

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370075

研究課題名(和文) 核内低分子RNAによる遺伝子発現の多様性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Small nuclear RNA-mediated mechanism to diversify the genetic information

研究代表者

廣瀬 哲郎 (HIROSE TETSUROU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・研究チーム長

研究者番号：30273220

研究成果の概要(和文)：哺乳類の細胞核内に存在する機能不明のオーファン(o-)snoRNAの機能を明らかにするために、化学修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた核内RNAのノックダウン法を至適化し、多数のo-snoRNAの機能破壊に成功した。RNAポリメラーゼIレポーター遺伝子を用いて、o-snoRNAがRNAメチル化能を持ち、上記ノックダウンによってその活性が消失する事を証明した。o-snoRNAのノックダウンによる遺伝子発現変化をRNA-seqによって解析し、変動する標的候補を複数発見した。核内構造体Cajal体を細胞分画によって精製し、そこに含まれるRNA種をRNA-seq解析で同定し、新しいRNA種を発見した。

研究成果の概要(英文)：To explore the function of orphan snoRNAs that are localized in mammalian cell nucleus, we succeeded in optimization of nuclear RNA knockdown using chemically-modified antisense oligonucleotides. The site-specific RNA methylation activity of o-snoRNP was demonstrated using RNA polymerase I-driven reporter construct. The putative targets of o-snoRNAs were identified from the data of RNA-seq analysis using the RNA samples prepared from o-snoRNA-depleted cells. The novel RNA species were identified from the RNA-seq data of the purified nuclear Cajal body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：遺伝子発現、非コードRNA、RNAプロセッシング、RNA修飾、細胞核

1. 研究開始当初の背景

ヒトのゲノム上には、約22,000個のタンパク質遺伝子しか存在しておらず、その数はショウジョウバエや線虫のそれと大きくかわらない。ヒトにおける様々な複雑な生理現象は、転写された前駆体mRNAの選択的スプライシングやRNA編集などのRNAレベ

ルの制御による多様性の獲得が重要であると考えられている。一方で、ヒトを含む哺乳類のゲノムからは、多彩なnon-coding RNAが転写されており、これらがタンパク質遺伝子の発現過程に作用して微妙な発現調整を行うのではないかという考えも浮上している。本研究では、哺乳類細胞の核内の

non-coding RNA が、タンパク質遺伝子発現の多様性獲得過程で果たす役割を明らかにするために、non-coding RNA の1つのカテゴリーである核小体低分子 RNA(snoRNA) に注目する。snoRNA は、もともと rRNA や snRNA の転写後修飾を司る RNA 群としての機能が確立されていたが、近年 rRNA にも snRNA にも作用しないターゲット未知の snoRNA (オフアン snoRNA、o-snoRNA) が 100 種類以上見つかってきている。このうち唯一ターゲットが予測されている HBII-52 o-snoRNA は、脳で特異的に発現し、セロトニン受容体 5HT_{2c} mRNA の選択的スプライシングと RNA 編集の制御に関わっていることが示唆されている。さらにこの HBII-52 snoRNA は、遺伝性疾患 Prader-Willi 症候群 (PWS) の発症に関わっていることも示唆されている。こうした例から o-snoRNA は、様々な mRNA に作用し、タンパク質の多様性獲得過程の制御因子として機能している可能性が浮上してきた。一方、snoRNA と類似した構造を持ちながら、核小体ではなく Cajal 体という別の核内構造体に特異的に局在化する scaRNA が見出され、核内における低分子 RNA の機能は、空間的な局在部位によっても規定されることが明らかになってきた。本研究では、これら核内低分子 RNA の新しい機能と核内挙動を解明することを目指した。

2. 研究の目的

(1) snoRNA の機能解析は、これまで有効な解析法がなかったことから、世界的にも進んでいなかった。申請者らが最近開発した核内 RNA ノックダウン系を駆使する事により、o-snoRNA を細胞内で機能破壊して、それによって引き起こされる変化を解析することが可能になった。そこで本研究では、ヒトの o-snoRNA のターゲット特定と作用機構の解明を行う。

