

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06743

研究課題名(和文) 熱ショック応答におけるノンコーディングRNAを含有する新規核内構造体の機能解析

研究課題名(英文) Identification of the components of heat-responsive novel nuclear body containing MALAT1, a long noncoding RNA

研究代表者

小野口 玲菜(水谷玲菜)(Onoguchi, Rena)

東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号：30780697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が独自に発見したMALAT1ノンコーディングRNAを含有する熱ストレス応答性の新規核内構造体の機能を解明するために、新規構造体の構成因子をとしてMALAT1結合タンパク質を同定することを目的とした。2016年は、MALAT1結合タンパク質群を網羅的に同定するための手法の確立を行った。2017年は上記手法を用いて、熱処理した細胞におけるMALAT1結合タンパク質群の解析をした結果、70種のタンパク質を同定した。これらには転写因子やスプライシング制御因子が多く含まれていたことから、熱応答性の新規構造体は転写やスプライシングなどの制御に関与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously I found that localization of MALAT1 long noncoding RNA was altered and formed novel nuclear bodies in heat shock condition. In this project, I tried to identify the MALAT1-binding proteins as components of heat-inducible MALAT1 containing nuclear bodies. I initially fixed the experimental condition of affinity purification of MALAT1 RNA: proteins complexes. I identified the 70 kinds of proteins as MALAT1-binding proteins in heat shock condition. Because MALAT1-binding proteins contain the transcription factors and the splicing factors, the heat-inducible MALAT1-containing nuclear bodies may regulate transcription or splicing in heat shock response.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノンコーディングRNA 核内構造体 熱ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報解析手法の発展により、ヒトゲノムから多種大量のノンコーディングRNA(タンパク質のアミノ酸一時配列情報をコードしないRNAの総称)が転写されていることが明らかとなった。特に、核内長鎖ノンコーディングRNAが近年注目されている。申請者は、DNA損傷ストレスに応答して誘導される長鎖ノンコーディングRNAを世界に先駆けて研究し、報告した(Mizutani R. et al., *PLoS One* (2012))。この結果は、ストレス応答において長鎖ノンコーディングRNAが重要な役割を持つことを示唆する結果であった。

上記成果を元に、申請者は細胞ストレスに応答する長鎖ノンコーディングRNAの機能を系統的に解析した。その結果、申請者は以下の予備的データを得た。

- (1) 通常は核スペckルという核内構造体に局在しているMALAT1ノンコーディングRNAが、熱ショック後に核スペckルから離脱し、核スペckルとは異なる核内顆粒体に局在化した。
- (2) 様々な核内構造体のマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫染色実験を行った結果、熱ショック時に見られたMALAT1局在化顆粒体は、既知の核内構造体とは一致しなかった。
- (3) MALAT1ノックアウト細胞では熱ショック後の遺伝子発現の異常が見られた。

熱ショック後の細胞増殖を測定した結果、MALAT1ノックアウト細胞では熱ショック後の細胞増殖が有意に低下した。上記の結果は、熱ショック時にMALAT1を含有する新規の核内構造体が形成されることを示唆している。さらに、この新規核内構造体が熱ショック応答遺伝子発現を制御し、細胞生存に重要な役割を果たすことも示唆された(図1)。

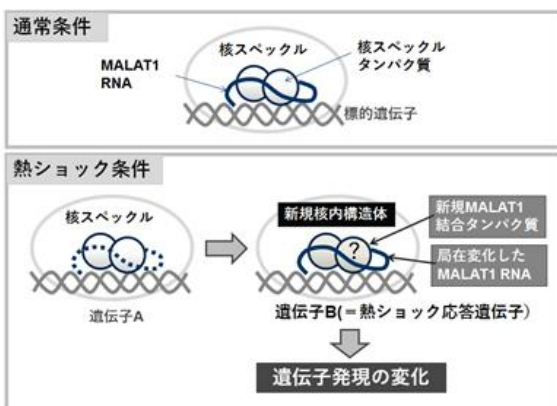


図1. モデル図

しかしながら、MALAT1含有新規核内構造体は申請者が独自に見出した新しい構造体であることから、その構成因子は全く不明であり、熱ストレス応答における生理機能もよく分かっていないという状況であった。

2. 研究の目的

本研究では申請者が独自に見出した、MALAT1を含有する新規核内構造体の構成因子(タンパク質群)を同定し、新規構造体の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

