

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07247

研究課題名(和文) 転写量ノイズを消去し細胞均一性を維持する機構の解明

研究課題名(英文) the mechanism that eliminates transcription noise and maintains cell uniformity

研究代表者

鈴木 美穂 (Suzuki, Miho)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80548470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現量の細胞ごとの均一性やばらつきを制御する機構を解明する目的で、核内に滞留するRNA分子に注目し解析を行った。pre-mRNAスプライシングに時間を要するRNAほど、核に滞留する傾向があることがわかった。また、研究の過程でがん細胞に特異的に核内にストックされているlncRNAを見出し、DNA複製の調節に関わる機能をもつことを明らかにした。この研究によって、核のRNAが細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、mRNAが遺伝子から転写された後、すみやかに細胞質へ運ばれて翻訳されることはわかっていたが、あえて核内にとどまるRNAの存在やその生物学的意義についてはよくわかっていなかった。本研究により、限られたスペースに多くのタンパク質や核酸が詰め込まれた細胞核の中で、DNA複製などの細胞に必須の現象がRNAによって時間空間的に制御されていることがわかった。このようなRNAはしばしば疾患特異的に過剰発現しており、治療のターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism that regulates the uniformity and variation of gene expression levels among individual cells, we focused on RNA molecules retained in the nucleus and analyzed them. We found that RNAs that require more time for pre-mRNA splicing are more likely to stay in the nucleus. In addition, we found that lncRNAs stocked in the nucleus, specifically in cancer cells, are involved in the regulation of DNA replication. This study shows that nuclear RNAs play an important role in the maintenance of cellular homeostasis.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写 lncRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、遺伝子発現量は、細胞ごとにある程度自然にばらつきが生じると考えられてきた。しかし最近の研究で、遺伝的・環境的に均一な細胞群では、遺伝子発現量のランダムなばらつきは強く抑えられているということがわかってきた (Battich et al., 2015 Cell)。積極的にノイズを除去し遺伝子発現量を均一に保つことは、細胞運命を決定する上で非常に重要であり、また発生過程や組織恒常性の維持に必須である。転写量の変動(転写ノイズ)は核内で生じる。核では、上流エンハンサーからのシグナルやクロマチンの開閉によって転写の ON/OFF が切り替わり、時間とともに転写量が大きく上下する“転写バースト”という現象が起こる。しかし、その転写ノイズは核内で除去され、細胞質の転写産物量は常に一定に調節されていることがわかった (Halpern et al., 2015, Cell Reports)。受動的なノイズ除去方法として、核膜が転写産物を核内に一時的にストックする現象の重要性が指摘されているが、その他の分子機構はよくわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、核に滞留する RNA を同定し、遺伝子転写量変動のバッファー効果の制御機構を明らかにする。特に、核内に滞留する RNA の種類とその発現制御機構に注目し、その特徴を明らかにする。この研究によって、核の RNA が細胞の恒常性維持に果たす役割のひとつが明らかになり、将来的には細胞不均一性のメカニズムが解明されることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) pre-mRNA スプライシング反応速度と、核に滞留する mRNA 量の関連の解析

野生型のマウス ES 細胞の細胞分画(クロマチン、核質、細胞質)から total RNA を抽出し、RNA-seq を行った。細胞分画手法は Bhatt et al., Cell 2012 に従った。まだ polyA 付加されていない pre-mRNA も検出できるように、ribosomal RNA を除去したすべての RNA を次世代シーケンサーで解析した。転写産物が 3 つの細胞分画(クロマチン、核質、細胞質)にどのような比で存在するかを、すべての遺伝子について調べた。次にその結果を、すでに得られている各イントロンのスプライシング反応速度と比較し、pre-mRNA スプライシング反応速度と、核に滞留する mRNA 量に相関があるかどうかを解析した。

ヒトがん細胞の細胞分画(クロマチン、核質、細胞質)から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。特に核に多く存在する転写産物に注目し、網羅的同定を行った。

#### (2) 核の RNA 分子を可視化・定量する(smFISH)

RNA-seq で得られたデータから、転写産物が核に滞留する時間が長い遺伝子を選び、single-molecule mRNA FISH (smFISH) で RNA 分子の細胞内分布を可視化した。

#### (3) 核に滞留する特異的な lncRNA の解析

上記の研究で見いだされた核に滞留する特異的な lncRNA について、ノックダウンを行いがん細胞の増殖に関わる機能を解析した。実験には、細胞周期を可視化することができる HeLa/Fucci2 細胞を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) pre-mRNA スプライシング反応速度と、核に滞留する mRNA 量の関連の解析

