

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 6月 11日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791817

研究課題名（和文） 摂食行動に関わるセロトニン受容体の発現制御に働く
ノンコーディング RNA の解析研究課題名（英文） Regulation of Serotonin receptor gene expression
by brain-specific non-coding RNAs.

研究代表者

添野 雄一（SOENO YUUCHI）

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70350139

研究成果の概要（和文）：snoRNAは通常リボソームRNAの成熟に働く。今回、セロトニン受容体2C mRNAと相補配列を持つ脳特異的MBII-52 snoRNAの生理機能を確認する目的で、マウス脳組織からのMBII-52複合体の単離と転写産物解析を行った。多様なバリエーションを持つMBII-52は、部分分解を受けた短駆型として存在することと、NucleolinやELAVL1と新規の機能複合体を形成することを見出した。

研究成果の概要（英文）：While snoRNAs generally mediate the maturation of rRNAs, brain-specific MBII-52 snoRNA has a complementarity to serotonin receptor 2C mRNA. To investigate the not-yet-known function of MBII-52 we analyzed the transcripts and the MBII-52/protein complex in mouse brain. Our results demonstrated that MBII-52 form novel complexes with Nucleolin and ELAVL1, and that some MBII-52 variants are processed into a shorter form according to the nucleotide polymorphism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：病態病理学

1. 研究開始当初の背景

セロトニン受容体は中枢神経系における摂食行動調節に関わっており、脳組織ではリガンド刺激に対して異なる応答を示す複数のセロトニン受容体2C (5-HT_{2C}R) アイソフォームが発現している。セロトニン系神経伝達の基盤をなすこの分子多型の成立機序として、

5-HT_{2C}R 遺伝子転写後の RNA 編集や選択的スプライシングが注目されているが、その制御に働く分子メカニズムは不明であった。

研究計画立案当時では、作用未確定のノンコーディング RNA 分子が相次いで見出されており、高等生物における生理的役割や疾患の成り立ちとの関連について関心が高まっ

ていた。特に、Hüttenhofer ら (2001) によるマウス脳の転写産物解析 (トランスクリプトーム) では、脳特異的発現を示す低分子核小体 RNA (snoRNA) が多数同定されており、snoRNA 機能の多面性が注目されていた。一般に snoRNA は核小体においてリボソーム RNA (rRNA) との相補結合を介して塩基修飾を触媒するガイド分子として働くことが知られていたが、脳特異的 snoRNA はいずれも rRNA との相補性を持たず、その生理機能は不明であった。そのなかで、MBII-52 snoRNA は 5-HT_{2c}R mRNA の RNA 編集部位と 18 塩基にわたる相補性を保有していることから、受容体 2C アイソフォーム形成に関与する可能性が注目された。加えて、MBII-52 のヒトオルソログ (SNORD115) 解析では、15 番染色体 q11-13 に 47 コピーの SNORD115 を含むクラスター領域が存在しており、長大な転写単位として発現することも明らかにされた。注目すべき事実として、15q11-13 は過食による肥満を主徴とする脳神経疾患プラダー・ウィリー症候群 (PWS) の発症に関わる母系インプリンティング領域であった。実際、15q11-13 欠損の PWS 患者および 15q11-13 重複マウスモデルではアゴニスト刺激に対する 5-HT_{2c}R 応答変化が確認されている。これらの事実は MBII-52 発現量と 5-HT_{2c}R 機能との関連性を支持しており、MBII-52 が受容体 2C アイソフォームの創出に向けて mRNA 編集・選択的スプライシングに働く可能性を示唆するものであった。関連する *in vitro* 実験においては、培養細胞に強制発現させた MBII-52 が 5-HT_{2c}R mRNA の RNA 編集や選択的スプライシングに影響を及ぼすことが Vitali ら (2005) や Kishore と Stamm (2006) によって示されたが、*in vivo* における MBII-52 機能の実態は不明であった。

snoRNA は分子中のコンセンサス配列により box C/D 型と box H/ACA 型とに大別され、

MBII-52 が属する box C/D 型 snoRNA はリボース 2' -O-メチル化を触媒する。この化学修飾機能を発揮するうえで box C/D 型 snoRNA は、コアタンパクである Fibrillarin (メチル基転移酵素)、Nop56、Nop58、15.5kD と複合体を構築して核小体に移行する。したがって、核小体に局在する MBII-52 複合体がどのようにして核質で転写される 5-HT_{2c}R mRNA 前駆体と相互作用するのかは未解決の課題として残されていた。