(2) リボソーム RNA に対して作用する snoRNA と違って o-snoRNA は、核内のどの部位で標的と会合し機能するのかを明らかにする。また Cajal 体に局在する scaRNA が発見されたことから、Cajal 体に局在化する新規な RNA の探索を執り行い、新しい核内 RNA 機能の発見を目指す。

3. 研究の方法

(1) 化学修飾アンチセンスキメラオリゴヌクレオチド (ASO) を細胞核内に導入することによって、核内に局在する o-snoRNA を効率良く分解した。

(2) o-snoRNA の活性は、人工的 RNA ポリメラーゼ I 駆動性のレポーター遺伝子を用いて、細胞内で o-snoRNA が特異的な 2' -O-メチル化活性があることを検出することにより行

った。

(3) U97 snoRNA, HBII295 snoRNA それぞれを 2 種類の ASO によってノックダウンした細胞から RNA を調整し、コントロール細胞由来の RNA と共に、イルミナ GAIII による RNA-seq 解析を行った。それぞれの reads をヒトゲノム上に反映させ、snoRNA のノックダウンによって、read 数が変動する遺伝子領域をリスト化し、上記のリストの中でスコアの高い遺伝子を qRT-PCR によって検証した。

(4) snoRNA と mRNA との相互作用及びヌクレオチド修飾の可能性を模索するために、人工的な Luc 遺伝子の 3' UTR またはイントロンに snoRNA 標的配列を組み込んだ遺伝子を作成し、o-snoRNA と共に細胞内に導入して、Luc 活性の変化を調べた。

(5) 核内構造体の Cajal 体を HeLa 細胞から細胞分画によって精製し、そこに含まれる RNA を単離し、イルミナ GAIII によって RNA-seq を行った。同時に核内全 RNA の RNA-seq も行い、Cajal 体画分に濃縮される RNA 種を探索した。

4. 研究成果

(1) 実施者の研究開発によって実用化しつつあった哺乳類培養細胞での細胞核内 RNA ノックダウン法のさらなる至適化を行った。ノックダウンに用いる化学修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドの至適条件検討、特異性検討、効果持続時間の測定等を行い至適条件を決定した。さらにこの方法を用いたヒトオフアン snoRNA (boxC/D 型、boxH/ACA 型) の特異的なノックダウンを試み、新たに 20 種類のオフアン snoRNA の効率良いノックダウ

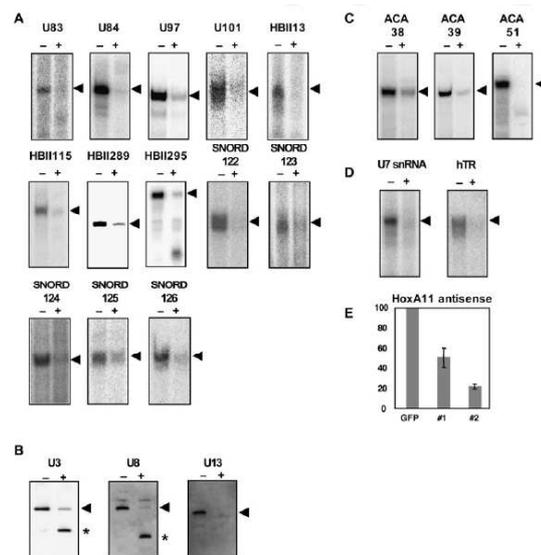


図 1. 20 種類以上の核内 RNA のノックダウン

ンに成功した。またヒト、マウスの様々な培養細胞でノックダウンを実施し、計 20 種類以上の細胞種で、本法が有効であることを証明した (図 1)。

(2) ノックダウン標的のオフアン snoRNA HBII295 の標的配列を組み込んだ RNA ポリメラーゼ I によって転写されるレポーター遺伝子を用いて、オフアン snoRNA に部位特異的な 2' -O-メチル化活性があることを証明し、ノックダウンによってその活性が失われることを証明した (図 2)。これによって、この方法がオフアン snoRNA の機能解析法として確立できた。本方法は、現在国内外の複数の研究室で有効な方法として利用されている。