核内構造体の主な構成因子はRNAとタンパク質である。そこで新規核内構造体の構成因子を同定するために、MALAT1と相互作用するタンパク質群の解析を試みた(図2)。

- (1) MALAT1配列に対するビオチン化アンチセンスオリゴDNAを細胞可溶化液と反応させることでアンチセンスオリゴDNAとMALAT1とをハイブリダイズさせる。
- (2) 次に、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化アンチセンスオリゴDNAを回収することでMALAT1を回収する。このとき、MALAT1結合タンパク質も同時精製させると期待される。
- (3) 上記実験で得られたタンパク質を質量分析計で同定する。

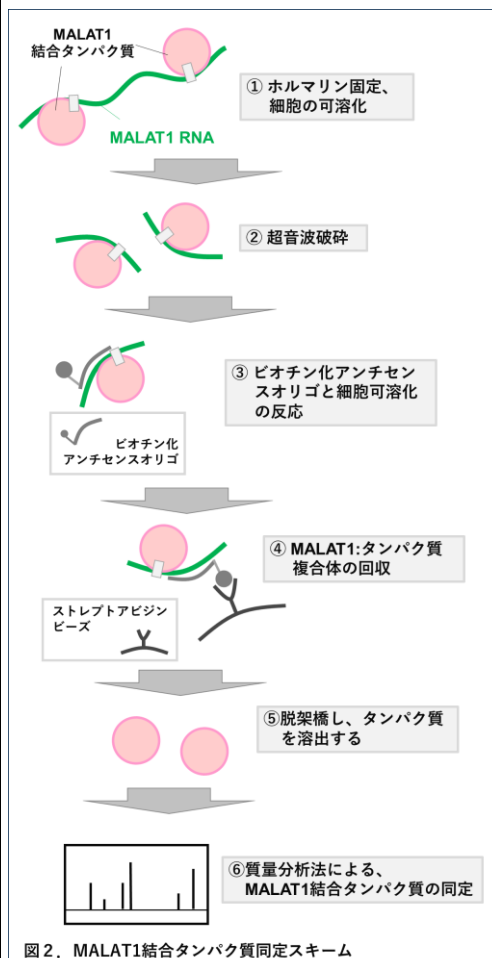


図2. MALAT1結合タンパク質同定スキーム

また、上記で得られたタンパク質群をノックダウンし、熱ストレス時のMALAT1の局在変化に影響を与えるか否かの検証を行った。

4. 研究成果

始めに、MALAT1 結合タンパク質の同定スキームの確立を試みた。MALAT1 に対するアンチセンスオリゴを設計し、RT-qPCR により MALAT1 RNA の回収率の評価を行った。その結果、MALAT1 RNA を特異的に回収できていることを確認した(図3)。このプローブを用いて、熱処理、または未処理の HeLa S3 細胞から MALAT1 RNA: タンパク質複合体のアフィニティー精製を行った。回収されたタンパク質を質量分析解析に供し、網羅的に解析した(図4)。

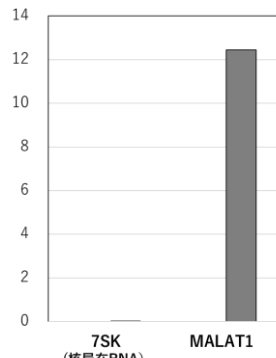


図3. RNA回収率の評価
アンチセンスオリゴを用いた時のRNAの回収率をqPCRにより評価した。

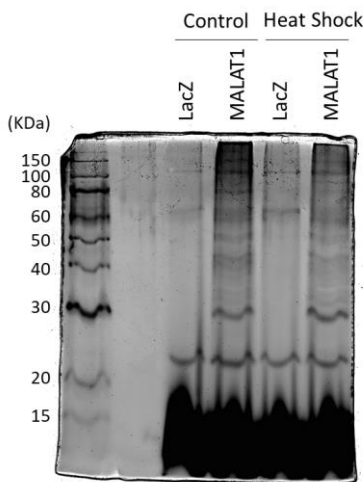


図4. 回収されたタンパク質の評価
アフィニティー精製により回収されたタンパク質をSDS-PAGEに供し、Sypro Ruby染色を行った。

その結果、73種のタンパク質が熱処理された細胞における MALAT1 結合タンパク質群として同定された。同定されたタンパク質には転写因子、スプライシング制御因子が多く含まれていた。

