

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21115007

研究課題名(和文) 遺伝学的アプローチによる高分子非コードRNAマシナリーの生理機能解析

研究課題名(英文) Genetic approaches to physiological functions of long noncoding RNA machinery

研究代表者

影山 裕二(Kageyama, Yuji)

神戸大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：90335480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 105,900,000円、(間接経費) 31,770,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの高分子非コードRNAについて突然変異系統を用いた遺伝学的な解析を行い、非コードRNAが脳内の神経回路形成を支配していることを示した。また、哺乳類の遺伝子量補償において、X染色体の不活性化に決定的な役割を果たしているXist RNAについて、Xist RNAがhnRNP Uと呼ばれるRNA結合タンパク質を介してX染色体と結合していることを示した。さらには、従来高分子非コードRNAと考えられていたRNAの中に、実際にはごく小さなペプチドをコードするものが存在し、このようなごく小さなペプチドが多数の遺伝子発現を制御しているケースがあることを示した。

研究成果の概要(英文)：Current research project demonstrates biological importance of long noncoding RNA by genetic approaches using fruit flies and mice. Mutational studies showed that 1) high-molecular weight long noncoding RNA plays an important role in formation of neural circuits in the adult fly brain and 2) RNA binding protein hnRNP U, which carries both an RNA binding domain and a chromatin binding domain, is essential for localization of Xist RNA, an essential component in dosage compensation in mammals. In the course of study, we found that some of the putative long noncoding RNA include short ORFs that encodes extremely small peptides and those peptides, at least in some cases, regulate gene expression in transcriptional network.

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：ショウジョウバエ マウス 非コードRNA 神経発生 不活性化X Xist ペプチド

1. 研究開始当初の背景

高分子非コード RNA の多くは組織・細胞特異的に発現しており、発生分化や行動をはじめとする高次生命現象に重要な役割を果たしていると考えられている。近年のトランスクリプトーム解析により、転写産物の多くがタンパク質をコードしない高分子非コード RNA (long ncRNA) であることが明らかとなっており、RNA が機能分子として多様な活性を担っている可能性が指摘されている。実際にこれらの多くは時期・組織特異的発現を示すことから、発生・分化や行動・記憶といった高次生命現象に関与していることが予想されている。しかしながら、研究開始時点において、生理機能が明らかになっている long noncoding RNA の数はごく限られたものに過ぎなかった。

2. 研究の目的

ヒトを含む高等真核生物で多数同定されている高分子非コード RNA のうち、変異体が単離され詳細な機能解析が可能なものはごくわずかである。ショウジョウバエ神経系に発現する MRE32 や、腫瘍細胞株において顕著な発現が見られる MENε/β はこれら条件に適合する希有な例であり、発生・分化あるいは行動・記憶といった高次生命現象を指標に、変異体を用いた詳細な表現型の解析を行うことにより、生体内におけるその役割を明らかに出来ると考えられた。また、そこで得られた知見をもとに、個々の RNA と相互作用する因子を同定することで、高次生命現象における非コード RNA 作用マシナリーの全体像を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

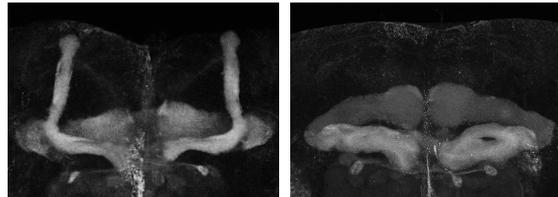
(1) ショウジョウバエ高分子非コード RNA の機能を明らかにするため、非コード RNA の発現細胞および細胞内局在を詳細に解析する。また、これら非コード RNA の変異体の表現型を解析し、その生理的役割を明らかにする。さらには、非コード RNA と遺伝学的に相互作用する遺伝子を同定することにより、その動作メカニズムを分子レベルで明らかにする。

(2) 高分子非コード RNA 遺伝子のノックアウトマウスについて、切片を用いた組織の形態観察を中心とした解析を行い、核内構造への影響を解析するとともに、生体内における非コード RNA の生理的役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ MRE32 RNA は、胚発生期における発現を指標として同定された高分子非コード RNA の一つであり、胚発生中期から後期にかけて中枢神経系に強く発現することが知られている。MRE32 変異体

