

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18495

研究課題名(和文)染色体分配を制御するヒト新規long non-coding RNAの解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel lncRNA that regulates human chromosome segregation

研究代表者

白土 玄 (Shiratsuchi, Gen)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・特任研究員

研究者番号：80625533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、ヒトの紡錘体形成及び染色体分配への関与が示唆される新規長鎖ノンコーディングRNA(long non-coding RNA/lncRNA)、CENNA1の機能の解明である。研究期間内においてCENNA1発現抑制によって生じる細胞周期の停止と紡錘体形成異常の主な原因が、微小管結合タンパク質CLIP170の染色体上の動原体部位からの脱落にあることが判明した。染色体分配という生命にとって重要な現象を単一のlncRNAが強力に制御している事実は驚きであり、今後の関連分野の研究の発展に大きく貢献すると期待している。

研究成果の概要(英文)：Although long non-coding RNAs (lncRNAs) have been revealed to function in a wide range of biological phenomena, the lncRNAs that function in specific mitotic events are poorly understood yet. In this study, I characterized a novel human lncRNA, named CENNA1 (Centrosomal Non-coding RNA 1) that had been identified as a novel regulator of mitosis by our group. I found that depletion of CENNA1 significantly impaired the establishment of kinetochore-microtubule attachment, accompanied with the loss of CLIP170, a member of conserved microtubule plus-end tracking proteins, from the kinetochores. This study sheds light on the new aspect of lncRNA that controls chromosome segregation and would provide a new avenue to the future cell division research.

研究分野：細胞生物学

キーワード：non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、国内・国外を問わず新たな研究領域として非コード RNA (non-coding RNA, ncRNA) に関連した研究が盛んに行われている。ncRNA という言葉は、coding RNA であるメッセンジャー RNA (mRNA) と対を成す言葉として使われ始めた用語であるが、RNA の在り方としては古くから知られてきたものである。リボソームを構成するリボソーム RNA (rRNA)、それと共に翻訳の主役を担うトランスファー RNA (tRNA) など、実に細胞内の RNA の過半は ncRNA として働いている。これらセントラルドグマの中核を担う古典的 ncRNA 群に加えて、PIWI-interacting RNA (piRNA)、microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA) 等の転写・翻訳を調節する補助的な ncRNA 群も同定されており、例えば siRNA は細胞生物学におけるツールとして欠かせない存在となっている。

(2) ここへ来て ncRNA の存在が強く意識されるようになったきっかけは、FANTOM 計画 (Forrest et al., 2014, Nature) に代表される次世代シーケンサーを用いた大規模転写産物解析の結果にある。驚くべきことに既知の遺伝子のアンチセンス鎖や、所謂ジャンクと称されていた領域からの転写産物が大量に発見され、ゲノム上の遺伝子の大半が発現量の多寡はあれ、何らかの RNA として転写されていることが示されたからである。しかしながら、これら既存の分類に当てはまらない数 kbp ~ 数十 kbp の ncRNA、いわゆる long non-coding RNA (lncRNA) は、その数が膨大なこともあって、その大半の機能が未知のままであった。

2. 研究の目的

(1) 採用者は真核生物の微小管重合中心として働く細胞小器官、中心体 (Centrosome) の形成制御に興味を持ってこれまで研究を行ってきた (Shiratsuchi et al., 2011, JCS)。その過程で中心体形成を負に制御する因子として、NEAT1 lncRNA とともに核内構造体を形成する RNA 結合タンパク質、RBM14 を同定することに成功した (Shiratsuchi et al., 2015, EMBO J.)。RBM14 による中心体形成制御に RNA 結合能は必須ではなかったが、この発見は何らかの RNA 結合タンパク質及び RNA が中心体及び相同器官である紡錘対極 (Spindle pole) の形成や機能を制御する可能性を示唆するものであった。

(2) そこで採用者らは次世代シーケンサーと網羅的 siRNA スクリーニングとを組み合わせ、中心体・紡錘体極近傍で機能する lncRNA に対する網羅的同定を行い、その有力な候補として CENNA1 (Centrosomal Non-coding RNA 1) と命名した新規 lncRNA を同定した。この lncRNA に注目した理由は、ヒト培養細胞における発現抑制によって紡錘体形成や染色体

分配に深刻な異常が生じていたためである (図 1)。単一の lncRNA がこのような重要な生命現象を制御するケースは希少であり、lncRNA の研究においても、また紡錘体形成・染色体分配機構の理解においても、その分子メカニズムの解明は非常に重要であると考えて研究に着手した。