(3) ASO 特異的な効果を除外するため、1 週間のオフアン snoRNA 中の複数の配列を標的とした ASO でノックダウンできる o-snoRNA

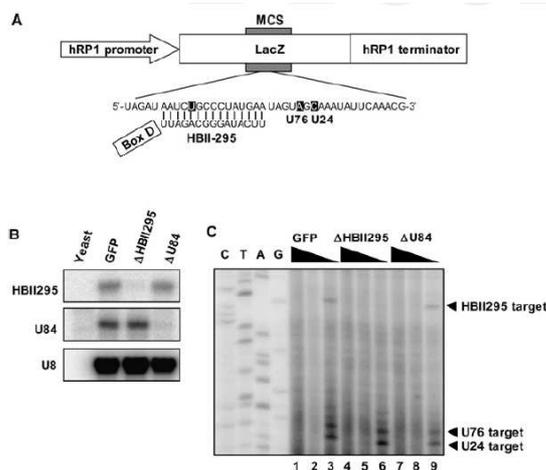


図 2. O-snoRNA のメチル化活性の証明。A. レポーターコンストラクト図、B. o-snoRNA のノックダウンによるメチル化能の消失を示す。

として、HBII295 と U97 を選別した。HeLa 細胞を用いて、これらの 2 種類のオフアン snoRNA をそれぞれ 2 種類の ASO でノックダウンした細胞を調整した。その細胞由来のトータル RNA とコントロール細胞由来のトータル RNA を用いて、イルミナ GAI 次世代シーケンサーによる RNA-seq を実施し、ノックダウン細胞で特異的に発現変化している遺伝子の同定を試みた。産総研 CBRC グループとの共同研究によって、各リードをヒトゲノム上にマップし、様々な条件によって絞り込まれた発現変動遺伝子のリストを作製した。次に得られた候補をリアルタイム PCR によって確認する作業を行った。その結果、変化傾向を示す遺伝子を見出したが、その変化は期待よりも僅かなものであり、確実な o-snoRNA の標

的の同定には至っていない。現在、僅かに変動する標的候補についてを検証するために、snoRNA と標的 mRNA 間相互作用を検出する実験系の開発を行っている。

(4) 核小体に局在している snoRNA が、核質で合成される mRNA を標的とすることが、実際に細胞内で可能かどうかを検討した。Luc レポーター遺伝子の 3' UTR やイントロンブランチ部位領域にオフアン snoRNA の標的配列を組み込んだ発現プラスミドを構築し、共導入したオフアン snoRNA がレポーター遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを検討した。しかしながら人工遺伝子の系では発現変動は見られなかった。このことはオフアン snoRNA が mRNA を標的にするためには、mRNA 側にも snoRNA と会合するための何らかの特殊なメカニズムを利用している可能性が考えられる。その可能性として、RNA の細胞内局在場所が重要な役割を果たしている可能性が浮上した。そこでオフアン snoRNA を細胞分画と RNA-FISH によって細胞内局在を検討したところ、通常の snoRNA と同様に核小体に特異的に局在していることが明らかになった。このことから標的となる mRNA も核小体に局在している可能性が高いことが推測され、人工的に構築したレポーター遺伝子では核小体に局在できなかった可能性が高いと考えられた。