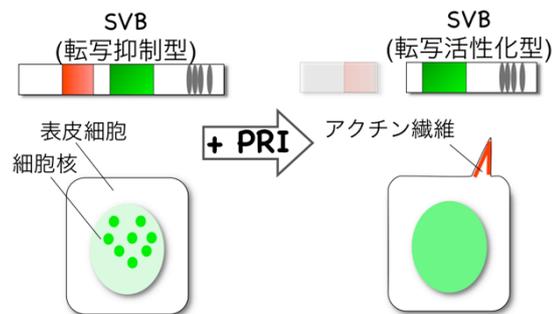
の成虫脳を、記憶・行動の中核であるキノコ体の分子マーカーで染色したところ、キノコ体の5葉の領域のうち、α および α' lobe が特異的に欠損していたため、この表現型に基づき MRE32 遺伝子を *lobe-less (lol)* と再命名した。LOL RNA は胚発生期においてキノコ体神経芽細胞の直近の細胞群で発現しており、*lol* 変異体では軸索誘導に必須の遺伝子である *off-track* の異所的な強い発現が見られた。これらのことから、LOL RNA が *off-track* 遺伝子を介して軸索誘導を制御し、キノコ体の形態形成に寄与していることが示唆された。



ショウジョウバエキノコ体 (左) にみられる垂直方向(背側)に伸長する軸索の束構造(lobe)が、*lobe-less* 変異体 (右) では欠損している。

上記の研究過程において、ショウジョウバエ胚発生期において外胚葉性上皮細胞に強く発現する *polished rice (pri)* 遺伝子についても新たな知見が得られた。*pri* 遺伝子は、明確な ORF を持たないことから noncoding RNA 遺伝子であると考えられていたが、RNA に含まれるごく短い ORF が種間で保存されており、ごく短いペプチドをコードしている可能性が指摘されていた。*pri* 変異体では上皮細胞が形成する細胞突起(歯状突起)がほぼ完全に欠損するが、遺伝学的解析より、*pri* 遺伝子が歯状突起形成のマスター遺伝子である *Shavenbaby* の活性に必要であることが明らかとなった。*Shavenbaby* は転写因子をコードしているが、培養細胞を用いた生化学的解析の結果、*pri* 遺伝子が *Shavenbaby* タンパク質の部分分解に必要であること、部分分解により *Shavenbaby* の転写抑制ドメインが除去され活性化が行われること、この活性化には *pri* の翻訳産物が必要であることが明らかとなった (Science, 2010)。

(2) 核内は均一な構造ではなく、特定の機

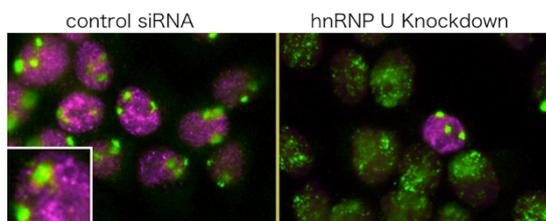


細胞の形を決める PRI ペプチド

能を持った核内構造体で満たされている。マウス Gomafu, Neat1, Malat1 はそれぞれ新規核内構造体、核スペckル、パラスペckル

に局在するノンコーディング RNA で、培養細胞を用いた実験で様々な機能が報告されているものの、個体レベルでの機能はいまだに明らかとなっていない。そこで、それぞれのノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。予想に反し、そのいずれも外見上は全く以上を示さず、これらの遺伝子は通常飼育環境下では必須でない事が分かった (Nakagawa et al., *J Cell Biol* 2011; Nakagawa et al., *RNA* 2012)。しかしながら、引き続き行った詳細な解析により、Neat1 のノックアウトマウスのメスの一部の個体は黄体形成不全による妊孕性の低下という表現型を示すこと、Gomafu のノックアウトマウスは基礎活動量が増加し、その表現型はメタンフェタミンの連続投与により異常に亢進することがあきらかとなった。一連の結果により、これらのノンコーディング RNA 群は特殊な環境下で機能を発揮することが予想された。さらに、Gomafu の作動原理を明らかにするために結合タンパク質の同定を試みたところ、ブランチ部位結合タンパク質として知られている SF1 が結合する事が分かった (Tsuiji et al., *Genes Cells* 2011)。さらに、Gomafu の断片は *in vitro* でのスプライシング反応をブランチ部位の配列特異的に阻害する事も分かった。また、Gomafu を過剰発現すると統合失調症の原因遺伝子のスプライシングパターンが変化することも明らかとなった。これらの結果により、Gomafu は特定の環境下で標的遺伝子のスプライシングを制御している事が明らかとなった。