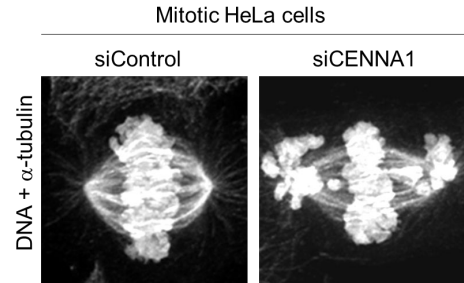


図 1 : CENNA1 発現抑制の表現型

3. 研究の方法

(1) 研究の大きな方針として、ヒト培養細胞における CENNA1 発現抑制時の表現型解析、及び CENNA1 による紡錘体形成及び染色体分配制御の分子メカニズム解析の二つを柱とした。

(2) 前者の具体的な手法としては、複数の培養細胞株に対して siRNA 及び CRISPR-Cas9 を用いてノックダウン実験またはノックアウト株を作成し、紡錘体形成に重要なタンパク質 (キネトコア及びチェックポイント関連) の局在の観察、紡錘体の形状変化や張力発生の有無、細胞分裂に要する時間などを測定し、定量的に CENNA1 の表現型を評価することとした。

(3) 後者の方針としては、前者で得られた情報を元に、CENNA1 の作用するタンパク質複合体を絞り込み、それが転写・翻訳制御を介しての制御なのか、細胞質での RNA-タンパク質複合体形成による直接的な制御なのかを判定するものとした。当初の表現型から予測された候補は申請書にも記した RZZ (ROD/ZWILCH/ZW10) 複合体であったが、それ以外の候補も探索することとした。手法としては免疫沈降・プルダウン法と RT-PCR 法の組み合わせなどを想定した。

(4) CENNA1 が中心体・紡錘体近傍に局在する lncRNA として同定されたことをふまえ、RNA-FISH と免疫蛍光染色 (IF) とを組み合わせる RNA-FISH/IF 法を行うことで CENNA1 の細胞内局在の観察を試み、細胞周期のいつ、細胞内のどこでどのようなタンパク質と CENNA1 が共局在しているか、実験的に示すことも計画した。

4. 研究成果

(1) CENNA1 発現抑制による表現型の再確認
まずは CENNA1 発現抑制時の表現型の詳細

な解析のため、確認作業として複数の siRNA 及びアンチセンスオリゴを用いて、いくつかのヒト培養細胞株に対して発現抑制実験を試みた。その結果、(図1)に代表される染色体の不整列を伴う激しい表現型を HeLa, U2OS 細胞といった癌細胞株、および RPE1 細胞のような非癌細胞株において、再現性良く得ることができた。それに加えて、RNAi 抵抗性の CENNA1 mutant 過剰発現による表現型のレスキューにも成功した。このことは、CENNA1 lncRNA の機能阻害がこの特徴的な表現型と強い相関を持っていることを示唆している。しかし当初計画していた CRISPR-Cas9 によるノックアウト株の樹立は失敗に終わった。その正確な理由は不明だが、ライブイメージング観察の結果、siRNA を用いて CENNA1 の発現を抑制した HeLa 細胞では、しばしば長時間にわたる分裂中期での mitotic arrest とそれに引き続く細胞死が生じていたことから、少なくとも培養細胞株においては CENNA1 の発現を完全にノックアウトした場合、致死になる可能性がある。

(2) CENNA1 発現抑制による紡錘体形成異常の観察

では何故 CENNA1 発現抑制が長時間の mitotic arrest を伴う染色体不整列を引き起こすのだろうか。一般的に分裂中期における mitotic arrest は染色体上のキネトコアと紡錘体微小管との間に十分な張力が働かず、spindle assembly checkpoint (SAC) が活性化されることによって生じると考えられている。そこで免疫蛍光染色法を駆使して染色体上のキネトコアの配置を観察した結果、CENNA1 の発現を抑制した HeLa 細胞では、赤道面に整列している染色体であっても姉妹染色分体上のキネトコア間の距離が有意に短いことが判明した。この結果は、キネトコアと微小管との間に十分な張力が発生していない可能性を示唆している。同時に MAD2 など、SAC 関連タンパク質のキネトコア上での蓄積が観察されたこともこの結果を支持している。興味深いことに、短時間の冷温処理によってキネトコアと強く結合していない微小管を脱重合させた場合、CENNA1 発現抑制細胞では紡錘体の形状が崩れてしまうことも判明した。この現象は以前にも複数のグループによってキネトコア-微小管結合 (KT-MT 結合) が不安定化した細胞で観察されており、CENNA1 発現抑制によって、キネトコアと微小管との結合が不安定化している可能性が示唆された。