2. 研究の目的

セロトニン受容体 2C アイソフォームの成立機序として、5-HT_{2c}R mRNA との塩基相補性を持つ MBII-52 snoRNA の関与が最も有力と考えられたが、その作用機序は不明であった。したがって本研究では、MBII-52/タンパク複合体の構成分子に着目し、snoRNA とは異なる作用を持った新規 MBII-52/タンパク複合体の同定とその形成機序の解明を目指した。マウス脳から機能性複合体を抽出・同定する実験手法を確立することは、脳内に多数存在する作用未確定の snoRNA 分子種の機能的役割を解明していく上で重要な一歩となると考えられた。また、ゲノム配列から多くの snoRNA 遺伝子が予測されながらもその転写産物の解析に至った例は少数にとどまっていた。これらの状況を踏まえて、申請期間における到達目標として、マウス脳組織からの機能複合体を再現性良く検出する手法を確立することと、ゲノム情報とトランスクリプトームの併用により実際の細胞・組織における機能性 snoRNA 分子の特徴を明らかにすることを設定した。

3. 研究の方法

マウス系統 (C57BL/6) の飼育管理は日本歯科大学組換え DNA 実験安全委員会および生物

科学実験委員会のガイドラインに従って、生物科学施設 SPF 室内において交配と試料採取を行った。試料採取に際しては麻酔による安楽死後速やかに脳を摘出し、組織形態学的解析には 4%ホルムアルデヒド固定あるいは OCT コンパウンド包埋後冷アセトンにて凍結、また RNA 解析用試料は摘出後ただちに液体窒素凍結し-80°Cで保存した。コントロール用の神経芽細胞腫由来細胞 Neuro-2A は 10%ウシ胎仔血清を添加した DMEM 培地に懸濁し、5%炭酸ガス雰囲気下 (37°C) で培養した。細胞核抽出では、脳組織を 0.32 M ショ糖・0.1% TritonX-100 を加えた緩衝液中でホモジナイズした。ホモジェネートは直ちに 1.88 M ショ糖クッション上に積層し、100,000 x g で 2.5 時間遠心の後、核ペレットを PBS に再懸濁した。核成分の分画には、ホモジェネートを低 Mg²⁺緩衝液中で超音波処理後、0.88 M ショ糖クッションに積層して 2,000 x g で 10 分間遠心し、上清の核質画分と核小体を含むペレットを得た。可溶化には 300 mM NaCl を含む緩衝液中での超音波処理後、10%-30%グリセロール密度勾配に載せて 160,000 x g で 17.5 時間遠心後、分画した。MBII-52/タンパク複合体の単離には、複合体画分にビオチン標識 RNA プローブを作用させ、ストレプトアビジンビーズにより回収した。ビーズを熱変性処理後、アセトン沈殿によりタンパクを精製し、SDS-PAGE・銀染色から特異的タンパクバンドを切出し、質量分析にてペプチドを同定した。RNA 発現に関しては、7 M 尿素変性ゲルで電気泳動して ³²P 標識プローブを用いノザンプロットで検出した。発現量の定量にはラジオアイソトープ用スキヤナ (Typhoon9000, GE healthcare) でデジタルイメージを作製し、画像解析ソフトウェア (ImageJ, NIH) を用いてシグナル強度を求めた。トランスクリプトームでは、454 シー

クエンス解析を行った。マウスゲノム解析は、NCBI ゲノムブラウザを用いて塩基配列情報を抽出した (MGI データセット July/2007/mm9 アセンブリ)。MBII-52 塩基配列のアラインメントおよび分子系統樹の作成は Genetyx Mac ver. 12 (Genetyx, Japan)、RNA 二次構造予測は CentroidFold で行った。RNA アフィニティ精製とタンパク同定、トランスクリプトーム解析は Hüttenhofer 研究室と共同で行った。

4. 研究成果

(1) MBII-52/タンパク複合体の解析

神経細胞株および成体マウス脳組織から精製した核質・核小体画分の解析から、MBII-52/タンパク複合体が核質にも多量に存在することを確かめた。マウス脳抽出物のグリセロール密度勾配遠心分離では、MBII-52/タンパク複合体は通常の snoRNA 複合体と同等の沈降速度 12S 付近に分画され、高い塩濃度条件 (420 mM) での可溶化においても安定であった。さらにこの複合体画分から MBII-52 特異的 RNA プローブを用いたアンチセンス・アフィニティ精製により MBII-52/タンパク複合体を単離し、質量分析により 17 種類のタンパクを検出した。このタンパク群には box C/D 型 snoRNA コアタンパクは含まれていなかったが、繰り返し検出された新規結合タンパクとして Nucleolin と ELAVL1 を同定した。これらのタンパクの特異抗体による免疫沈降では、MBII-52 が共沈することも確認できた。核全般に局在する Nucleolin は、リボソーム合成におけるシャペロンとしても働くことから、Nucleolin が MBII-52 複合体形成の補助因子として働く可能性や、核質・核小体間の MBII-52 輸送との関連が示唆された。また、ELAVL1 は mRNA 3' 非翻訳領域の AU-rich 配列に結合して安定性を高めることや、Fas mRNA の選択的スプライシングを調節

