

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14673

研究課題名(和文)大容量RNA配列の情報解析による中心体非翻訳型RNAの網羅的同定

研究課題名(英文)Identification of centrosomal long-noncoding RNA in human cells

研究代表者

北川 大樹(KITAGAWA, DAIJU)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：80605725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、非コードRNA(IncRNA)が様々な生理現象に関与していることが明らかにされてきた。過去の知見から中心体-分裂期紡錘体の形成に関与するIncRNAの存在は実験的に示唆されていたが、その同定には至っていなかった。本研究では、中心体-分裂期紡錘体系に局在するIncRNAを生化学的手法と次世代シーケンスを融合することで網羅的に同定することを試みた。結果として、分裂期紡錘体形成に関与するIncRNAを一つと中心小体先端部の形成に関与するIncRNAを一つ同定することに成功した。現在は、IncRNAが中心体機能をどのように制御することで紡錘体形成に関与しているか解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, the formation of bipolar spindles is crucial for accurate segregation of chromosomes in mitosis, and therefore it must be strictly regulated for the maintenance of genome integrity. Long non-coding RNAs (lncRNAs) have been recently revealed to function in a wide range of biological phenomena including cell proliferation and tumorigenesis. Interestingly, the existence of spindle-bound RNAs and their importance in mitosis have been previously predicted in human. However, the lncRNAs that function in specific mitotic processes remain to be identified to date. In this study, we identified two uncharacterized human lncRNAs as novel regulators of mitotic spindle formation and centriole formation, using a combination of next-generation sequencing, bioinformatics and biochemistry.

研究分野：細胞生物学

キーワード：IncRNA 細胞分裂 次世代シーケンス 紡錘体 中心体

## 1. 研究開始当初の背景

中心小体は自己複製する特性から、独自の核酸を保有する可能性に関して精力的に検証されてきたが、これまでに中心体に局在する RNA の存在に関して示唆する知見はあるものの、特定するまでには至っていない。一方、近年の網羅的な RNAi を利用したフェノーム解析やプロテオーム解析では、中心体構造や機能に関与する RNA 結合蛋白質の存在が示されている。実際に、我々はヒト培養細胞において、RNA 結合蛋白質が中心体複製のライセンス化に必要であることを報告している (Shiratsuchi et al., EMBO J. (2015))。さらに、中心小体の構成因子に特異的に相互作用する非翻訳型 RNA (non-coding RNA, ncRNA) が中心体形成、分裂期紡錘体形成に関与することを既に見出している (予備実験・未発表データ)。しかし、中心体に特異的に存在する RNA を網羅的に同定し、それらの機能を体系的に理解するような研究は未だ皆無である。

## 2. 研究の目的

中心体は真核細胞において進化上保存された細胞小器官であり、微小管形成中心として機能する。中心体の複製は細胞周期ごとに一度だけ起こるように厳密に制御されており、分裂期紡錘体の形成に重要である。中心体は生命の根元的な特性である“自己複製能”を有することから、独自の核酸を保有する可能性に関して 1970-80 年代に盛んに研究が行われた。DNA の存在に関しては完全に否定されているが、中心体に局在する機能的な RNA の存在は過去の知見から示唆されている。近年、非翻訳型 RNA の細胞内構造体形成への関与が注目されており、中心体構造の構成因子として機能する可能性も考えられる。しかし、未だ中心体に特異的に存在する RNA の実証や、その機能を論じる報告は一切されておらず、体系的に理解されていないのが現状である。本研究では、ヒト中心体に局在する機能的な非翻訳型 RNA を次世代シーケンス技術と機能ゲノミクスを融合することで網羅的に同定し、中心体の構造、機能への役割を明確にすることで当該分野に新たな概念を提示することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ヒト培養細胞から中心体を生化学的に精製し、その中心体精製画分から RNA を抽出し、次世代シーケンスを用いた RNA-seq により配列を同定し、ヒトゲノムへのマッピングを行う。統計的に有為に中心体画分で濃縮されている非翻訳型 RNA を選別する。次に、RNAi を用いて

発現抑制することで、ヒト培養細胞における中心体形成、分裂期紡錘体形成への関与を検討する。

### 1. ヒト培養細胞から中心体の生化学的精製法の確立及び RNA の抽出

ヒト培養細胞である HeLa 細胞、HEK293T 細胞から中心体画分を生化学的に粗精製する方法に関しては、既に当研究室で確立している。主には、ショ糖密度勾配液を利用した超遠心により、中心体を含んだ細胞質画分からの精製を行う。Westernblot 法により、濃縮度や精製度をモニターする。また、RNA 精製後のサンプルについても精製度や濃度の測定を行う。

### 2. 次世代シーケンシングによる RNA 配列の同定及びヒトゲノムへのマッピング

次世代シーケンサー HiSeq2000 を利用し、サンプル中の mRNA 及び ncRNA を網羅的且つ定量的にシーケンスする。検出した配列をヒトゲノム上にマッピングする。

### 3. 統計学上有為差のある (中心体特異的な) ncRNA 群の同定とサンプル間比較の情報解析

全ヒトゲノム領域を 100bp ごとに区切り、リード数でネガティブコントロールと比較して 2 倍以上、4 倍以上の値を示すゲノム領域を選別する。また、リード数が極端に少ない領域に関しては、候補領域から除外する。このアルゴリズムに関しては既に作成済みである。また、サンプル種間 (異なる培養細胞、異なる実験条件、異なる実験) で比較した場合、共通して中心体画分に見出されるものについても選別し検証する。