また、上記の研究過程で、代表的な高分子非コード RNA である Xist RNA の不活性 X 染色体への局在化には hnRNP U が必須であり、その局在化には hnRNP U にある RNA 結合ドメインとクロマチン結合ドメインの両方が必要であることを示した (*Dev. Cell*, 2010)



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 10 件)

1. The binding of multiple nuclear receptors to a single regulatory region is important for the proper expression of EDG84A in *Drosophila melanogaster*. Akagi K, Kageyama Y, Kayashima Y, Takakura Y, Hirose S, *Ueda H.. *J. Mol. Biol.* 2013 Jan 9;425(1):71-81.
2. Small peptides switch the transcriptional

activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis. Kondo T, Plaza S, Zanet J, Benrabah E, Valenti P, Hashimoto Y, Kobayashi S, Payre F, *Kageyama Y. *Science* 2010 Jul 16;329(5989):336-9.

3. The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing. Barry G, Briggs JA, Vanichkina DP, Poth EM, Beveridge NJ, Ratnu VS, Nayler SP, Nones K, Hu J, Bredy TW, Nakagawa S, Rigo F, Taft RJ, Cairns MJ, Blackshaw S, Wolvetang EJ, *Mattick JS. *Mol Psychiatry*. 2014 Apr;19(4):486-94.
4. *Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. *Mol Biol Cell*. 2014 Jan;25(1):169-83.
5. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H. *Mol Brain*. 2013 Jul 8;6:31.
6. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, *Hirose T. *EMBO J*. 2012 Oct 17;31(20):4020-34.
7. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice. *Nakagawa S, Ip JY, Shioi G, Tripathi V, Zong X, Hirose T, Prasanth KV. *RNA*. 2012 Aug;18(8):1487-99.
8. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. *J Cell Biol*. 2011 Apr 4;193(1):31-9.
9. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1. Tsuiji H, Yoshimoto R, Hasegawa Y, Furuno M, Yoshida M, *Nakagawa S. *Genes Cells*. 2011 May;16(5):479-90.
10. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Tsutui K, *Nakagawa S. *Dev Cell*. 2010 Sep 14;19(3):469-76.

[学会発表] (計 26 件)

1. Yoshiko Hashimoto, Kaori Niimi, Takefumi Kondo, Yuji Kageyama. A small peptide gene, polished rice, participates in *Drosophila* ecdysone signal pathway. The 18th International Ecdysone Workshop, České Budějovice (Czech Republic),

