

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06317

研究課題名(和文) 低ノイズlncRNA検出システムの開発と複合体分析による分化スイッチ機構の解明

研究課題名(英文) Establishment of a low-noise live lncRNA detection system and analysis of the lncRNA-proteins complex to elucidate the mechanism for the differentiation switch.

研究代表者

川田 健文 (KAWATA, Takefumi)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：30221899

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)：細胞質lncRNAでの詳細な機能解析や動態追跡された例は限られる。細胞性粘菌の細胞質lncRNAである dutAの詳細な発生における組織特異的局在変化の解析を行い、それを反映したと思われるイメージング用の株を作製した。

同時にRNA-タンパク質複合体組成を分析するために、プルダウン法により多くのdutA RNA結合タンパク質を同定した。また、様々なdutA 変異株を作製し、dutA RNAが転写因子STATaのリン酸化レベルと核移行率の両方に有意に影響することを示した。更に、ChIP-seqによって新規のSTATa標的候補遺伝子を多数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞性粘菌の形成体で機能する転写因子STATaの活性とその調節に関わる細胞質lncRNA dutAの機能を明らかにするには、従来の手法に加え、細胞生物学的手法など全く新しい分野からのアプローチが必要であった。例えば、lncRNA配列中に潜む機能単位とlncRNAの細胞内挙動と生理機能の関連性を理解する必要があるが、本研究で得られた技術はこれを解決するために非常に有益である。

本研究で明らかにしたdutA RNAと結合するタンパク質複合体の構成要素もlncRNAの機能解明に必須である。今回得られた結果はlncRNAによる未分化状態維持と分化のスイッチング機構の解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Only a few cytoplasmic lncRNAs have been analysed in detail for their function, and little has been done for live imaging for those RNAs. In this study, we show that dutA, a cytoplasmic lncRNA in cellular slime moulds, undergoes a dramatic change in the tissue-specific localisation during development. We generated a strain that expresses low levels of both tagged dutA RNA and the YFP-MS2 that binds to it. The YFP signal in this strain almost reflected the tissue-specific localisation of endogenous dutA RNA.

At the same time, many dutA RNA-binding proteins were identified by a pull-down method to analyse the RNA-protein complex composition. Various dutA mutant strains were also generated, and we showed that dutA RNA significantly affects both the phosphorylation level and the nuclear translocation rate of the transcription factor STATa. Furthermore, a number of novel potential STATa-target genes were identified by the ChIP-seq analysis.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：lncRNA 細胞性粘菌 STAT イメージング 形成体(オーガナイザー)

1. 研究開始当初の背景

これまで機能解析された lncRNA のほとんどは核内に局在し、細胞質で機能する lncRNA の研究は最も遅れている。細胞性粘菌の発生における形成体 (オーガナイザー) で作用し、転写因子 STATa の活性を制御することで未分化状態維持に関わる細胞質 lncRNA である *dutA* RNA に焦点を絞って調べてきた。この機能を明らかにすることは、lncRNA による分化の抑制とその解除に関する機序を解き明かすだけでなく、個体中での細胞質 lncRNA の機能に関する知見を広げ、RNA 研究の分野では大変に意義がある。

lncRNA の機能を明らかにするには、従来の手法に加え、細胞生物学的手法など全く新しい分野からのアプローチが必要である。例えば、lncRNA の細胞内挙動と生理機能の関連性を理解する必要があるが、簡便な検出手法が確立されていないことが課題であった。*dutA* RNA の機能を包括的に解析するには発生に伴う動態を知ることが必須であり、これを解決するために汎用的な RNA の動態を高感度に観察出来る技術の開発を目指した。

一般に、lncRNA も RNA-タンパク質複合体を形成しており、複合体分析も lncRNA の機能解明に必須である。近年、核内 lncRNA に結合する因子を精製して解析する方法が確立され、急速に lncRNA 複合体の分析が進展しているが、ここでも細胞質 lncRNA-タンパク質複合体の分析例は少なかった。*dutA* RNA が子実体形成期にどのように消失 (即ち未分化状態を解除) するかは不明で、複合体分析や動態観察はこの疑問を解き明かすと期待された。

