

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21687014

研究課題名（和文） 染色体機能を調節する小分子RNA産生メカニズム

研究課題名（英文） Mechanism of small RNA generation controlling chromosome function

研究代表者

石井 浩二郎（ISHII KOJIRO）

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号：40360276

研究成果の概要（和文）： RNA 干渉機構は外来性の遺伝因子以外にゲノムにコードされた RNA 分子にも作用する。分裂酵母ではその作用が標的遺伝子座のヘテロクロマチン構造形成に寄与している。本研究では、ヘテロクロマチン形成につながる分裂酵母 RNA 干渉機構の標的化反応に初期的な RNA スプライシング機構が関与していることを明らかにした。RNA 干渉機構は細胞核内におけるヘテロクロマチンの高次構造構築に寄与し、核内の空間的制御における作用を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In addition to a cellular defense mechanism against the foreign genetic elements, the RNA interference machinery is involved in the control of RNA molecules derived from the internal genome. It contributes to the heterochromatin assembly of target RNA-generating loci in fission yeast. In this research, we revealed that RNA splicing pathway is partly involved in the targeting of RNA interference machinery to the cognate RNAs. We further showed the relationship between RNA interference machinery and spatiotemporal regulation of heterochromatin higher order structure within the nucleus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2011年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	21,200,000	6,360,000	27,560,000

研究分野：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：染色体構築・機能・分配

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉 (RNAi) はそもそも、細胞にとって外来性の遺伝因子を排除するために発達してきた防御機構であり、その機能は主に

細胞質において発揮されると考えられていた。しかしながら近年になって、RNAi は細胞核においても重要な機能を果たしていることが提唱されはじめてきた。例えば分裂酵

母では、ヘテロクロマチン構造の形成と維持に RNAi 機構が不可欠であることが明らかにされている。すなわち、生来ヘテロクロマチン構造をとるセントロメアなどの反復 DNA 領域からノンコーディング RNA 転写が起り、さらにその RNA は RNAi 機構の標的となって、『Dicer』酵素により siRNA へと処理される。さらにそのような siRNA 産物が装填された RNAi エフェクター複合体『RITS』は、ノンコーディング RNA の発現元であるヘテロクロマチン領域クロマチンに直接結合し、新規のクロマチン転写 RNA 分子への RNAi 機構の標的化と、そのゲノム領域のヘテロクロマチン化を積極的に推し進める、というフィードバックループの形成が、RNAi 機構の核内でのひとつのシナリオとして考えられている。

しかしながら、反復配列由来ノンコーディング RNA がいかなる要因で RNAi 機構から標的として認識されるのか、いまだ十分な理解は得られていない。さらには、RNAi 機構とヘテロクロマチン形成機構の間のフィードバックループの引き金となるような、始原的な小分子 RNA 産生メカニズムに関しては、その存在は示唆されているものの、分子的な理解は全く進んでいない。また、RNAi 機構とヘテロクロマチン形成機構のフィードバックループを考慮すると、内在性 RNA に対して RNAi 機構が曖昧に反応し標的として捕捉してしまった場合に、それが永続的なヘテロクロマチン形成と RNA の転写抑制を無節操に引き起こす危険性が高く存在し、そのような危険性を排除するために、RNAi 機構による標的 RNA 認識は厳密に制御されているものと考えられるが、その分子機構も十分には理解されていない。これらが本研究の開始当初の分野の背景理解の現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、RNAi 機構の標的となる内在性 RNA を他の RNA 分子と区別するメカニズムを明らかにすることを目指した。その機構解明は同時に、RNAi 機構とヘテロクロマチン形成機構の間のフィードバックループの引き金となる始原的な小分子 RNA 産生メカニズムを解明することにもつながり、本研究でその両者を目的とした。私たちはこれまでに、『SIRE』という RNAi を特異的に誘引する配列を一部のノンコーディング RNA に見出し、それが初期的な小分子 RNA の供給に機能する可能性を示してきた。一度細胞内に siRNA が生じると、その配列同一性を媒介に RNAi は SIRE を欠く相同な RNA にも作用し始め、やがて定常的な siRNA 産生に達する。本研究ではこの過程の分子反応をヘテロクロマチン形成と関連づけながら明らかにしていくことにした。