### 4. GO term、遺伝子発現表現型、過去の文献などの関連情報と照らし合わせ、予想される ncRNA の機能の分類を行う。

データベース上転写されており、ncRNA として登録されているかどうか、過去の解析から明らかにされている機能、発現パターンなどを考慮し、分類を行い、優先順位をつける。

### 5. 候補 ncRNA のヒト培養細胞内における発現を semi-quantitative RT-PCR により確認する。

### 6. 各 ncRNA に対する効果的な siRNA の設計とヒト培養細胞におけるフェノーム解析 (中心体機能、構造への影響を観察)

-これまでの予備実験から mRNA と比較して ncRNA は siRNA の効果が低く、効果的な発現抑制を得るには平均 5 箇所程度、異なる部位をターゲットとし

た siRNA を設計する必要がある。

-ヒト培養細胞における siRNA の効果を semi-quantitative RT-PCR により確認する。

-効果が確認された siRNA を使用して、中心小体形成 (マーカー、Centrin 抗体)、中心体形成 (マーカー、 $\gamma$ -tubulin 抗体)、微小管形成 (tubulin 抗体) などを指標に、HeLa 細胞、U2OS 細胞において表現型の確認を行う。また、興味深い表現型が確認された ncRNA に関しては哺乳類発現型ベクターを介して強発現させ、同様の解析を行う。さらに、CRISPR-Cas9 法を用いて、ncRNA の promoter 領域を両アレル欠損したヒト RPE-1 細胞を作出し、表現型のさらなる確認を行う。設計した siRNA の全てで効果的な発現抑制が得られない ncRNA に関しても、この方法を用いて表現型の解析を行う。

#### 4. 研究成果

ヒト培養細胞から生化学的に中心体を粗精製し、その分画に含まれる RNA を抽出した。具体的には、HeLa 細胞及び 293T 細胞を使用し、ショ糖密度勾配超遠心法により、中心体を含んだ細胞質画分から RNA を抽出した。この RNA の配列情報を、次世代シーケンクスにより網羅的に読み、ヒトゲノム上にマッピングすることで同定した。さらに、サンプル間のリード数比較を統計的に行い、有為差のある、中心体画分特異的に検出された RNA を約 50 同定した。そのほとんどがこれまで解析されていない機能未知の非コード長鎖 RNA (lncRNA) であった。lncRNA 配列は進化速度が通常のコード RNA と比較して非常に速いことから、他生物種における一次配列上の保存性に関しては多くの場合が不明であった。

次に、中心体構成因子の免疫沈降分画もしくは中心体粗精製分画に特異的に濃縮された lncRNA 群のフェノーム解析を siRNA 法を用いて行い、細胞分裂期に機能する新規の lncRNA 二つを同定することに成功した。両方とも機能未知の lncRNA であるが、片方は RNAi を介した発現抑制により、分裂期紡錘体の形成異常を示す極めて興味深い表現型を示した。中心小体及びそれを取り囲む PCM マトリックスの形成においては、顕著な異常は見られなかったが、紡錘体を形成する微小管の濃度が著しく低下し、その結果染色体分配エラーが観察された。この結果は、中心体の微小管形成活性が部分的に失われている可能性を示唆するものである。特筆すべきは、この表現型は細胞特異性を有することである。これまでの解析から、どのヒトがん化細胞でもある頻度で表現型は観察されるものの、U2OS 細胞

や PANC1 細胞など表現型が顕著な細胞種が存在することが確認された。細胞分裂という極めて基礎的なプロセスにおいて、このように多様な表現型が観察される例はタンパク質ではあまりなく、この lncRNA が組織特異的な機能を有することが予測された。一方、CRISPR-Cas9 法による gene knockout を試みたが、現在までのところ得られていない。原因としては、この新規 lncRNA が細胞増殖に必須であることが考えられた。現在はこの表現型の詳細な解析、分子機構に関するデータ取得を進めている。一方、もう一つの lncRNA はその発現抑制により、中心小体の先端部分の構造が一部欠損するという、極めて特異的な表現型を示した。中心小体複製や中心体の機能に直接的な影響は見られないものの、繊毛形成への関与が推測されることから、現在その可能性を実験的に検証している段階である。以上のように、挑戦的な本研究課題において、二つの中心体-紡錘体系の制御に関与する機能未知の新規 lncRNA を見出したことは、当該分野において非常にインパクトのある研究成果に繋がることを期待される。双方とも示す表現型は明快なので、今後は介在する具体的な分子機構を明確にした上で、早期の論文掲載を目指す。

#### 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 4 件)

1. 北川 大樹 A novel lncRNA that regulates Chromosome segregation in human cells, Tokyo RNA club, 2017 年 6 月 26 日, 東京
2. 北川 大樹 染色体分配を制御する新規 lncRNA の解析, 生命科学研究会, 2017 年 6 月 30 日, 金沢
3. 北川 大樹 中心小体複製の分子機構の研究, 日本生化学会, 2016 年 9 月 26 日, 仙台
4. 北川 大樹 染色体分配を制御する非コード RNA の機能解析, Combio2017, 2017 年 12 月 9 日, 神戸

[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

[http://www.f.u-tokyo.ac.jp/research/index.html?cate=1377181381#\\_1378436716](http://www.f.u-tokyo.ac.jp/research/index.html?cate=1377181381#_1378436716)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

北川 大樹 (Kitagawa Daiju) (国立遺伝学  
研究所・分子遺伝研究系・教授)

研究者番号：80605725

### (2)連携研究者

白土 玄 (Shiratsuchi Gen) 国立遺伝学研  
究所・分子遺伝研究系・博士研究員)

研究者番号：80625533