(5) snoRNA 様の scaRNA が局在することが知られている核内 Cajal 体を細胞分画によって精製し、そこに局在する RNA 種の解析を次世代シーケンサーを用いて行った。その結果、複数の snoRNA ホスト遺伝子の前駆体 RNA 断片が濃縮していることを見出した。この事は snoRNA 生合成が Cajal 体に局在して、これまで明らかでなかった前駆体 RNA の合成と共役して行われていることを示唆している。Cajal 体に局在する snoRNA ホスト遺伝子転写物を詳細にマップしたところ、転写開始点から数百塩基長のイントロンを含む前駆体 RNA 断片が Cajal 体画分に濃縮されることを見出した。また細胞内にトランスフェクションしたその RNA 断片が Cajal 体に局在できることを FISH 法によって検出した。この他に、Cajal 体画分に含まれる RNA を精査した結果、新たに、繰り返し構造をもつ奇妙な遺伝子座由来の RNA が Cajal 体画分に高度に濃縮されることを見出した。現在これらの転写物の詳細な性状解析を行っている。

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 11 件)

① Kawaguchi, T., Hirose, T., Architectural roles of long noncoding RNAs in the intranuclear formation of functional paraspeckles. *Frontier in Bioscience*, 印刷中 (2011) 査読有り

② Aoki, K., Harashima, A., Sano, M. Yokoi, T., Nakamura, S., Kibata, M. Hirose, T. Thymus-specific noncoding RNA, Thy-ncR1, is a cytoplasmic riboregulator that facilitates hUPF1-dependent degradation of MFAP4 mRNA in specific T-cell leukemia cells. *BMC Mol Biol.* 11. 99. (2010) 査読有り

③ 廣瀬哲郎 明らかになってきたエピゲノム制御における RNA の役割 医学のあゆみ 235, 1013-1018 (2010) 査読無し

④ 長沼孝雄、廣瀬哲郎 ノンコーディング RNA の機能単位 実験医学 28, 30-36 (2010) 査読無し

⑤ Kikuchi, K., Fukuda, M., Ito, T., Inoue, M., Yokoi, T., Chiku, S., Mitsuyama, T., Asai, K., Hirose, T., Aizawa, Y. Transcripts of unknown function in multiple-signaling pathways involved in human stem cell differentiation. *Nucleic Acid Res.* 37: 4987-5000. (2009) 査読有り

⑥ Ideue, T., Hino, K., Kitao, S., Yokoi, T., Hirose, T. Efficient oligonucleotide-mediated degradation of nuclear noncoding RNAs in mammalian cultured cells. *RNA* 15:1578-1587. (2009) 査読有り

⑦ Sasaki, Y.T., Ideue, T., Sano, M., Mitsuyama, T., Hirose, T. MEN ϵ / β noncoding RNAs are structural components of the nuclear body, paraspeckle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2525-2530. (2009) 査読有り

⑧ Sasaki, Y.T., Hirose, T. How to build paraspeckles *Genome Biol.* 10, 227.1-227.5 (2009) 査読有り

⑨ 井手上賢、廣瀬哲郎 核内局在 RNA の簡便で効率の良いノックダウン法、実験医学 28, 97-101 (2009) 査読無し

⑩ 北尾紗織、廣瀬哲郎 核内の RNA 顆粒構造とその生理機能、蛋白質核酸酵素 54, 2127-2132 (2009) 査読無し

⑪ 日野公洋、廣瀬哲郎 snoRNA による選択的スプライシングの調節、蛋白質核酸酵素 54, 2049-2054 (2009) 査読無し

[学会発表] (計 45 件)

① 廣瀬哲郎、Noncoding RNA とタンパク質の特異的相互作用による核内構造体形成過程、第 33 回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、神戸、2010.12.8

② 井手上賢、足達俊吾、夏目徹、廣瀬哲郎、U7 snRNP 新規構成タンパク質によるヒストン遺伝子の転写抑制機構、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.12.7

③ 廣瀬哲郎、Emerging functions of “modern” and “classical” noncoding RNAs in mammalian cells, 4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010)、岡崎、2010.12.1

④ 廣瀬哲郎、How do “Architectural” Noncoding RNAs act in nuclear body construction, RiboClub Annual Meeting 2010、カナダ、2010.9.21

