

平成 23 年 5 月 27 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770193

研究課題名 (和文) ノンコーディング RNA の大量発現が引き起こす染色体異常の解明

研究課題名 (英文) Gemone instability induced by non-coding RNA expression

研究代表者

飯田 哲史 (IIDA TETSUSHI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：60391851

研究成果の概要 (和文)：

真核生物の染色体のいたるところから発現している翻訳されない RNA (noncoding RNA: ncRNA) は、RNA 監視機構などにより迅速に分解されることが解ってきた。RNA 監視機構の異常は、ncRNA の異常蓄積とゲノムの不安定化を誘発する。逆に、そのような ncRNA の過剰な蓄積がどのように遺伝子発現やゲノムの安定性に影響を与えているかについては不明である。本研究では、分裂酵母を用いて染色体上のレポーターである *ura4* 遺伝子座に ncRNA を人工的に大量に発現させる系を確立した。分裂酵母の最も強力なプロモーターである *nmt1p* により、*ura4* 遺伝子のアンチセンス RNA を大過剰に発現させると遺伝子の抑制 (サイレンシング) が起こることを見出した。ncRNA 依存的なサイレンシングでは、ヘテロクロマチン構造の指標である Swi6 とヒストン H3K9 のメチル化が誘導されないことから、ヘテロクロマチンとは異なる仕組みで遺伝子サイレンシングが起こることが示唆された。興味深いことに、本来ヘテロクロマチン依存的なサイレンシングに必要な RNA 干渉 (RNAi) 関連因子が ncRNA を過剰発現している細胞の増殖に必要であるが、サイレンシング自体には必要でないことも明らかとなった。本研究により、RNAi 機構が RNA 監視機構の一つとして機能し染色体上の異常を抑えている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Cryptic transcripts transcribed from everywhere in eukaryotic chromosomes are rapidly degraded by RNA surveillance mechanisms before translation. Defects in RNA surveillance mechanisms result in aberrant accumulation of noncoding RNAs (ncRNAs) and genome instability. Conversely, how excessively transcribed ncRNAs affect genome stability and gene expression is not known. In this study, we developed an artificial ncRNA-expression system of the *ura4⁺* reporter gene in fission yeast. One of the strongest promoters, *nmt1p*, induced antisense RNA of the *ura4⁺* gene and *ura4⁺* gene silencing. The ncRNA-induced silencing did not associate with histone-H3K9 methylation or accumulation of heterochromatin protein, Swi6, at silenced locus. These results suggest that the ncRNA-induced silencing is regulated by different mechanisms from the heterochromatic silencing. However, interestingly, the RNAi machineries involved in heterochromatic silencing were required for not ncRNA-induced silencing but normal growth of cells excessively expressing ncRNAs. This study proposed that the RNAi mechanism contribute to the RNA surveillance and suppression of genome instability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：ノンコーディング RNA、サイレンシング、RNA 干渉、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

染色体の安定性や分配に関与するセントロメアやテロメアなどの染色体機能領域はヘテロクロマチン構造と呼ばれるクロマチン構造を形成し、遺伝子発現が強固に抑制されています。近年、分裂酵母を用いた研究を中心に、ヘテロクロマチン領域由来の~23ntの短い small interference RNA (siRNA) を介した RNAi の機構がヘテロクロマチン形成を誘発していることが明らかとなり、ヘテロクロマチン領域ではクロマチン構造の変換と ncRNA の転写や分解がダイナミックに行われていることが考えられています。しかし、セントロメア以外の遺伝子領域で起こった ncRNA の異常な転写が染色体にどのような影響を与えるかについては不明です。そこで、本研究では以下の二つの項目に焦点を絞りました。

(1) 当研究代表者が行ってきた分裂酵母の“RNAi によるヘテロクロマチン構造形成機構”の研究から、人工的に siRNA を発現した場合、siRNA のターゲット遺伝子の RNA と近隣から転写が流れ込むアンチセンスの ncRNA がヘテロクロマチン構造の誘発に必要であることが明らかとなっています。このことは、RNAi の機構がヘテロクロマチン形成を行う際、ターゲット遺伝子座のアンチセンスの ncRNA 転写を介した機構がクロマチン構造の変換に重要な役割を担っていることを示唆していますが、その機構については解っていません。現在までに、分裂酵母を用いて染色体上のレポーター遺伝子のアンチセンス RNA を大量に発現する系を作成し、アンチセンス RNA の発現が大過剰になると *cis* にレポーター遺伝子の発現を抑制（以下、“アンチセンス RNA サイレncシング”）していることを見出しています。そこで、本研究では、白血病細胞など等で報告されているアンチセンス RNA の蓄積と遺伝発現抑制機構モデルとして、分裂酵母におけるアンチセンス RNA サイレncシングに注目し、その分子機構の解明を目指しました。