また、分裂酵母 RNAi 機構の変異は全ヘテロクロマチン領域を不能にするわけではなく、個別のヘテロクロマチン維持機構を有するテロメア領域などではヘテロクロマチンが正常に形成されるが、それらの領域間の核内高次構築は異常になっていることが知られている。私たちはこれまでに、そのような RNAi に依存したヘテロクロマチンの核内高次構築が染色体再編の運命決定に大きく影響していることを明らかにしてきた。本研究では、RNAi 機構が siRNA 産生を通じてヘテロクロマチン高次構築を核内に作り上げるメカニズムについても解析し、siRNA の機能特性を細胞核構造に関連づけながら染色体機能に果たす役割を解明することも目的とした。これにより、RNAi 機構が核内で転写抑制に働く意義についての理解が進むことが期待された。

## 3. 研究の方法

(1) セントロメア由来の内在性 siRNA や小分子 RNA、さらにはその前駆体 RNA 分子の、野生株および RNAi 機構変異株、あるいはヘテロクロマチン変異株における細胞内存在量について解析を行った。これまでに私たちは siRNA およびその前駆体 RNA、あるいは前駆体 RNA の転写を行うプロモーター活性についてマッピングを行っている。生来のセントロメア反復配列を対象とした解析アプローチを本研究ではさらに発展させ、RNAi 機構による標的化がどのような特徴をもって行われているかについて解析を行った。

(2) 異所的な siRNA 誘導アッセイを用いて、SIRE および関連セントロメア配列要素のシス配列解析を行った。ヘテロクロマチン変異株での特徴解析から、SIRE の配列中には他の配列要素にはない siRNA 誘導能力が示唆されたため、その能力の要因を配列変異導入によって探索した。

(3) SIRE に特異的な小分子 RNA 誘導能力を付与するトランス作用因子について、遺伝子変異株を活用しながら機能解析を行った。作用因子は多様な細胞機能を果たしており、細胞増殖に必須である。従って、実験には温度感受性変異株を用い、条件的致死培養下において SIRE 依存的な異所的小分子 RNA 誘導と内在性のセントロメア反復配列由来 siRNA 産生のそれぞれが受ける影響を解析した。

(4) RNAi 機構が細胞核内のヘテロクロマチン高次構造形成に与える影響について解析した。テロメア領域のヘテロクロマチンは RNAi 機構以外に Taz1 経路によってそのクロマチン構造が確立・維持されているため、RNAi 変異株においても崩壊することはない。しかしながら、RNAi 機構が失活するとテロ

メア領域シグナル数が細胞核内で増加し、ヘテロクロマチン構造同士が集合して作り上げられる高次構造が崩壊していることが示唆されている。しかしながらその詳細には十分に理解されていない。本研究では生細胞顕微鏡観察によって RNAi 機構変異株におけるテロメアヘテロクロマチンが示す動態を解析し、その細胞周期進行との関連について検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) セントロメア由来内在性小分子 RNA の特徴解析

各種 RNAi 変異株 ( $\Delta$ ago1,  $\Delta$ dcr1,  $\Delta$ rdp1) およびヘテロクロマチン変異株 ( $\Delta$ swi6,  $\Delta$ clr4) において存在する小分子 RNA のノザンプロットによる特徴付けを行った。2009 年度末に RNAi 変異株において priRNA と名付けられた小分子 RNA が存在することが Cell 誌に報告されたが (Halic and Moazed (2010))、セントロメアの部分領域をプローブとして用いた連続的なノザンプロットでは、セントロメアのいかなる領域においても小分子 RNA は検出されなかった。一方、 $\Delta$ swi6 変異株では、野生株の siRNA とは分布の異なる、限局したセントロメア反復配列領域から 22-25 塩基の小分子 RNA の生成が検出された。しかしながら、同様のヘテロクロマチン変異であっても  $\Delta$ clr4 株ではそのような小分子 RNA の存在は認められなかった。 $\Delta$ swi6 変異株で特異的に見られるそのような RNA を swisRNA と名付け、さらに解析を進めた。

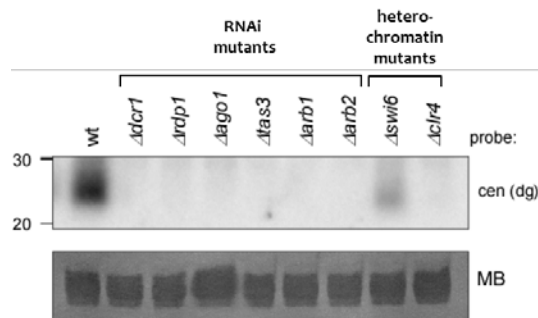


図 1. swisRNA の検出

解析の結果、swisRNA はセントロメア反復配列にある SIRE 配列の 5'上流側から集中的に生成されていることを見出した。swisRNA の生成にはヘテロクロマチンは必須ではないが、RNAi 機構が機能していることが必要であり、さらに Clr4 タンパク質の機能も必要であることが示された。