ES 細胞の 3 つの細胞分画 (クロマチン、核質、細胞質)に含まれる RNA を抽出し、ribosomal RNA を除去したすべての RNA を次世代シーケンサーで解析した。3 つの細胞分画に含まれる RNA 量の比を全遺伝子について調べたところ、pre-mRNA スプライシング反応速度と核に滞留する mRNA 量は負の相関関係があることがわかった。つまり、pre-mRNA スプライシングに時間を要する RNA ほど、核に滞留している時間が長いことが示唆された。

分画 RNA-seq データより、転写後核に滞留する時間がより長い遺伝子群について特徴的な塩基配列を探索したところ、エクソンとイントロンの GC 含有量に差があることがわかった。これは、遺伝子情報にすでに細胞均一性を維持する仕組みがコードされていることを示唆する。また、スプライシング反応速度の調節に関わる短い塩基配列の探索を行い、複数のモチーフを見出した。

#### (2) 核の RNA 分子を可視化・定量する(smFISH)

核と細胞質の RNA 分子を可視化、定量するため、single-molecule mRNA FISH (smFISH) を行った。シグナルの検出にはハイコンテンツスクリーニングを行い、画像の取得から解析までを自動で行った。smRNA の結果により、RNA-seq 解析結果の validation を行うことができた。また同時に、細胞集団における遺伝子発現量のばらつきの程度を定量した。

#### (3) 核に滞留する特異的な lncRNA の解析

子宮がん細胞 (HeLa cell) の 3 つの細胞分画(クロマチン、核質、細胞質)に含まれる RNA を抽出し、各分画に含まれる RNA 量の比のデータを得た。この中に、核に滞留する特異的な lncRNA が存在することに注目した。分画 RNA データより、遺伝子から転写される mRNA と同様に細胞質に存在する lncRNA、またそれに加えて、細胞質と核の両方に存在する lncRNA、そして主に核に留まる lncRNA を同定した。核に滞留する lncRNA のうち、発現量が多い lncRNA TUG1 の機能の解析を行った。

### TUG1 ノックダウン (KD) による細胞周期への影響

HeLa/Fucci2 細胞において TUG1 を KD したところ、mVenus 陽性細胞 (S/G2 細胞) の割合が 42% から 65% に大幅に増加した。蛍光免疫染色により、mVenus 陽性細胞における pan- $\gamma$ -H2AX (広範囲に停止した複製フォークを示す) と  $\gamma$ -H2AX foci (複製フォークの崩壊と DSB 形成) の両方が示された。さらに、フローサイトメトリー (FACS) 分析により、TUG1 KD が HeLa / Fucci2 細胞および他の癌細胞株の S 期における  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞を有意に増加させることが明らかになった (図 1)。また、TUG1 KD 細胞では、S 期遅延、もしくは停滞が起きていることが示された (図 1)。TUG1 KD は HeLa、U2OS、U251MG、および T98G 細胞の細胞増殖を阻害した。また、アネキシン V アッセイにより、TUG1 KD 細胞におけるアポトーシスの有意な増加がみられた。以上より、TUG1 KD は、複製異常による DNA 損傷を引き起こすことによって S 期の進行を阻害し、細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導することが明らかになった。

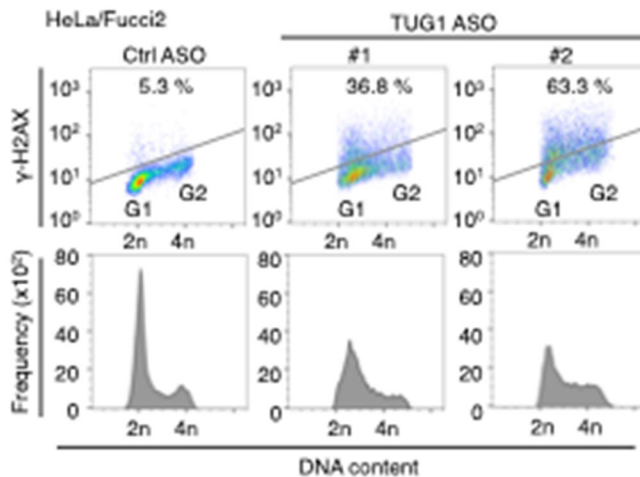


図 1 TUG1 KD による DNA 損傷と細胞周期の変化

TUG1 KD により、TUG1 の発現レベルは、4 つの細胞株でトランスフェクション後 3~5 時間以内に 10% 未満のレベルまで減少していた。 $\gamma$ -H2AX が現れるタイミングを調べたところ、TUG1 KD の 2 時間以内に有意な上昇がみられた。このことは、他の遺伝子の転写や翻訳が  $\gamma$ -H2AX の誘導の原因ではないことを示唆する。