(3) CENNA1 のターゲットとなる因子の同定

前述の通り、これまでに多くの研究グループの手によって、KT-MT 結合の不安定化は研究されており、発現抑制によって深刻な KT-MT 結合の不安定化と染色体の整列の乱れ、SAC の活性化を引き起こす因子群がすでに同定されている。そこで、それらの因子の中で

CENNA1 発現抑制によって局在が強く変動しているものを探索することで、CENNA1 のターゲットとなる因子を同定することを試みた。免疫蛍光染色を用いて局在を調査した結果、モータータンパク質である CENPE キネシン及び微小管プラス端結合因子である CLIP170 (Cytoplasmic Linker Protein 170) が、CENNA1 の発現抑制によって、本来の局在場所であるキネトコア上から著しく脱落していることが判明した(図2)。報告されている両者の発現抑制の表現型は CENNA1 発現抑制の場合と似ており、かつその表現型の追試にも成功した。また、CENPE のキネトコアへの局在は CLIP170 に依存していることも以前に報告されており、実際 CLIP170 の発現抑制で CENPE は脱落するが、逆に CENPE の発現抑制では CLIP170 は脱落せず、CLIP170 の方が上流因子であることも追試することができた。さらに CLIP170 の強制発現で CENNA1 発現抑制の表現型がレスキューできることも確認できた。これらの結果は、CLIP170 のキネトコアからの脱落が、CENNA1 lncRNA の発現抑制によって引き起こされるクリティカルな現象である可能性を示唆する。

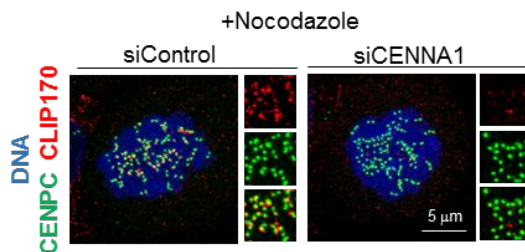


図2 CENNA1 発現抑制によって生じる CLIP170 のキネトコア領域からの脱落

(4) CENNA1 による CLIP170 発現制御の検討

これまで明らかになってきている lncRNA の役割としては、主に核内で転写因子などと結合する、あるいは特定の mRNA や microRNA の前駆体と結合するなどして、ある一群の遺伝子の発現量をまとめてマイルドに変動させる機能を持つものが多い。CENNA1 は中心体・紡錘体局在性 lncRNA として同定したものであり、細胞質でターゲットとなる因子と RNA-タンパク質複合体を形成することを想定していたが、核内でターゲット群の転写調節を行う可能性も十分にある。そこで有力なターゲットの候補である CLIP170、及び PLK1、PKA といった既知の CLIP170 の局在調節因子の発現量を検討したところ、今回の研究範囲では、ここまで激しい表現型を生じるほどの発現量の増加・減少は確認できなかった。未知の CLIP170 の局在調節因子の発現量を制御している可能性や、細胞周期においてごく一過的に発現量を変動させている可能性などは今回の実験系では排除できないため、今後の重要な検討課題であると考えている。その一方、当初の予想通り中心体・紡錘体極近傍

で RNA-タンパク質複合体を形成して直接 CLIP170 の機能を制御している可能性も検討に値するとも考えられる。何故ならば、CLIP170 は C 末側に Zinc Knuckles と呼ばれる DNA/RNA 結合モチーフを保有しているからである。

(5) CENNA1 による CLIP170 局在制御の検討

C 末端の Zinc Knuckles は、同じ CLIP 分子内の N 末端に存在する微小管結合部位をマスクする活性調節ドメインであることが良く知られている。そこで、前項で述べた発現量調節の可能性の追及と並行して、CENNA1 がこの領域に結合することで CLIP170 の活性・不活性化の平衡を活性化側に動かす可能性についても追求することとした。CLIP170 抗体を用いた免疫沈降産物に対する RT-PCR 実験の結果は、コントロールの IgG と比較して、CLIP170 抗体に吸着された分子群と CENNA1 の間により強い結合があることを示唆している。ハウスキープング遺伝子の mRNA では IgG と CLIP170 抗体で大きな差が無いことから、何かしらの選択的な結合があることが推測できる。しかしながらその一方で、*in vitro* 転写した CENNA1 と CLIP170 との直接結合実験においては、コントロールに設定した無関係な mRNA 群と CENNA1 lncRNA との間で CLIP170 分子とのアフィニティーに顕著な差は無かった。この結果は、想定していた両者の直接的な結合による制御の仮説に対しては否定的なものである。ただし、CLIP170 と CENNA1 分子の選択的な結合に、免疫沈降物に含まれている別の結合因子、もしくは *in vivo* での PKA, PLK1 などによる CLIP170 分子のリン酸化などの修飾が必要であると仮定すれば、必ずしもこの結果は仮説を完全に否定するものではない。そのため、こちらの可能性の追求もまた重要な検討課題であると考えている。