2. 研究の目的

dutA RNA のように個体中で生理活性を示して且つ細胞質で作用する lncRNA はほとんど調べられていない独自性の高い存在で、その機能解明を通して細胞質 lncRNA による新たな作用機序を提案することが本研究の目的であった。また、*dutA* RNA は転写因子 STATa の活性化状態に影響を与え、STATa の機能を間接的に制御すると考えられるがそのメカニズムは不明であった。STATa は形成体において機能し、粘菌の形成体に植物の茎頂分裂組織や動物の幹細胞における未分化状態維持と同等の作用を持たせている。従って、*dutA* RNA による STATa 制御メカニズムを明らかにすることで、lncRNA による形成体を介した未分化状態と分化のスイッチングに関するメカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 内在 *dutA* RNA の正確な把握

本研究で開発するイメージング技術の成否の評価として、内在 *dutA* RNA の経時的な局在変化を正確に記述する。この目的のため、whole mount *in situ* hybridisation (WISH) と薄切切片で RNA fluorescent *in situ* hybridisation (RNA-FISH) を行う。

(2) 低ノイズ RNA 動態可視化技術の開発

主に 2 つの方法で 3 次元組織中の *dutA* RNA 動態の可視化を実現する。

- ① MS2 外被タンパクの発現量の制御する方法
- ② スプリット蛍光タンパク質を用いた方法
 - i) *dutA* RNA 中にタグとして MS2 RNA ループと PP7 RNA ループが交互に繰り返す RNA を発現する株を作製し、外被タンパクとスプリット蛍光タンパクの融合タンパク質を発現。
 - ii) 外被タンパクとスプリット蛍光タンパクの融合タンパク質およびスプリット蛍光タンパク質のみを核外で発現。

(3) *dutA* RNA-タンパク質複合体の解析

3×MS2 RNA ループ発現するプラスミドを導入した株に、MS2-MBP (MBP: maltose-binding protein) または MS2-GFP を発現するプラスミドを導入して行う。

- ① MBP-trap 法による検出。
- ② RNA pull-down 法による検出も試みる。対応する遺伝子と cDNA をクローン化する。
- ③ これらの遺伝子の機能解析を試みる。また、蛍光融合タンパク質を細胞性粘菌中で発現。
- ④ 個々の cDNA を利用し、タグ付きタンパク質を大腸菌中や細胞性粘菌中で発現させて精製。

(4) *dutA* RNA が転写因子 STATa の活性化に及ぼす影響

これまでの研究で *dutA* 遺伝子に対する様々な変異体 (遺伝子破壊株 KO、*act15+dutA* 融合プロモーターを用いた過剰発現株 OE、形成体特異的 *ecmF+dutA* 融合プロモーターを用いた強制発現株 EOE) が作られていた。本研究では、これら変異株を用いて *dutA* RNA が STATa 活性化のどのステップに影響を及ぼすかを調べる。

- ① STATa の SH2 ドメイン C 端側のチロシン残基のリン酸化レベルの変動を野生株と比較する。
 - ② STATa の核移行率の変動を野生株と比較する。
- また、変動は以下の 2 つの異なる条件で株間の変動として調べる。i) 通常発生における同じ発生時期の比較。ii) 細胞を緩衝液で洗浄して懸濁して 6 時間飢餓状態にする。この後に cAMP

を加え、通常発生を行わずして STATa のチロシン残基のリン酸化や核移行を誘導する。リン酸化レベルはリン酸化 STATa 特異的抗体と全 STATa 抗体を用いて、ウェスタンブロット法で STATa リン酸化/全 STATa の比率を求めて比較する。核移行率は抗体染色で輝度を測定する。