得られたタンパク質について siRNA を設計しノックダウン実験を行った。MALAT1 結合タンパク質をそれぞれノックダウンし、熱ストレス時の MALAT1 の局在を RNA-FISH 法と免疫蛍光染色法により観察した。その結果、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞では熱ストレスによる MALAT1 の局在変化が見られたのに対し、一部の MALAT1 結合タンパク質をノックダウンした細胞では熱ストレス時の MALAT1 の局在変化が見られなかった(図5)。

以上の結果より、MALAT1 は熱ストレス時に転写因子やスプライシング制御因子と相互作用することが示唆された。また、これらの因

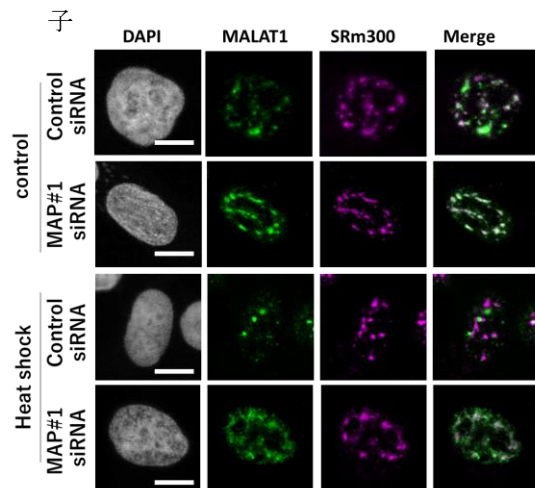


図5. MALAT1結合タンパク質ノックダウンのMALAT1の局在への影響

同定したMALAT1結合タンパク質(MAP; MALAT1-associated Protein)をノックダウンした時のMALAT1(緑)と核スペckルタンパク質(マゼンタ)の局在をRNA-FISH法および免疫蛍光染色法により観察した。

の中には MALAT1 の熱ストレス時の局在変化に重要なタンパク質が含まれていることが明らかになった。このことから、熱に応答して形成される MALAT1 含有新規核内構造体は転写制御やスプライシング制御に関与する可能性が考えられる。

得られた研究成果については、国内の生物系学会では最大規模である Conbio 2017 で口頭発表ならびにポスター発表の演題として採択され、報告した。

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 5 件)

1. Katsutoshi Imamura, Akiko Takaya, Yo-ichi Ishida, Yayoi Fukuoka, Toshiki Taya, Ryo Nakaki, Miho Kakeda, Naoto Imamachi, Aiko Sato, Toshimichi Yamada, Rena Onoguchi-Mizutani, Gen Akizuki, Tanzina Tanu, Kazuyuki Tao, Sotaro Miyao, Yutaka Suzuki, Masami Nagahama, Tomoko Yamamoto, Torben Heick Jensen, Nobuyoshi Akimitsu. Diminished nuclear RNA decay upon Salmonella infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *EMBO J*, in press, 査読有り
2. Keiko Tano, Rena Onoguchi-Mizutani Fouzia Yeasmin, Fumiaki Uchiumi, Yutaka Suzuki, Tetsushi Yada, Nobuyoshi Akimitsu. Identification of Minimal p53 Promoter Region Regulated by MALAT1 in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Front Genet*. 2018 Mar 26;8:208, 査読有り

3. Toshimichi Yamada., Naoto Imamachi., **Rena Onoguchi-Mizutani.** Katsutoshi Imamura, Yutaka Suzuki and Nobuyoshi Akimitsu. 5'bromouridine IP Chase (BRIC)-seq to determine RNA half lives. *Methods in Molecular Biology*, 2018;1720:1-13、査読有り
4. **Rena Mizutani.** Toshimichi Yamada, Nobuyoshi Akimitsu. Techniques for genome-wide expression analysis of non-coding RNA. *Handbook of Epigenetics, 2nd Edition*, 2017, 153-165、査読有り
5. **Rena Mizutani.** Naoto Imamachi, Yoshio Suzuki, Hiroshi Yoshida, Naobumi Tochigi, Tadahiro Oonishi, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu. Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. *Oncogene* (2016) 35, 3495–3502、査読有り

[学会発表] (計 1 件)

1. ○**小野口(水谷) 玲菜**, 鈴木 穰、川村 猛、秋光 信佳 「長鎖非コード RNA, MALAT1 を含有する新規核内構造体を介した熱ショック応答機構の解明」, *Conbio 2017 -2017 年度生命科学系学会合同年次大会-*, 2017 年 12 月, 口頭発表・ポスター発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野口 玲菜 (ONOGUCHI, Rena)
東京大学アイソトープ総合センター・特任
助教
研究者番号：30780697

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()