次に、5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) と 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) を使用してダブルパルスラベリングを実行し、TUG1 KD 細胞で進行中の複製フォーク速度を測定し、TUG1 KD の 4 時間後、CldU トラックの分布が短くなる傾向がみられ、フォーク速度の中央値は、コントロールの 0.79 kb /分から TUG1 KD の 0.67 kb /分へと大幅に減少した。このフォーク速度の低下は、U2OS、U251 MG、および T98G 細胞でも見られた。FACS 分析によっても、複製フォークの減少が 4 つの細胞株におけるチミン類似体 (EdU) の取り込み全体に影響を与えることが示された。

### TUG1 分子の核内分布

in situ ハイブリダイゼーション (smFISH) と免疫蛍光法組み合わせ、TUG1 と核スペckル体が核内で共存するかどうかを調べた。

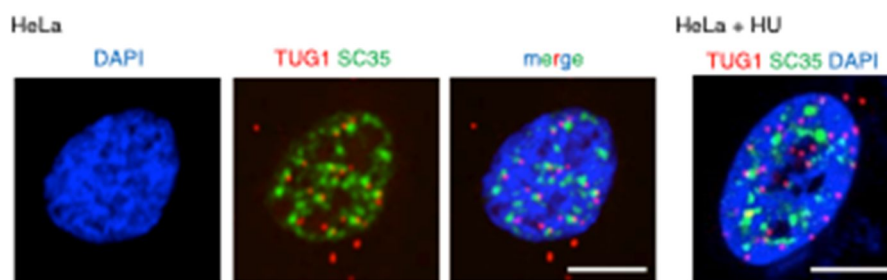


図 2、nuclear speckle と TUG1 の核内分布

様々な核内スペckル体の中で、SC35 をマーカーとして可視化される nuclear speckle の近位に、TUG1 が局在していた (図 2)。ポリコム body、PML body、複製 foci、核小体、パラスペckルなどのその他の核内スペckルとの局在はみられなかった。最も近い nuclear speckle と TUG1 スポットの間の距離を測定したところ、TUG1 スポットの約 40% が、nuclear speckle から 0.5  $\mu$ m 以内、中央距離が 0.9  $\mu$ m に観察された。また、複製を阻害する化合物 hydroxyurea (HU) 処理後、新たに転写された TUG1 は、さらに nuclear speckle の近傍に出現することがわかった (図 2)。TUG1 と核スペckル体間の相互作用は、抗 sc35 抗体を使用した RIP アッセイを使用して確認した。nuclear speckle の形状と数は TUG1 KD によって変化しておらず、TUG1 が nuclear speckle 構造の形成に寄与しないことを示唆した。

以上の結果、細胞質に比べて核に多く存在する RNA が存在することがわかった。その中には核内の生物学的現象に必須の RNA が含まれており、本研究ではその一例として DNA 複製の進行に必須の lncRNA を同定した。核内 RNA の機能を明らかにすることで、細胞が集団として均一性を保つ機能を明らかにすることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohka F, Shinjo K, Deguchi S, Matsui Y, Okuno Y, Katsushima K, Suzuki M, Kato A, Ogiso N, Yamamichi A, Aoki K, Suzuki H, Sato S, Arul N, Prabhakar S, Goke J, Shimamura T, Maruyama R, Takahashi S, Suzumura A, Kimura H, Wakabayashi T, Zong H, Natsume A, Kondo Y	4. 巻 79
2. 論文標題 Pathogenic Epigenetic Consequences of Genetic Alterations in IDH-Wild-Type Diffuse Astrocytic Gliomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4814 ~ 4827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-19-1272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鈴木美穂, 飯島健太, 勝島啓佑, 室伏善照, 新城恵子, 近藤豊
2. 発表標題 S期進行における lncRNA TUG1 の機能
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki M, Iijima K, Katsushima K, Murofushi Y, Shinjo K, Kondo Y,
2. 発表標題 Regulation of Genome Integrity by Direct and Immediate Interaction between lncRNA-1 and Replication Protein A
3. 学会等名 Abcam Epigenetics Conference and 14th Asia Epigenome Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木美穂, 飯島健太, 室伏善照, 新城恵子, 近藤豊
2. 発表標題 DNA複製阻害により発現上昇する lncRNA (長鎖非翻訳RNA) の機能
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Suzuki
2. 発表標題 The biological function of invertebrate DNA methylation in nucleosomal positioning
3. 学会等名 Chromatin Structure and Function Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木美穂
2. 発表標題 転写伸張領域のDNAメチル化による転写共役スプライシング効率の調節
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考