(5) 新規 STATa 標的遺伝子の探索

dutA RNA が STATa に及ぼす影響を調べるうえで、STATa の未知の標的遺伝子を単離することは有用な手がかりとなる。効率よく網羅的に単離するために、STATa に FLAG タグを付けたものを *STATa* 遺伝子破壊株中で発現させてクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) を行い STATa 標的遺伝子の単離を行う。単離後はクロマチン免疫沈降 (ChIP) と、RT-qPCR による発現量比較で STATa の標的遺伝子かの検証を行う

4. 研究成果

(1) 内在 *dutA* RNA の正確な把握

動態検出システムの評価基準のために内在 *dutA* RNA の時空間的な局在を把握した。WISH (図1上段) 及びRNA-FISH (図1下段)にて *dutA* RNA を検出した。移動体 slug の時期までは、予定胞子細胞に主として見られ、形成体を含む予定柄細胞にはあまり見られなかった(図 1-a, e)。しかし、子実体形成を始める頃になると一旦形成体領域に局在するようになり(図 1-c, f, g)、さらに子実体形成が進むと upper cup とよばれる pstO 細胞の一部に局在するようになった(図 1-d, h)。このように *dutA* RNA は発生時期依存的に組織特異的な局在を劇的に変化させた。また、STATa との共局在も見られなかった。

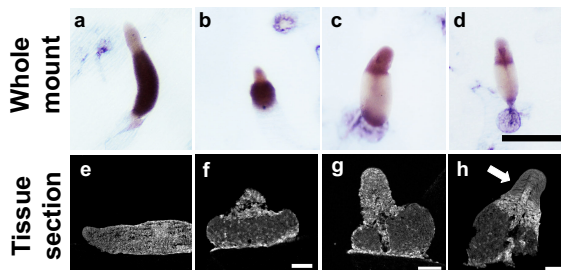


図1 *dutA* RNA の時空間的局在変化

これらの実験を行う過程で *dutA* 遺伝子の位置が細胞性粘菌のデータベースと異なる疑惑が生じた。そこで、RACE PCR の実験を何回か行って 5'端と 3'端をそれぞれ決定した結果、*dutA* 遺伝子のデータベースの位置が間違っていることを発見した。

これらの実験を行う過程で *dutA* 遺伝子の位置が細胞性粘菌のデータベースと異なる疑惑が生じた。そこで、RACE PCR の実験を何回か行って 5'端と 3'端をそれぞれ決定した結果、*dutA* 遺伝子のデータベースの位置が間違っていることを発見した。

(2) 低ノイズ RNA 動態可視化技術の開発

スプリット蛍光タンパク質を用いた方法は MS2-GFP のシグナルを発現するのに用いた *act15* プロモーターの時空間的活性を反映してしまい (つまりはノイズのみを検出した)、どれも上手くいかなかった。そこで、YFP-MS2 を発現するコンストラクトを *loxP-Bsr* 薬剤耐性で細胞に導入 (この場合細胞性粘菌では単一コピーで導入される)。その後、Cre を発現させて *Bsr* 薬剤耐性を除き、*dutA* に 3×MS2 ループを付加した発現コンストラクトを *Bsr* 薬剤耐性で同様に導入した株を作製した。また、コントロールとして同じ株に *RFP* に 3×MS2 を付加した発現コンストラクトを *Bsr* 薬剤耐性で導入した株を作製した。これらの株を用いて移動体の時期まで発生させたところ、*dutA* に 3×MS2 ループを発現する株のみ予定胞子細胞特異的な YFP シグナルが観察された。この発現パターンは内在の *dutA* RNA の移動体期における組織特異的な局在と類似し、ライブイメージングに使用可能な有力候補株である。

しかしながら、コントロール株においても若干予定胞子細胞領域側に強いシグナルが見られるのと、発生後期 (子実体形成期) におけるシグナルの局在が内在の *dutA* RNA とは一致しなかったもので、もう少し精査が必要である。