##### (2) 異所的な siRNA 誘導アッセイを用いた SIRE シス配列解析

SIRE と swisRNA の関係を解析するために、異所的な siRNA 誘導アッセイを SIRE 配列やその逆鎖配列などを用いて行った。その結果、SIRE 方向の転写に特異的に  $\Delta$ swi6

変異株でも転写産物に由来する小分子 RNA が生成された。そのような swisRNA を生み出す要因として、SIRE 配列中に見出された RNA スプライシングコンセンサスのブランチ部位と 3'スプライス部位の配列に着目した。それらの配列に変異を導入すると、SIRE による swisRNA の異所的な生成が不能となった。この結果を受けて、SIRE 配列中のスプライシングコンセンサス配列が本当にスプライシングを担う能力があるかどうかを確認した。そのために既知のイントロンと SIRE との融合クローンを作成し、解析を行った。その結果、スプライシング能力と swisRNA の誘導能力の間には相関があることを見出した。sab14 遺伝子由来の既知の効率よいイントロンのブランチ部位と 3'スプライス部位の配列を SIRE のそれと置換したクローンも作成し、やはりスプライシング能力と swisRNA の誘導能力の間に相関があることを見出した。しかしながら、SIRE の上流に 5'スプライス部位の配列を導入し、完全なイントロン配列にすると、SIRE としての swisRNA 誘導能力はむしろ低下した。スプライシング反応を担う因子群の一部が SIRE に結合し、そのままスプライシング反応を押し進めることなく停留することがその 5'上流側の swisRNA への変換を促しているものと考えられる (図 2)。

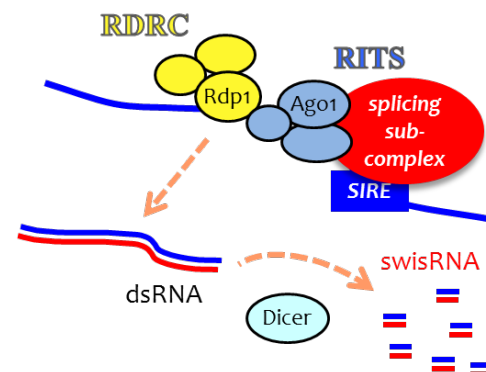


図 2. swisRNA 産生のモデル

##### (3) SIRE に特異的な小分子 RNA 誘導能力を付与するトランス作用因子の解析

まずは SIRE による swisRNA 誘導がどの RNAi 機構因子に依存しているかを解析した。その結果、swisRNA は各種 RNAi 変異 ( $\Delta$ ago1,  $\Delta$ dcr1,  $\Delta$ rdp1) で異所的生成が失われることが判明した。Dicer および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの欠損に加え、Ago1 タンパク質も SIRE の 5'上流側 RNA の swisRNA 変換に必要であることを考えると、Ago1 タンパク質を含む RITS 複合体は Dicer や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼが標的 RNA に作用するのを誘起する上流因子として機能していると考えられる (図 2)。また、セントロメア由来内在性小分子 RNA と同様

に SIRE による異所的な swisRNA 誘導には Clr4 タンパク質の機能が必須であった。セントロメア由来の swisRNA はやはり SIRE を含むノンコーディング RNA 転写産物が swisRNA に変換されたものであると考えられる。SIRE は RNA スプライシング反応の部分複合体によって swisRNA 誘導を導いているものと考えられるが、実際に prp2 や ods3 など RNA スプライシングコンセンサスのブランチ部位と 3'スプライス部位の認識に関わる因子の変異株では、SIRE 依存的な swisRNA 誘導が見られなくなった (図 2)。興味深いことに、swisRNA 誘導は RNA スプライシングの次段階の中心複合体である U2snRNP の構成因子の変異によっても SIRE による swisRNA 誘導は不能となった。イントロンの初期認識のみならず、その後のスプライシング経路の欠損もまた RNAi 機構への標的 RNA の受け渡しに関与していると考えられる。

