

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390057

研究課題名（和文） 非コード RNA の転写機構の解明

研究課題名（英文） Transcriptional mechanism of noncoding RNA

研究代表者

黒川 理樹（KUROKAWA RIKI）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70170107

研究成果の概要（和文）：我々は、cyclin D1 遺伝子プロモーターから転写される（promoter-derived noncoding: pnc）RNA が、その発現を抑制することを発見した（Nature 454: 126-30, 2008）。この pncRNA の転写開始点を決定し、pncRNA の転写を誘導するタンパク質の精製を試みた。その結果 DNA 修復系タンパク質 5 種類と核構造体 paraspeckle 構成タンパク質 2 種類の合計 7 種類のタンパク質が同定された。この成果は、pncRNA 転写には DNA 修復系が関与し、転写の場は paraspeckle であることを示唆している。この成果は、ncRNA 転写に新境地を開拓することになる。

研究成果の概要（英文）：We have identified that promoter-derived noncoding RNA (pncRNA) is transcribed from the promoter region of the cyclin D1 gene and represses the expression of the gene (Nature 434: 126, 2008). We have also determined a transcriptional initiation site of pncRNA and purified transcription factors inducing the transcription of pncRNA. The purification provided five proteins involving DNA repair and two of paraspeckle-related proteins. These data suggest that the transcription of the pncRNA requires the DNA repair system and the transcription is located in the paraspeckle area of nuclei. This will enhance elucidation of novel mechanisms of the ncRNA transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：酵素、遺伝子、核酸、生体分子、発現制御

1. 研究開始当初の背景

本研究は、最近我々が見出した新規非コード(noncoding:nc)RNA 転写機構の解明を目的とする。タンパク質をコードしない ncDNA 領域は、ゲノムの 9 割以上を占めるが、最近、この ncDNA の 9 割が転写されて ncRNA を生成

することが明らかにされた。しかしながら、ncRNA 転写機構は大部分謎である。我々は、cyclin D1 遺伝子プロモーターから転写される(promoter-derived nc: pnc)RNA が、その発現を抑制することを発見した(Wang et al.: Nature 454: 126-30, 2008)。

そこで、この pncRNA の転写機構の全体像を明らかにすることを考えた。この成果は、ncRNA 転写機構解明の基盤を確立すると期待される。pncRNA は、A, B, D, E を同定したが、本研究では主に pncRNA-D を用いる。

2. 研究の目的

本研究は、最近我々が見出した新規非コード(noncoding: nc)RNA 転写機構の解明を目的とする。タンパク質をコードしない ncDNA 領域は、ゲノムの 9 割以上を占めるが、最近、この ncDNA の 9 割が転写されて ncRNA を生成することが明らかにされた。しかしながら、ncRNA 転写機構は大部分謎である。我々は、cyclin D1 遺伝子プロモーターから転写される(promoter-derived nc: pnc)RNA が、その発現を抑制することを発見した(Wang et al.: Nature 454: 126-30, 2008)。**本研究では、この pncRNA の転写機構の全体像を明らかにすることを目的とする。**この結果は、ncRNA 転写機構解明の基盤を確立すると期待される。

具体的には以下の項目を実行する。すなわち、(1) pncRNA の転写開始点の決定、(2) pncRNA プロモーターを認識する基本転写因子の精製と結合部位の決定、(3) pncRNA プロモーターの解析、(4) DNA 損傷刺激による pncRNA 転写を誘導する転写因子の同定、(5) pncRNA プロモーター欠損 ES 細胞の作製と pncRNA 誘導の消失実験である。

3. 研究の方法

5' RACE 法

5' RACE(Rapid Amplification of cDNA End)法は、得られた cDNA の情報をもとにさらに上流をクローニングすることで、完全長 cDNA 配列を得ることを目的とする。5' -Full RACE Core Set(Takara)を用い、inverse PCR を利用して未知の 5' 末端領域を増幅し、pcDNA ベクターにクローニングして、5' 末端の配列を決定した。

ビオチン標識 pncRNA プロモーターによる転写開始複合体の精製

すでに得られていた pncRNA-D 領域の上流部分に AT リッチな転写開始点を同定し、その上流 160 塩基をビオチン標識 DNA として人工合成し、精製に用いた。このオリゴに、放射線非照射および照射の HeLa 細胞核抽出液を調製し、結合タンパク質を精製した。