(3) *dutA* RNA-タンパク質複合体の解析

3×MS2 RNA ループ発現するプラスミドを導入した株に、MS2-MBP を発現するプラスミドを導入した細胞を固定し、MBP-trap 法による検出を試みた。検出された主要なタンパク質数種類についてゲルから切り出し、MALDI-TOF MS によってアミノ酸配列を取得した。細胞性粘菌のレクチンとして知られている Discoidin II (DscE) は DscE 抗体を用いた RNA 免疫沈降 (RIP) 実験では、沈殿物中に *dutA* RNA が検出され、*dscE* 遺伝子破壊株では *dutA* RNA が検出されなかった。このことから、DscE の *dutA* RNA への結合が確認された。しかしながら、特異性の確認はこれからである。

バンドごとにアミノ酸配列を取得することは効率が悪いので、RNA pull-down 法によって沈殿したものを網羅的に解析することにした。細胞を固定しない方法に条件を最適化し、*dutA*+3×MS2 ループ RNA の他にコントロールとして *RFP*+3×MS2 RNA を発現する株を準備した。これらの株に MS2-GFP タンパク質を発現させ、GFP 抗体で pull-down を行なって LC-MS/MS でアミノ酸配列の情報を比較した。その結果、*dutA* RNA 特異的に濃縮される多くのタンパク質を検出した。その中には、多くの mRNA の品質管理機構に関わる因子が含まれていた。これらのうち、特に主要なタンパク質に対応する cDNA と遺伝子をクローン化した。他のタンパク質と同様にタグを付加する作業をしている。これらを細胞性粘菌中で発現させることで pull down や RIP を行い、結合特異性の再検証をする予定である。

(4) *dutA* RNA が転写因子 STATa の活性化に及ぼす影響

STATa の活性化はチロシン残基のリン酸化とそれに引き続いて起こる核への移行の両方で制

御されている。人工的に発生を模す系として上記の cAMP 誘導実験を行なって STATa の活性化状態を調べた。まず、リン酸化レベルの違いをウエスタン法で調べたところ、EOE 株では野生株に比べて有意にリン酸化レベルが低下していた。また、KO 株においては逆にリン酸化レベルが僅かに上昇していた。

次に、全 STATa に対する cAMP 処理後 5 分における核移行率について輝度を測定して求めたところ、EOE 株では WT 株と比較して有意に減少していた。このことから、*dutA* RNA が STATa のリン酸化と核移行の両方のステップに影響を及ぼすことが明らかとなった。

(5) 新規 STATa 標的遺伝子の探索

dutA RNA の STATa を介した様々な影響を調べるために、新規の STATa の標的遺伝子を ChIP-seq によって網羅的に単離することを目指した。このために、STATa 遺伝子破壊株に FLAG タグ付加 STATa を発現する株を作製し、FLAG 抗体で STATa の発現と表現型の救済を確認した。この株と FLAG 抗体を用いて、次世代シーケンサーで標的候補遺伝子を網羅的に検索した。3 つのサンプルのうち、1 つだけ大半の read のピークの位置が異なっていたが、全てのサンプル間で共通するピークも見られ、これらの遺伝子を標的候補とした。その中には既知の候補遺伝子 *cuda* と *gtaG* が含まれていた。

ChIP-seq で同定された候補遺伝子については、野生株、STATa 遺伝子破壊株、及び救済株の異なる 3 つの発生時期から精製した RNA を用いて、定量的 RT-PCR (RT-qPCR) によって転写産物量の変動を調べている。有意に変動のみられた遺伝子については、ChIP 実験による再検証を行っている。