#### (4) RNAi 機構が細胞核内のヘテロクロマチン高次構造形成に与える影響の解析

Swi6 タンパク質を GFP 融合によって可視化し、野生株および各種 RNAi 変異 ( $\Delta$ ago1,  $\Delta$ dcr1,  $\Delta$ rdp1) での細胞核内局在の細胞周期を通じた変動を解析した。その結果、これまでに提唱されていた RNAi 変異によるヘテロクロマチン集合高次構造体の崩壊は顕著ではないことが判明した。多くの RNAi 変異細胞では野生株と同様の Swi6 タンパク質局在を示した (図 3 参照)。しかしながら、それらは主に細胞周期 G2 期の細胞における局在観察の結果であり、Swi6 タンパク質の細胞周期を通じた細胞核内局在の変動を生細胞顕微鏡観察によって解析した結果、RNAi 変異の全ての株においてその局在パターンは顕著に変化することを明らかにした (図 3)。

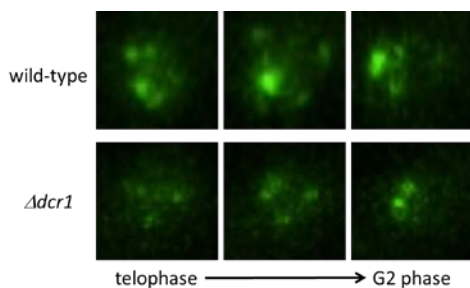


図 3. Swi6 タンパク質の局在変動

また、Taz1 タンパク質を GFP 融合によって生細胞で可視化し、蛍光顕微鏡観察によってテロメアヘテロクロマチン領域の細胞核内局在変化についても解析した。細胞核の外形も核膜孔複合体因子の mCherry 融合によって同時に可視化し、生細胞観察に用いた。その結果、テロメアヘテロクロマチンの細胞核内局在は細胞周期を通じて変動することを見出した。これまでの解析で、ヘテロクロマチン

変異に加えて RNAi 変異でもセントロメア欠如染色体に起こる染色体再編成の運命決定は異なることが明らかとなっている。本研究によって明らかとなった、RNAi 機構依存的なヘテロクロマチン高次構造形成の細胞周期特異的な制御は、染色体再編成もまた、細胞周期に依存して発生することを意味する。今後、その可能性について十分に検討していく必要があるものとする。

#### 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 3 件)

① Yuki Ogiyama, and Kojiro Ishii. The smooth and stable operation of centromeres. Genes Genet. Syst. 87, 63-73 (2012) 査読有り  
DOI: 10.1266/ggs.87.63

② Yuki Ogiyama, Saeko Soejima, Fumie Masuda, Kohta Takahashi, and Kojiro Ishii. Telomere-engaged chromosome reorganization after centromere deletion in fission yeast. Adv. Chromosome Sci. 3, 76-78 (2010) 査読無し

③ Kojiro Ishii. Conservation and divergence of centromere specification in yeast. Curr. Opin. Microbiol. 12, 616-622 (2009) 査読有り  
DOI: 10.1016/j.mib.2009.09.007

[学会発表] (計 18 件)

① 石井 浩 二 郎、Chromosomal reorganizations provoked by centromere dysfunction. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12.15、横浜

② 石井浩二郎、染色体高次機能構築の制御機構、日本遺伝学会第 83 回大会、2011.9.21、京都

③ Kojiro Ishii, Spontaneous chromosome reorganizations after centromere dysfunction, The 6th International Fission Yeast Meeting, 2011.6.28, Boston

④ Kojiro Ishii, A molecular mechanism for de novo siRNA generation in fission yeast, The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 2011.6.15, Kyoto

⑤ Kojiro Ishii, Spontaneous reorganization of acentric chromosomes, The 6th UK Japan Cell Cycle Workshop,

2011.4.12, Windermere

⑥ 荻山友貴、石井浩二郎、テロメアとセントロメアに導かれる染色体再編成、BMB2010、2010.12.7、神戸

⑦ 荻山友貴、副島朗子、石井浩二郎、セントロメア欠失に基づく染色体の再編成現象、第 27 回染色体ワークショップ、2010.1.20、御殿場

⑧ Kojiro Ishii, Ectopic formation of the centromeres in fission yeast、第 32 回日本分子生物学会年会、2009.12.11、横浜

⑨ 石井浩二郎、染色体構造の再編成に関するクロマチン制御、第 82 回日本生化学会大会、2009.10.24、神戸

[図書] (計 1 件)

① 石井浩二郎、培風館、染色体継承のエピジェネティックな制御、エピジェネティクス (2010)、311-339

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称 : RNA interference induction element and use thereof

発明者 : 石井浩二郎、高橋考太

権利者 : 久留米大学、科学技術振興機構

種類 : 特許権

番号 : 11/920,508

取得年月日 : 2010 年 12 月 7 日

国内外の別 : 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/ishii/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 浩二郎 (ISHII KOJIRO)

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授

研究者番号 : 40360276