することが報告されている。この事象から演繹される仮説として、ELAVL1 は MBII-52 を介して 5-HT_{2c}R mRNA 前駆体に結合することにより、当該エクソンの選択的スプライシングに関与する可能性が考えられた。

(2) マウス脳の MBII-52 転写産物解析
MBII-52 機能の多面性を考えるうえで、ゲノム上に多コピーのクラスターとしてコードされる MBII-52 塩基配列の違い(バリエント)に注目し、この配列の差異が MBII-52/タンパク複合体形成に影響を与えている可能性を検証した。

① マウスゲノムの MBII-52 バリエント解析
MBII-52 のオリジナル配列 (Cavaille ら, 2000) を参照配列としてマウスゲノム検索を実施した結果、139 ヒットが得られた。この配列をアラインメントすることにより 51 種類のバリエントに分類し、コピー数の多いバリエント順に v1~v51 とした (同コピー数の場合はゲノム中の出現順)。その結果、オリジナル MBII-52 配列に相当するバリエント v1 がゲノム当たり 35 コピーで最多であった。次いで、v1 と 1 塩基ミスマッチであるバリエント v2 は 24 コピーであったが、v3 以降のバリエント群は 6 コピー以下であった。全 51 種のバリエントのうち、15 種において box C/D (あるいは C'/D') 配列の変異・欠失を認めた。全バリエントの分子系統樹を作成すると、進化的に新しいグループ 1 (v1, v2 を含む)、古いグループ 2 (v3 を含む)、およびその中間の進化系統で box C/D 変異バリエントが主体のグループ 3 に分類することができた。

② マウス脳抽出物の MBII-52 転写産物解析
次に実際にマウス脳で発現する RNA 分子の配列解析を実施し、MBII-52 配列との高い相同

性スコアを示す 868 リードを得た。単独検出されたリードを読み取りエラーとして解析対象から外すと 697 リードとなり、その 73% は 79 塩基 (bp) の全長 MBII-52 に相当するリードであり、残り 27%では多くが 45 bp 程度であった。検出された全長 MBII-52 とゲノム上で分類したバリエント配列を比較すると、実際に転写産物として検出されたのは 15 種のバリエントであることがわかった。Box C/D (あるいは C'/D') に変異を持つバリエントはいずれも検出されなかった。この事実は、box C/D 変異を持つ snoRNA は複合体を形成できず速やかに分解されるという報告と一致した。興味深い所見として、ゲノム中でコピー数の多かった v1 と v2 は各々 34 リードと 49 リードであったのに対し、ゲノム中 6 コピーの v3 は 92 リードであった。さらに、最も多い 249 リードの由来はゲノム中 1 コピーしか存在しない v22 であった。分子系統樹のグループ別では、グループ 1 では 48% (10/21 バリエント)、グループ 2 では 27% (4/15 バリエント) が発現を示した。

全バリエント中 15 種しか検出されなかった理由として、MBII-52 クラスターにおける複数の転写単位が想定された。この可能性を検証するため、全バリエントの発現情報をゲノム配列上にプロットしたところ、転写方向の上流 (テロメア側) はグループ 1 (主に v1 と v2) が占め、下流にグループ 2 が集中していた。v22 は下流端にあり、近傍には box C/D 変異バリエントが多く認められた。ゲノムデータベースから、クラスター中に SINE/LINE などのトランスポゾン配列が確認できたが、EST (発現配列タグ) 情報は一部分に留まり、独立した転写単位は見出せなかった。クラスター中の GC 塩基分布は一様で、プロモータ様領域も見当たらなかった。これらのゲノム構造所見から、MBII-52 バリエン

トの発現はクラスター全体から起こっており、転写されたバリエーションの量的バイアスは転写とは無関係であると考えられた。

次に、一度転写された MBII-52 バリエーションが選択的に分解される可能性に着目した。複雑な二本鎖構造をとる RNA は一本鎖よりも分解機構に対する安定性が高い。In silico で予測した各バリエーションの二次構造を見ると、転写産物として検出されたバリエーションの多くが末端ステムともう一つの内在ステムで構成されたシンプルな構造であるのに対して、非検出バリエーションでは複数の内在ステムを有した多様な高次構造を取ることが判明した。したがって、RNA 二次構造はリード数と対応しなかった。ただし、高頻度で検出された v22 および v3 は高度な塩基対形成を示した。