<今後の課題と展望>

本研究において細胞質 lncRNA である *dutA* RNA の動態をリアルタイムで観察できそうな株が得られた。しかしながら、これが本当に目的株であると言い切るためには幾つかの課題をクリアする必要がある。まず、*dutA* RNA と YFP-GFP シグナルが共局在しなければならない。また、発生後期の内在 *dutA* RNA の局在と YFP シグナルの局在が一致しないのは何故か、その原因を探る必要がある。また、低ノイズかと言われるとまだ若干ノイズが高い。発生の時期によっては多細胞体に厚みがあるので、全ての時期に渡って *dutA* RNA の動態を観察するには更なる工夫でノイズを下げる必要がある。

dutA RNA が STATa の活性化において、リン酸化と核移行の両方のステップに影響を及ぼすことに明らかになったが、そのメカニズムは依然として不明である。現在までのところ、pull-down 等の実験で *dutA* RNA と STATa が直接結合している事実は得られていない。新規の STATa 標的遺伝子や *dutA* RNA 結合タンパク質の機能の中にそのメカニズムを解き明かすヒントがあると期待される。

dutA RNA 局在変化に及ぼす要因が何であるかも全てが解明できた訳ではない。しかし、発生後期の局在は強いプロモーター活性による可能性が高い。また、予備実験では移動体期以降の局在変化に *dutA* RNA が細胞外に分泌される可能性も示されている。リアルタイム検出システムはこれらの仮説をサポートし、特に威力を発揮すると思われる。

謝辞：本研究の遂行に多大な貢献をした元大学院生の嵯峨幸夏 博士、元研究員の山田葉子 博士、また、元大学院生の橘高昂平君、大学院生の下山雄大君、鈴木麻友子さんほか、多くの卒業研究生の皆さんに改めて感謝いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamada Yoko, Forbes Gillian, Du Qingyou, Kawata Takefumi, Schaap Pauline	4. 巻 9
2. 論文標題 Loss of PIKfyve Causes Transdifferentiation of Dictyostelium Spores Into Basal Disc Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 692473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.692473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Bodinier Romain, Sabra Ayman, Leiba Jade, Marchetti Anna, Lamrabet Otmane, Ayadi Imen, Fili? Vedrana, Kawata Takefumi, Weber Igor, Cosson Pierre	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of LrrkA in the Control of Phagocytosis and Cell Motility in Dictyostelium discoideum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 629200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.629200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Saga Yukika, Iwade Yumi, Araki Tsuyoshi, Ishikawa Megumi, Kawata Takefumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Analysis of DrkA kinase 's role in STAta activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 422 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bodinier Romain, Leiba Jade, Sabra Ayman, Jauslin Tania N., Lamrabet Otmane, Guilhen Cyril, Marchetti Anna, Iwade Yumi, Kawata Takefumi, Lima Wanessa C., Cosson Pierre	4. 巻 22
2. 論文標題 LrrkA, a kinase with leucine rich repeats, links folate sensing with Kil2 activity and intracellular killing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iriki Hoshie, Kawata Takefumi, Muramoto Tetsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Generation of deletions and precise point mutations in Dictyostelium discoideum using the CRISPR nickase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0224128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muramoto Tetsuya, Iriki Hoshie, Watanabe Jun, Kawata Takefumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Dictyostelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 46 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8010046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 嵯峨幸夏、橘高昂平、福澤雅志、川田健文
2. 発表標題 細胞性粘菌オーガナイザーで働く lncRNA dutA 及びの dutA RNA 結合タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第21回日本RNA生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嵯峨幸夏、橘高昂平、川田健文
2. 発表標題 局在变化を示す細胞性粘菌細胞質 lncRNA dutA の機能解析
3. 学会等名 第20回日本RNA生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukika Saga, Kohei Kitsutaka, Takefumi Kawata
2. 発表標題 Analysis of dutA, a cytosolic lncRNA showing drastic change of the localization during terminal differentiation in Dictyostelium.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohei Kitsutaka, Yukika Saga, Saki Tamukai, Takefumi Kawata
2. 発表標題 Identification of dutA RNA-binding protein in Dictyostelium discoideum.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
研究分担者	村本 哲哉 (MURAMOTO Tetsuya) (10612575)	東邦大学・理学部・准教授 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------