⑤ 廣瀬哲郎、ゲノムから生み出される非コード RNA 群の機能解析、第 22 回高遠シンポジウム、高遠、2010.9.21

⑥ 廣瀬哲郎、Emerging roles of noncoding RNAs that diversify genomic functions, International symposium on biodiversity sciences 2010、名古屋、2010.8.2

⑦ 廣瀬哲郎、Emerging roles of long noncoding RNAs in gene expression and intracellular organization, CBRC2010、東京、2010.7.30

⑧ 長沼孝雄、中川真一、青木一真、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎、核内構造体 noncoding RNA の選択的プロセッシング制御機構、日本 RNA 学会年会、東京、2010.7.27

⑨ 長沼孝雄、中川真一、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎、Alternative 3' end processing of long noncoding RNAs is the underlying regulatory mechanism of nuclear paraspeckle organization. 15th annual meeting of the RNA society、アトル、2010.5.26

⑩ 井手上賢、廣瀬哲郎、Novel function of U7 snRNA in transcriptional repression of histone gene upon DNA replication arrest、第 19 回 CDB ミーティング「RNA Sciences in

Cell and Developmental Biology」、神戸、2010. 5. 12

⑪長沼孝雄、中川真一、谷川明恵、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎、Roles of Noncoding RNAs in Formation and Function of Nuclear Paraspeckles、第19回CDBミーティング「RNA Sciences in Cell and Developmental Biology」、神戸、2010. 5. 12

⑫北尾紗織、光山 統泰、廣瀬哲郎、Cajal bodyに局在する RNA 分子種の解析、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009. 12. 9

⑬廣瀬哲郎、長沼孝雄、北尾紗織、佐々木保典、核内構造構築のための長鎖 noncoding RNA の機能獲得機構、第82回日本生化学会大会(シンポジウム)、神戸、2009. 10. 22

⑭廣瀬哲郎、長鎖ノンコーディング RNA が果たす多彩な機能と疾患との接点、「筋萎縮性側索硬化症の病態に基づく画期的治療法の開発」班のワークショップ、東京、2009. 7. 31

⑮長沼孝雄、永井美智、五島直樹、佐々木保典、廣瀬哲郎、MEN ϵ/β と新規構成タンパク質によるパラスペックル構造体の構築、第11回日本 RNA 学会年会 新潟、2009. 7. 21

⑯北尾紗織、廣瀬哲郎、Cajal body に局在する RNA 分子種の解析、第11回日本 RNA 学会年会 新潟、2009. 7. 21

⑰井手上賢、廣瀬哲郎、細胞周期の G1 期における U7 snRNA によるヒストン遺伝子群の転写抑制、第11回日本 RNA 学会年会 新潟、2009. 7. 21

⑱ Sasaki, YF, Sano, M, Ideue, T, Hirose, T Interaction between RNA-binding proteins with MEN ϵ/β non-coding RNA establishes the integrity of the nuclear body, paraspeckle, RNA 2008, 13th Annual meeting of the RNA society, Berlin, Germany 2008. 7. 31

⑲ Aoki, K, Sano, M, Harashima, A, Hirose, T Expression and intracellular localization of complicatedly spliced thymus-specific non-coding RNA, Thy-nc1, RNA 2008, 13th Annual meeting of the RNA society, Berlin, Germany, 2008. 7. 31

⑳佐々木保典、井手上賢、佐野美穂、廣瀬哲郎、核内ノンコーディング RNA, MEN ϵ/β は核内構造体パラスペックル形成に必須である第10回日本 RNA 学会年会 札幌

2008. 7. 23

〔図書〕(計1件)

1. Hirose, T., Emerging roles of noncoding RNAs in subcellular architecture and gene expression. RNA technologies & Their applicatios, Springer (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 哲郎 (HIROSE TETSURO)

独立行政法人・産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・研究チーム長

研究者番号：30273220