア由来 RNA との結合の検証、免疫染色による細胞内局在の検証、ノックダウン細胞の表現型観察等を通し、これらの因子の RNP 構成因子としての機能を検討した。

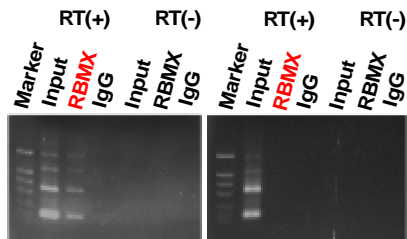
セントロメア RNA ノックダウンは、HeLa 細胞において Aurora B の機能を阻害し、著しい増殖阻害を引き起こす。この影響の細胞間での差異を調べるべく、HeLa 細胞以外のヒト由来培養細胞 HEK293, U2OS, TIG-1 についてもノックダウンを行い細胞増殖速度、細胞の生死を比較検討した。

4. 研究成果

4-1 セントロメア ncRNP 構成因子として同定した因子群 RBMX, IQGAP1, IMP-3, RFRF および YBX1 についての解析結果を以下に述べる。

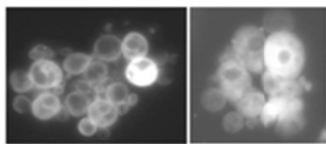
4-1-1. RBMX について

免疫沈降実験の結果、RBMX のセントロメア RNA への結合は、分裂期特異的であり間期では見られないことが示された (図 2)。



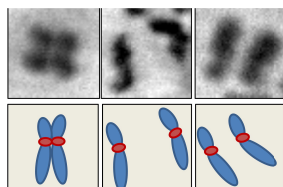
(図 2)RBMX の免疫沈降サンプルからのセントロメア RNA の検出。分裂期 (左) のみ沈降産物内に検出され、間期 (右) では検出されない。

この結果は分裂期の細胞からのプルダウンサンプルからのみ RBMX が同定された結果とも合致する。RBMX のノックダウン細胞は、セントロメア RNA ノックダウン細胞と同様の葡萄房様小核を生じた (図 3)。



(図 3) セントロメア RNA (左)、RBMX (右) ノックダウン細胞の示す葡萄房様小核。

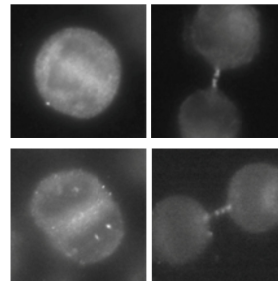
Mitotic chromosome spread 実験の結果、どちらのノックダウン細胞でも、分裂期姉妹染色体を繋ぐコヒーシスが異常分離しており、姉妹染色体の維持に関わる可能性が示唆された (図 4)。現在 RBMX とコヒーシン因子との関連を解析中である。



(図 4) Mitotic chromosome spread による通常の姉妹染色分体 (左) とセントロメア RNA (中)、RBMX (右) ノックダウン細胞で見られる異常分離した姉妹染色分体。

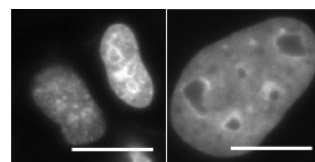
4-1-2. IMP-3, IQGAP1 について

IMP-3, IQGAP1 についても免疫沈降実験により、セントロメア RNA との結合を確認できた。これらの因子のノックダウンは明確な葡萄房様小核の表現型は示さないが、巨大あるいはいびつな形の核が出現することから、染色体分離よりもむしろその後の細胞質分離の異常を考えた。抗体染色実験の結果は、これらの因子が細胞分裂において後半に働くセントラルスピンドルおよびミッドボディーに局在する可能性を示した。非常に興味深いことにセントロメア RNA の in situ hybridization 実験により、この RNA もまたセントラルスピンドルおよびミッドボディーに局在した。(図 5)



(図 5) 抗体染色による IMP-3 (上段) および In situ hybridization によるセントロメア RNA (下段) の細胞内局在。どちらもセントラルスピンドル (左)、ミッドボディー (右) にシグナルが確認できる。

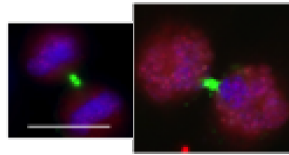
さらにセントロメア RNA ノックダウン細胞は葡萄房様小核の表現型を示す細胞に加えて、巨大核を持つ細胞も多数見られた (図 6)。



(図 6) 通常の HeLa 細胞核 (左) と RNA ノック

ダウン細胞でみられる巨大核(右) Bar:20 μ m

通常 Aurora B は Anaphase において染色体が分離したのちにセントラルスピンドル、ミッドボディーに局在するが、興味深いことに RNA ノックダウン細胞では、染色体の分離がなされないにもかかわらず、Aurora B のミッドボディー様構造物への異常な局在が観察された(図7)。



(図7) 正常なミッドボディー(左)と、RNA ノックダウン細胞でみられる異常ミッドボディー(右) 青: DNA 赤: 抗セントロメア抗体 緑: 抗体 Aurora B 抗体 Bar:20 μ m

この現象と、各種ノックダウン細胞で観察される巨大核の出現との関連については今後も検討するが、以上の結果から、この RNA は IMP-3, IQGAP1 といった因子とともに、染色体分離の過程だけでなく、その後の細胞質分離にも関わる可能性を考えている。