質量分析

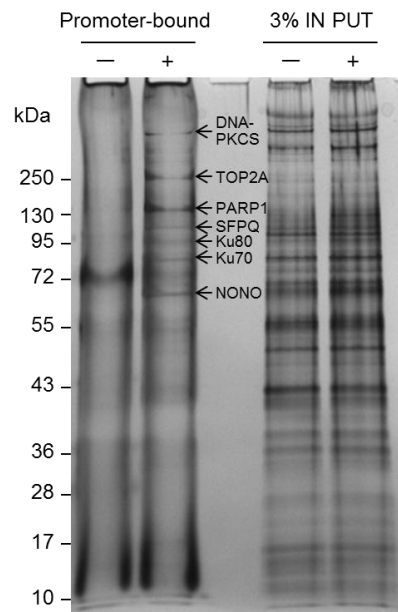
SDS-PAGE で精製タンパク質画分を展開し、銀染色でタンパク質バンドを確認してゲル片を切り出した。これを、トリプシン処理して、nanoLC-MS/MS 装置を用いて解析を行った。

4. 研究成果

本研究の研究計画は次の 5 項目を設定している。(1) pncRNA の転写開始点の決定、(2) pncRNA プロモーターを認識する基本転写因子の精製と結合部位の決定、(3) pncRNA プロモーターの解析、(4) DNA 損傷刺激による pncRNA 転写を誘導する転写因子の同定、(5) pncRNA プロモーター欠損 ES 細胞の作製と pncRNA 誘導の消失実験である。

放射線照射および非照射のヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞株から mRNA を調製しての 5' RACE 法を用いた解析から、(1)が成功した。転写開始点から 200 塩基対上流までの配列解析から、(2)を試みると、基本転写因子の結合は検出されなかった。そして、転写開始点の上流 160 塩基対が転写開始領域と考えられた。この 160 塩基対の配列をビオチン標識オリゴヌクレオチドとして合成し、pncRNA 転写を誘導するタンパク質の精製を試みた。その結果、Ku タンパク質を含む DNA 修復系タンパク質 5 種類と核構造体 paraspeckle 構成タンパク質 2 種類(NONO, SFPQ)の合計 7 種類のタンパク質が同定された(図)。一方、基本転写因子は同定されなかった。以上から、(3)(4)が達成された。

この結果は、pncRNA 転写開始には DNA 修復系のタンパク質がリクルートされ、その転写開始の場合は paraspeckle であることが示唆された。さらに、pncRNA-D の転写終結点を決定し、pncRNA-D の全長は 606 塩基対であることを示した。現在、この配列をもとに siRNA を作成して pncRNA-D の消失実験が進行している。以上の結果ら、当初の目的(1)-(5)は完遂された。さらに、全長 pncRNA-D を得て、その 2 次元構造の決定に挑戦している。



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 6 件)

- ① Oyoshi, T., and Kurokawa, R. Structure of noncoding RNA is a determinant of function of RNA binding proteins in transcriptional regulation. *Cell & Bioscience* 2:1, 2012. 査読有
DOI:10.1186/2045-3701-2-1
- ② Takahama, K., Sugimoto, C., Arai, S., Kurokawa, R., and Oyoshi, T. Loop Lengths of G-Quadruplex Structures Affect the G-Quadruplex DNA Binding Selectivity of the RGG Motif in Ewing's Sarcoma. *Biochemistry* 50: 5369-5378, 2011. 査読有
DOI:10.1021/bi2003857
- ③ Takahama, K., Kino, K., Arai, S., Kurokawa, R., and Oyoshi, T. Identification of Ewing's sarcoma protein as a G-quadruplex DNA- and RNA-binding protein. *FEBS Journal* 278: 988-998, 2011. 査読有
DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08020.x
- ④ Du, K., Arai, S., Kawamura, T., Matsushita, A., and Kurokawa, R. TLS and PRMT1 synergistically coactivate transcription at the survivin promoter through TLS arginine methylation. *BBRC* 404: 991-996, 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2010.12.097
- ⑤ Kurokawa, R. Long Noncoding RNA as a Regulator for Transcription. In: Ugarković, Đ. (ed) *Long Non-Coding RNAs, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 51, Chapter 2: 29-41, 2011. 査読有
DOI 10.1007/978-3-642-16502-3_2
- ⑥ Tokuzawa, Y., Yagi, K., Yamashita, Y., Nakachi, Y., Nikaido, I., Bono, H., Ninomiya, Y., Kanasaki-Yatsuka, Y., Akita, M., Motegi, H., Wakana, S., Noda, T., Sablitzky, F., Arai, S., Kurokawa, R., Fukuda, T., Katagiri, T., Schönbach, C., Suda, T., Mizuno, Y., and Okazaki, Y. Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. *PLoS Genet* 6:e1001019, 2010. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 黒川 理樹 長鎖非コード RNA 機能の分子機構-核酸医薬の可能性
第 35 回日本分子生物学会年会