(2) 近年の分裂酵母の研究から、長鎖の二本鎖 RNA から siRNA を切り出す Dicer (Dcr1)、siRNA を介して標的 RNA を認識し切断する Argonaute (Ago1)、標的 RNA から二次的な二本鎖 RNA を合成する RdRP (Rdp1) 等の RNAi 関連因子、ヘテロクロマチンタンパク質 Swi6 やヘテロクロマチン領域の指標であるヒストン H3 リジン 9 (H3K9) のメチル化を行う Clr4 の欠損変異体ではセントロメア領域の ncRNA が蓄積し染色体分配の異常などがみられます。このことは、ヘテロクロマチン形成

異常あるいは ncRNA の異常な蓄積が染色体の異常を引き起こしていることを示唆していると考えられます。現在までに、通常の菌株で本来致死性を示さない RNAi 遺伝子破壊が、レポーター遺伝子のアンチセンス RNA の大量発現下では増殖が異常になることを発見しています。この結果から、RNAi が ncRNA 蓄積によって引き起こされる染色体の異常を解消している可能性が考えられました。そこで本研究では、分裂酵母のアンチセンス RNA 大量発現系を用いて、RNAi 機構の染色体安定性維持や細胞増殖における新たな役割を明らかにすることを旨しました。

2. 研究の目的

真核生物の染色体のいたるところから発現している翻訳されない RNA (noncoding RNA: ncRNA) は、RNA 監視機構などにより分解され、染色体安定性制御および遺伝子発現制御に重要であることがわかってきました。しかし、ncRNA の異常蓄積がどのように遺伝子発現や染色体の安定性に影響を与えているかは不明です。本研究では、ncRNA 転写による遺伝子発現抑制と RNA 監視機構に関連した RNA 干渉 (RNAi) 機構の役割の解明を目的としました。

(1) 「アンチセンス RNA サイレncシング遺伝子領域におけるクロマチン構造」：アンチセンス RNA サイレncシングによって引き起こされるクロマチン構造変化が、H3K9 メチル化と Swi6 タンパク質の結合など、ヘテロクロマチンにみられる抑制性のクロマチン構造と同様の特徴を有しているかを明らかにすることを目的としました。また、アンチセンス RNA サイレncシングが解除される変異体を単離・同定し、サイレンシング分子機構を調べるによりクロマチン構造変化とサイレンシング機構との関係を明らかにすることも目的としました。

(2) 「アンチセンス RNA 大量発現により RNAi 変異体が増殖異常となる原因」：アンチセンス RNA 発現により遺伝子破壊が増殖異常となる RNAi 変異体において、アンチセンス RNA 発現遺伝子座の染色体異常や細胞周期の停止などの異常がおきているかを明らかにし、ncRNA の蓄積による染色体変化の実態を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の方法