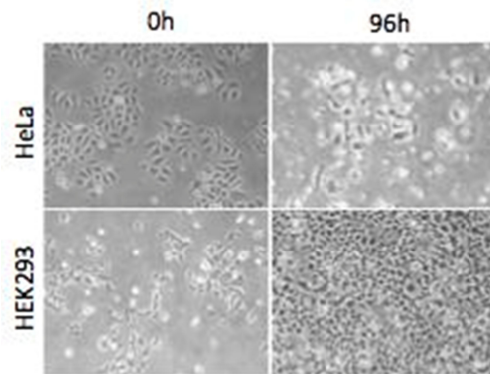
4-1-3. RTRF, YBX1 について

RNP 構成因子の候補として同定されたこれらの因子について、YBX1 については免疫沈降実験により、セントロメア RNA との結合を確認できた。RTRF の RNA への結合の有無については今後検討する。どちらの因子のノックダウン細胞も、細胞質分裂の異常と見られる異常核が観察されており、これらの因子もまた RNP として細胞分裂の過程に関与する可能性を示しているが、さらなる検討が必要である。

4-2 セントロメア RNA ノックダウンを利用した抗がん戦略の可能性について

セントロメア RNA ノックダウン効果の細胞種間における違いについて検討した。これまで子宮頸がん由来の HeLa 細胞において、RNA

ノックダウンが、葡萄房様小核の出現と同時に著しい細胞増殖阻害を示すことを見出していた。一方で同じヒト由来の培養細胞でも胎児腎臓由来 HEK293 細胞は目立った増殖阻害は示さなかった。



(図8) HeLa 細胞および HEK293 細胞における RNA ノックダウンの効果の比較。HeLa 細胞ではノックダウン後 96 時間で増殖阻害が見られるが、HEK293 細胞では正常に増殖している。

同様に骨肉腫由来の U2OS 細胞では阻害がみられるのに対し、繊維芽組織由来の TIG-1 細胞では観られなかった。これらの結果から RNA ノックダウンによる増殖阻害が、がん由来細胞特異的である可能性を考えた。HeLa 細胞では、RNA ノックダウンにより Aurora B の局在および活性に異常が生じる。現在増殖阻害を示さない細胞においてもノックダウンと Aurora B の機能との相関を解析中である。

近年染色体分離のキー因子である Aurora B を抗がん標的として、阻害剤を開発し、がん細胞の増殖を止める抗がん剤として利用する研究、治験が進められているが、阻害剤の示す副作用、つまりはがん細胞だけでなく正常な細胞をも殺してしまう問題点がある。開発中の阻害剤の多くは、ATP 結合を拮抗阻害する低分子化合物である。RNA ノックダウンは、染色体への局在と、リン酸化活性の異常亢進という阻害剤とは全く異なる作用機序で、Aurora B の機能を阻害する。そして正常細胞の増殖は阻害しないといった大きな利

点を持つ可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. 井手上賢 『ノックダウンによる ncRNA の機能解析』羊土社 実験医学増刊号 ノンコーディングRNA テキストブック(2015) 査読なし

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

“Involvement of satellite I RNA associating with Aurora B in regulation of chromosome segregation.” Genes to Cells. 19; 528-538, 2014.

査読あり

〔学会発表〕(計13件)

1.Y. Cho, T. Ideue, K. Nishimura, N.Araki,

T.Tani. “Centromeric non-coding RNP

complexes regulate chromosome segregation”

21th Annual Meeting of the RNA Society 2016

2016年06月3日~8日 Kyoto Japan

2. 郡野紘一、井手上賢、長裕紀子、谷時雄 『ヒトセントロメア由来ncRNA ノックダウン効果の細胞間比較』RNAフロンティアミーティング2015 2015.12.08-10 山形

3.長裕紀子、井手上賢、荒木令江、谷時雄 『セントロメア ncRNP 複合体によるコヒーシオンならびに染色体分離の制御』第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会合同大会 2015.12.01-04 神戸

4. 本田杏子、井手上賢、長裕紀子、荒木令江、谷時雄 『染色体分離を制御する Satellite I ncRNP 複合体における IMP-3 の機能』第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会合同大会 2015.12.01-04 神戸

5. 牟田園正敏、井手上賢、長裕紀子、西岡詩織、坂本美鈴、石井浩二郎、荒木令江、谷時雄 『セントロメア ncRNA 複合体によるクロマチン動態の制御』日本プロテオーム学会 2015 年会 07.23-24 熊本

6.長裕紀子、井手上賢、西村佳菜子、荒木令江、谷時雄 『染色体分離制御に関するセ

ントロメア ncRNP 複合体の同定』日本プロテオーム学会 2015 年会 07.23-24 熊本

7.井手上賢、長裕紀子、荒木令江、谷時雄 『セントロメア ncRNP 複合体は染色体分離および細胞質分裂に関与する』第17回日本 RNA 学会年会 2015.07.15-17 札幌

8.長裕紀子、井手上賢、西村佳菜子、荒木令江、谷時雄 『セントロメア ncRNP 複合体の染色体分離制御における役割』第17回日本 RNA 学会年会 2015.07.15-17 札幌

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

“Novel roles of centromeric non-coding RNP in regulation of sister chromatid cohesion” 第37回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 横浜

10.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の染色体分離における新たな役割』第37回日本分子生物学会年会 2014.11.25-27 横浜

11. T. Ideue, K. Nishimura, Y. Cho, N.Araki,

T.Tani. “Identification of centromeric ncRNP

components involved in regulation of

chromosome segregation” Joint Australia and

Japan RNA Meeting 2014, November 2-5, 2014

Sydney, Australia

12.長裕紀子、井手上賢、西村佳菜子、荒木令江、谷時雄 『染色体分離におけるセントロメア ncRNP の役割』第16回日本 RNA 学会年会 2014.07.23-25 名古屋

13.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

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