(6) RNA-FISH/IF 法の検討

最後に、再現性の高い RNA-FISH/IF 法の確立にも挑戦した。FISH の前後の固定条件などを検討することで、RNA-FISH 後にプローブの蛍光を保った状態で免疫染色を行うことに成功し、RNA 分子とタンパク質の局在の超解像観察を同時に行うことが可能になった。CENNA1 に対するプローブを用いた観察の結果は、核内・核外問わず CENNA1 分子は顆粒状に観察され、一部は紡錘体微小管上にも観察されたが、当初の CENNA1 の同定の経緯から推察される中心体・紡錘体極付近への特異的な集積は確認できなかった。また、細胞質や微小管上では、CLIP170 分子と共局在しているケースとそうでないケースが混在していた。実験条件がまだ不安定である可能性は否定できないが、先の直接結合の可能性と関連して、この一過的な共局在が CENNA1 分子の持つ特性と関係している可能性もあり、今後詳細に検討したい。

(7) 本研究課題の成果

本研究の範囲において得られた情報を元に作成したモデルが図 3 である。CENNA1 が核内・核外どちらで働くかについては前述の通りまだ検討の余地があるものの、細胞質での CLIP170 の活性化とそれに続くキネトコア・紡錘体への局在化を促進する方向に強く影響を与えているのは間違いない。染色体分配という生命にとって重要現象を制御する lncRNA が存在し、かつ特定のタンパク質の機能に強く影響していることを示した点は今回の課題における大きな成果であり、現在内容をまとめた論文を投稿中である。ここ数年、多くの lncRNA の機能が明らかになりつつあるが、前述のように複数の遺伝子の発現をマイルドに制御するものが多く、その意味でこの CENNA1 は極めて特徴的であると同時に、膨大な機能不明の lncRNA の解析を行う上での新たなモデルとなりうると期待している。

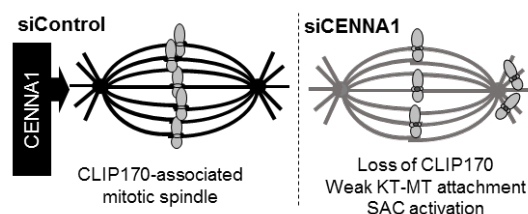


図 3 CENNA1 の機能のモデル

<引用文献>

Forrest, A. R. R. et al. "A promoter-level mammalian expression atlas." *Nature*, 2014 Mar 27;507(7493):462-70.

doi: 10.1038/nature13182.

Gen Shiratsuchi, Ritsu Kamiya, and Masafumi Hirono. "Scaffolding function of the *Chlamydomonas* procentriole protein CRC70, a member of the conserved Cep70 family." *Journal of Cell Science*, 2011 Sep 1;124(Pt 17):2964-75.

doi: 10.1242/jcs.084715.

Gen Shiratsuchi, Katsuyoshi Takaoka, Tomoko Ashikawa, Hiroshi Hamada and Daiju Kitagawa. "RBM14 prevents assembly of centriolar protein complexes and maintains mitotic spindle integrity." *The EMBO Journal*, 2015 Jan 2;34(1):97-114.

doi: 10.15252/embj.201488979.

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 2 件)

白土 玄, 芦川 朋子, 吉場 聡子, 豊

田 敦, 藤山 秋佐夫, 北川 大樹. 「ヒト紡錘体形成を制御する新規 lncRNA の同定.」2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸ポートアイランド, 2017 年 12 月 8 日.

白土 玄, 豊田 敦, 藤山 秋佐夫, 北川 大樹. 「ヒトの紡錘体形成を制御する新規 lncRNA.」第 69 回日本細胞生物学会大会シンポジウム発表, 仙台国際センター, 2017 年 6 月 14 日.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白土 玄 (SHIRATSUCHI, Gen)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・特任
研究員

研究者番号: 80625533

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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