本研究は、アンチセンス ncRNA の大量発現が引き起こす遺伝子サイレンシングの分子機構と染色体への影響を明らかにするため、分

裂酵母の染色体上に組み込んだレポーター遺伝子にアンチセンスのncRNA 転写を誘導する系を用いて以下の点を中心にその分子機構を解明を目指しました。

(1) 「アンチセンスRNA により誘導される遺伝子サイレンシング」：分裂酵母を用い、レポーター遺伝子 *ura4⁺* に対し *nmt1* プロモーターを用いアンチセンスRNAの強制発現を誘導する系を確立しました。レポーター遺伝子の発現がアンチセンスRNAの転写によって抑制されるかを観察し、抑制状態が細胞増殖にどのような影響を与えるのかを解析を行いました。また、これまで両方向の転写が知られているセントロメア近傍のヘテロクロマチン領域では、ヒストンH3 リジン9 (H3K9) のメチル化がヘテロクロマチン構造の指標となりサイレンシングとの相関が見られることから、抗H3K9me抗体を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP法) で観察し、アンチセンスRNAの転写によって引き起こされるサイレンシングがヘテロクロマチン領域で観察されるサイレンシングと同じような機構で作用しているのかどうかを調べました。また、H3K9meを認識してヘテロクロマチン形成を実際に行うSwi6タンパク質についても同様にChIP法で解析し、ヘテロクロマチンサイレンシング因子の関与について検討しました。アンチセンスRNA サイレンシングが解除される変異体のスクリーニングとして、*ura4⁺* 遺伝子と *ade6⁺* 遺伝子の二つのレポーター遺伝子を用いて、アンチセンスRNAを *nmt1* プロモーターによって発現させる菌株を作製し、*ura4⁺* と *ade6⁺* の両遺伝子のサイレンシングが解除され、5FOAに感受性かつ Adenine欠乏プレートで白色のコロニーを形成する変異体の単離を目指してスクリーニングを行いました。変異処理した約10万コロニーを調べたが、5FOAに感受性かつAdenine欠乏プレートで白色のコロニーを形成するクローンは得られなかったため、既知のヘテロクロマチン関連遺伝子を破壊しサイレンシングにどのような影響を与えるかを検討することにしました。

(2) 「アンチセンスRNA 大量発現により誘導されるRNAi 変異体の増殖異常の解析」：アンチセンスRNAサイレンシングに関連する因子の探索の一環として、ヘテロクロマチンサイレンシングに関与するRNAi機構関連因子の破壊を行ったところ、*rdp1⁺* 遺伝子の破壊株がアンチセンスRNAの転写に応答して増殖が著しく悪くなることを見出しました。同様に、siRNA を切り出す Dicer (*Dcr1*) と siRNA を介して標的RNA を認識するArgonaute (*Ago1*) の遺伝子の破壊を試みましたが、正常な一倍体ゲノム構造を維持した状態で *dcr1⁺* と *ago1⁺* の遺伝子が破壊されたクローンを得ることができませんでした。実際に二倍体を用いてこれらの遺伝子を破壊し孢子形成させ、四分子

分析により致死性を調べたところ通常の分離で *dcr1⁺* または *ago1⁺* の破壊されたクローンが得られないことを確認しました。四分子分析の際、アンチセンスRNAの転写誘導は行っていないことから、*dcr1⁺* または *ago1⁺* の遺伝子破壊株は、漏れ出た程度のアンチセンスRNAでも増殖に異常をきたす可能性が考えられました。アンチセンスRNAの転写誘導によって増殖が異常になる *rdp1⁺* 遺伝子の破壊株では、野生型株と異なるクロマチン構造が異常に形成されている可能性を調べるために、アンチセンスncRNA 発現誘導により、ヘテロクロマチン関連タンパク質の修飾や結合が変化するかを H3K9me と Swi6抗体をもちいてChIP解析を行いました。

以上のアプローチにより、アンチセンスncRNA による遺伝子発現抑制機構とそれに関わるRNAi の役割を調べました。

4. 研究成果

本研究では、レポーター遺伝子のアンチセンスRNA を大過剰に発現させると遺伝子の抑制 (サイレンシング) が起こることを見出しました。このとき比較的弱いプロモーターを用いた場合にはサイレンシングが観察されないことから、大過剰のRNAの転写がサイレンシングに重要であることが明らかとなりました。ncRNA 依存的なサイレンシングでは、ヘテロクロマチン構造の指標である Swi6 とヒストン H3K9 のメチル化が誘導されないこと、またヘテロクロマチン形成に必須な因子を破壊してもサイレンシングが維持されることから、ヘテロクロマチンにおけるサイレンシングとは異なる仕組みで遺伝子サイレンシングが起こることが示唆されました。本来ヘテロクロマチン依存的なサイレンシングに必要なRNA干渉 (RNAi) 関連因子がサイレンシング自体には必要ではないにもかかわらず、ncRNA を過剰発現している細胞の増殖に必要なことが明らかとなりました。このことは、RNAi 機構がヘテロクロマチン形成のために機能しているだけでなく、RNAi 機構が異常なncRNAの監視機構の一つとして機能し染色体上の異常を抑えている可能性が示唆されました。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 飯田哲史、筒井康博 “RNAi mediated cell cycle regulation in fission yeast” 第32回日本分子生物学会 2010年12月9日 神戸

[その他]

ホームページ等 1件

<http://www.nig.ac.jp/labs/CytoGen/>

6. 研究組織

飯田 哲史 (IIDA TETSUSHI)

国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系 助教

研究者番号 : 60391851