MBII-52 バリエーションが snoRNA 複合体に組み込まれる割合を確かめる目的で、抗 Fibrillarin 抗体による免疫沈降を実施し、共沈した MBII-52 を逆転写・クローニングした。その結果、v1・v2 が 67% (12/18 クローン) を占めるなか、v22 は 17% (3/18) にとどまった。抗 Nucleolin 抗体での免疫沈降では、v1・v2 が 59% (10/17 クローン)、v3 が 12% (2/17) であった。すなわち、トランスクリプトームの結果と異なり、Fibrillarin または Nucleolin との複合体として存在する v22 は v1・v2 よりも少なかった。これらの所見は v22 の大半が snoRNA 複合体に組み込まれずに存在していることを示しているが、今回その検証には至らなかった。

(3) MBII-52 短駆型バリエーションの解析

トランスクリプトーム解析によって新たに得られた知見として、MBII-52 転写産物のバリエーションの一部は 45 bp 前後の短駆型として存在することが判明した。この短駆型

MBII-52 は、塩基配列に基づいて 5 パターンに分類できた。短駆型となる前の全長配列を類推すると、系統樹グループ 1 から 3 パターン、グループ 2 から 2 パターンが産生されていることがわかった。これらの短駆型 MBII-52 を切出しうるバリエーション (シード) は、いずれも全長型の転写産物として検出できたバリエーションであり、v1 と v2 をシードとする短駆型 MBII-52 が最も多かった。v22 をシードとする短駆型は認められなかった。一方、全長型としてのみ検出された 4 種のバリエーションの二次構造をみると、そのうち 3 種は複雑な塩基対構造を取りうるバリエーションであった。以上の解析結果から、全長型として発現した MBII-52 のうち、単純な二次構造を取る全長バリエーションが短駆型にプロセッシングされる傾向にあることがわかった。

この短駆型 MBII-52 が脳組織中で 45 bp 前後に安定して維持されていることから、タンパクとの複合体を形成している可能性が示唆された。そこで、グリセロール密度勾配画分をノザンプロットで解析したところ、短駆型 MBII-52 は真性 snoRNA 複合体と同等の沈降速度を持つことがわかった。さらに特異抗体による免疫沈降によって、短駆型 MBII-52 は Fibrillarin と共沈するが、Nucleolin とは共沈しないことも明らかとなった。低分子化した MBII-52 に関しては最近 Kishore ら (2010) も報告しており、本研究での v1 に相当する MBII-52 由来の分子が processed MBII-52 となることに焦点を当てている。本研究において我々が見出した短駆型 MBII-52 は、さらに多種類のバリエーションが低分子化することを示しているが、これらの短駆型 MBII-52 がどのような生理機能を持つかについては今後検討すべき課題として捉えている。

まとめ

本研究では、MBII-52 snoRNA が新規タンパク複合体としてセロトニン受容体 2C (5-HT_{2C}R) アイソフォームの形成機序に関わる可能性について検証した。マウス脳抽出物からの MBII-52 複合体精製により、従来の snoRNA 機能 (核小体におけるリボソーム RNA の成熟を補助する) とは異なる機能として、Nucleolin や ELAVL1 との相互作用により、5-HT_{2C}R mRNA の転写後成熟に作用しうることを示した。また、転写された MBII-52 配列の解析により、*in vivo* における MBII-52 分子は RNA 高次構造の安定性および相互作用するタンパク分子種により選択・維持されていることがわかった。RNA 分子の安定性に関連して、一部の MBII-52 は 45 bp 前後の短駆型として維持されており、この短駆型 MBII-52 も Fibrillarin を含む RNA/タンパク複合体として存在することも判明した。これらの成果から、マウス脳で特異的に高発現する MBII-52 は、バリエーションの多様性に基づいて複数の機能複合体に組み込まれ、5-HT_{2C}R アイソフォーム発現に働くモジュレーターとして複雑なセロトニン系神経伝達ネットワークを制御していると考えられた。

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 2 件)

- ① 添野雄一, 藤田和也, 田谷雄二, 青葉孝昭: ノンコーディング RNA による遺伝子発現制御と病態—セロトニン受容体修飾と摂食障害. 歯学(査読無), 98:185-188, 2011.

- ② Soeno, Y., Taya, Y., Stasyk, T., Huber, L. A., Aoba, T., Hüttenhofer A.: Identification of novel ribonucleo-protein complexes from the brain-specific snoRNA MBII-52. RNA (査読有), 16: 1293-1300, 2010.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 添野雄一、田谷雄二、藤田和也、Alexander Huttenhoffer、青葉孝昭: マウス染色体 7C snoRNA クラスター領域からの MBII-52 バリエーション発現プロファイル、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会、兵庫県、合同大会プログラム p.272 (2P-638), 2010 年 12 月 8 日.
- ② Soeno, Y., Fujita, K., Kudo, T., Taya, Y., and Aoba, T.: A Mouse Model Lacking U50 box C/D-type snoRNA Expression. The 15th Annual Meeting of the RNA society, Seattle, USA, Abstract (No. 238), 2010 年 6 月 24 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

添野 雄一 (SOENO YUUCHI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号: 70350139