平成 24 年 12 月 12 日 福岡県福岡市

- ② Kurokawa, R. Long noncoding RNA as an epigenetic regulatory factor.
第 71 回日本癌学会学術総会
平成 24 年 9 月 20 日 北海道札幌市
- ③ Kurokawa, R. Long noncoding RNA, a counterpart of microRNA, works as a transcriptional regulator. Is lncRNA a potential target for nucleic acid medicine?
第 4 回日本 RNAi 研究会
平成 24 年 8 月 30 日 広島県広島市
- ④ Kurokawa, R. Promoter-associated noncoding RNA and Arginine-specific Methylation of RNA-binding protein TLS.
Keystone Symposia
平成 24 年 4 月 4 日 Utah, USA.
- ⑤ 黒川 理樹 長鎖非コード RNA とエピゲノム制御
第 34 回日本分子生物学会年会
平成 23 年 12 月 16 日 神奈川県横浜市
- ⑥ Kurokawa, R. TLS-CHOP, an Oncogenic Fusion Product in Myxoid Liposarcoma, Attenuates Cell Adhesion Ability through Down-Regulation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$.
ENDO (The Endocrine Society) 2011
平成 23 年 6 月 6 日 Boston, USA.
- ⑦ 黒川 理樹 粘液型脂肪肉腫原因遺伝子 TLS-CHOP 発現細胞の構築と SUMO-1 修飾の解析
第 33 回日本分子生物学会年会
平成 22 年 12 月 9 日 兵庫県兵庫県
- ⑧ 黒川 理樹 shRNA とエネルギーエロクアンス
第 31 回日本肥満学会
平成 22 年 10 月 1 日 群馬県前橋市
- ⑨ 黒川 理樹 RNA 結合タンパク質 TLS/FUS による非コード RNA 依存性転写抑制機構-筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規原因遺伝子 TLS/FUS-
厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「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
平成 22 年 6 月 18 日 東京都千代田区
- ⑩ Kurokawa, R. Noncoding RNA from cyclin D1 promoter regulates transcription via its binding to TLS, a novel causative gene for ALS.
独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センターセミナー
平成 22 年 4 月 15 日 埼玉県和光市

[図書] (計 3 件)

- ① Kurokawa, R. Springer Berlin

東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20323579

Heidelberg, Generation of Functional Long Noncoding RNA Through Transcription and Natural Selection. In: Mallick, B. (eds.) Regulatory RNAs, Chapter 6, 2012, pp151-174.

DOI:10.1007/978-3-642-22517-8_6

- ② Song, X., Wang, X., Arai, S., and Kurokawa, R. Springer New York, Promoter-Associated Noncoding RNA from the CCND1 Promoter. In: Vancura, A. (ed) Transcriptional Regulation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 809, Chapter 39, 2012, pp609-622.

DOI:10.1007/978-1-61779-376-9_39

- ③ Kurokawa, R. Springer New York, Promoter-Associated Long Noncoding RNAs Repress Transcription Through a RNA Binding Protein TLS. In: Collins, L. J. (ed) RNA Infrastructure and Networks: Advances in Experimental Medicine and Biology 722, Chapter 12, 2011, pp196-208.

DOI:10.1007/978-1-4614-0332-6_12

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：抗 TLS モノクローナル抗体及びその製造方法、ハイブリドーマ及びその製造方法、並びに抗 TLS モノクローナル抗体含有組成物

発明者：黒川 理樹

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-099962

出願年月日：2013 年 5 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 理樹 (KUROKAWA RIKI)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70170107

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

松下 明生 (MATSUSITA AKIO)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：50402269

小川 純人 (OGAWA SUMITO)