- July 2010.
2. 近藤武史、Serge Plaza、Jennifer Zanet、Emilie Benrabah、Philippe Valenti、橋本祥子、小林悟、François Payre、影山裕二 短鎖ペプチドによる転写因子の活性制御 第12回日本RNA学会年会 東京 2010年7月
 3. Yuji Kageyama. Small peptide regulators encoded in extremely short ORFs. 4th International Symposium on Nanomedicine 岡崎 2010年11月
 4. Yoshiko Hashimoto, Kaori Niimi, Takefumi Kondo, Yuji Kageyama. A small peptide gene *polished rice* is essential for trichome formation and metamorphosis in *Drosophila*. 第44回日本発生生物学会年会シンポジウム「Genetic Control of Morphogenesis」 沖縄 2011年5月
 5. Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama. Physiological roles of MRE32 RNA in *Drosophila* optic lobe and wing development. The 22nd CDB Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II, Kobe, June 11-13, 2012
 6. Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yasuo Fukami, Yuji Kageyama Physiological roles of MRE32 RNA in *Drosophila* optic lobe and wing development. 第14回日本RNA学会年会、仙台、平成24年7月
 7. Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama. Physiological roles of long non-coding RNA MRE32 in the central nervous system and wing development. 第10回日本ショウジョウバエ研究会、東京、平成24年10月
 8. Sachi Inagaki, Masanao Sato, Yuji Kageyama. MRE32 RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila* adult brain. The 23rd CDB Meeting: Building multicellular systems from cellular cross-talk, Kobe, Jan., 2013.
 9. Sachi Inagaki, Natsuki Nakamura, Masanao Sato, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama. Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*. 第46回日本発生生物学会年会、松江、平成25年5月28-30日
 10. 稲垣幸、佐藤昌直、中村奈月、小林悟、影山裕二 MRE32/Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*. 第15回日本RNA学会年会、松山、平成25年7月24-26日
 11. Sachi Inagaki, Natsuki Nakamura, Masanao Sato, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama. *Drosophila* Lobe-less RNA is essential for axon guidance in development of mushroom body neurons. 2013 Riboclub Annual Meeting, Orford (Canada), Sept. 23-25, 2013
 12. 稲垣幸、佐藤昌直、宮下知之、中村奈月、小林悟、斉藤実、影山裕二 Lobe-less RNA はショウジョウバエキノコ体の形態形成を介して学習・記憶を制御している 第36回日本分子生物学会、神戸、2013年12月3-6日
 13. 影山裕二、稲垣幸 ショウジョウバエ成虫脳の形態形成と記憶・学習を制御する長鎖ノンコーディング RNA 第36回日本分子生物学会ワークショップ「non-coding RNA の分子機能と動作原理」神戸 2013年12月3-6日
 14. Sachi Inagaki, Masanao Sato, Tomoyuki Miyashita, Natsuki Nakamura, Satoru Kobayashi and Yuji Kageyama. Lobe-less RNA is essential for mushroom body morphogenesis in *Drosophila*. 55th Annual *Drosophila* Research Conference, San Diego (USA), Mar. 26-30, 2014
 15. 長谷川優子、中川真一 長鎖非コードRNAの局在と機能に対するRNA結合タンパク質hnRNP Uの役割、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月03日、神戸ポートアイランド
 16. Shinichi Nakagawa "Functional analysis of nuclear long noncoding RNAs", Riboclub 2013, Cheribourg, Canada
 17. 中川真一「レトロトランスポゾン SINE B1 と相同配列を持つ核内ノンコーディング RNA によるグローバルな遺伝子発現制御」日本遺伝学会ワークショップ「転移因子と宿主の相互作用」、2013年9月、慶応大学日吉 キャンパス
 18. Nakagawa, S. "An Architectural Long Noncoding RNA NEAT1 Controls Corpus Luteum Formation in an Age-Dependent Manner", Keystone Symposia "Non-Coding RNAs", Snowbird, Utah USA, April 2012.
 19. Nakagawa, S. "Nuclear Noncoding RNA Neat1 Regulates Corpus Luteum Development in Aged Animals", 22nd CDB meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II", Kobe, Japan, June 2012.
 20. 中川真一「核内ノンコーディング RNA が制御する生理現象」第4回日本RNAi研究会、広島、2012年8月
 21. 中川真一「核内ノンコーディング RNA が制御する生理現象」第4回日本RNAi研究会、広島、2012年8月
 22. 中川真一「核内構造体パラスペックルの骨格ncRNAであるNeat1を欠損するマウ

- スは早期に不妊になる」第14回日本RNA学会年会、仙台、2012年7月
23. Nakagawa, S "Functional analyses of nuclear enriched abundant long noncoding RNAs" 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜、2011年12月
24. Nakagawa, S. "Nonessentials for nothing?-Nuclear bodies paraspeckles are not essential for animal's life" 第63回日本細胞生物学会大会シンポジウム、札幌、2011年8月
25. 中川真一「大量に蓄積する核内ノンコーディングRNAの機能解析-Gomafuを例にとって」第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)シンポジウム、神戸、2010年12月
26. 中川真一「核内長鎖ノンコーディングRNA Gomafu は動物の行動を制御する」第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 裕二 (KAGEYAMA YUJI)

研究者番号：90335480

(2) 研究分担者

中川 真一 (NAKAGAWA SHINICHI)

研究者番号：50324679

(3) 連携研究者

該当なし