

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657123

研究課題名(和文)レトロトランスポゾン挿入配列によるmRNAの局在・代謝制御機構の解析

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms controlling localization and metabolism of mRNAs via retrotransposon insertions

研究代表者

中川 真一(Nakagawa, Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川RNA生物学研究室・准主任研究員

研究者番号：50324679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：mRNAの非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入配列の機能を調べるために、レトロトランスポゾンSINE B1と高い相同性を持つ核内ノンコーディングRNA、4.5SHに注目した解析を行った。SINE B1がアンチセンス方向に挿入された転写産物は4.5SHと核内で二本鎖RNA構造を形成し、核内に繫留されていた。4.5SHをノックダウンすると、アンチセンス挿入SINE B1を持つ転写産物の核内繫留が解除された。また、4.5SHを介した核内繫留には二本鎖RNA結合蛋白質であるNF110が必要であった。これらの結果から、分子間二本鎖RNA構造形成による新規遺伝子発現制御機構を明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate functions of retrotransposon sequences inserted in the untranslated region of mRNAs, we performed a series of analyses on an abundant nuclear noncoding RNA called 4.5SH, which is highly homologous to retrotransposon SINE B1. 4.5SH formed double-stranded RNA duplex with mRNAs containing antisense insertions of SINE B1, which were retained in the nucleus. The nuclear-retained mRNAs with antisense SINE B1 insertions were released into cytoplasm upon knockdown of 4.5SH. The nuclear retention via 4.5SH was regulated by a double-stranded RNA binding protein called NF110. These results revealed a novel mechanism that controls sub-cellular localization of mRNAs through the intra-molecular formation of the double stranded RNA structures.

研究分野：生物学

キーワード：ノンコーディングRNA レトロトランスポゾン 4.5SH 核

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物のゲノムにはレトロトランスポゾンに代表される転移因子由来の反復配列が多数挿入されており、ヒトやマウスではその割合はゲノムの実に3割を占める。このようなレトロトランスポゾンの挿入はゲノム上でランダムに見られるのではなく遺伝子近傍に集中する傾向にあり、多くの mRNA の非翻訳領域(UTR)には何らかのレトロトランスポゾンが挿入されている事が知られている(Faulkner et al., Nature Genet 41, 2009)。これまで一般的に、レトロトランスポゾンの配列はゲノムの「破壊者」が進化の過程で飛び回った痕跡に過ぎない、と考えられてきたが、最近になって、mRNA の 3' UTR に挿入されたレトロトランスポゾン配列が積極的に遺伝子発現の調節に関わっているのではないかとこの考え方も提唱されるようになってきた。例えば、3' UTR に複数のレトロトランスポゾン配列が逆位に挿入された場合、その領域は分子内二本鎖 RNA(dsRNA)構造を形成する。この構造は dsRNA を基質とするアデノシン脱アミノ酵素の働きによって高度にイノシン化され、ホストの mRNA 産物はイノシン化 RNA が集積する核内構造体、パラスペックルに繫留されることでその発現が負に制御されることが知られている(Prasanth et al., Cell 123, 2005)。また、mRNA の 3' UTR に挿入されたレトロトランスポゾン配列の一部がノンコーディング RNA である 1/2-Stau と特定の二次構造を形成し、その構造が RNA 結合タンパク質である Staufen によって認識され不安定化されるという例もごく最近になって報告されている(Gong and Maquat, Nature 470, 2011)。ただしこれらの機構で制御される mRNA は全体のごく一部に過ぎず、レトロトランスポゾン配列を持つその他大部分の mRNA の局在や代謝が特別の制御を受けているのかどうか、依然として不明な点が多かった。

2. 研究の目的

われわれはこれまで、Xist を初めとする核内ノンコーディング RNA に注目し、その生理機能の解析や作用機序の解明を試みてきた(Sone et al., J Cell Sci 120, 2007; Hasegawa et al., Dev Cell 19, 2010; Nakagawa et al., J Cell Biol 193, 2011)。それら一連の研究の過程で、4.5SH 短鎖散在反復配列 (SINE) 型レトロトランスポゾン B1 が UTR に挿入された転写産物が、SINE-B1 に高い相同性を持ち核内に大量に存在する 4.5S RNAH(4.5SH)によって核内繫留されている可能性を見出した(図1)。これらの予備的な結果は、SINE 型レトロトランスポゾンの挿入がホストの遺伝子の mRNA の局在や代謝の制御に積極的に関わっていることを示唆している。本研究は、この仮説を生化学的・分子生物学的な手法でさらに検証してゆくことを目指した。

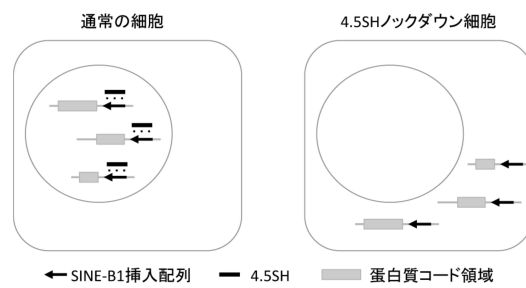


図1 4.5SH の作用機序のモデル
3' UTR に SINE B1 がアンチセンス方向に挿入された mRNA は相補的な配列を持つ 4.5SH と二本鎖 RNA 構造を形成して核内に繫留されている。4.5SH が存在しない状態ではそれらは細胞質へと運ばれる。

3. 研究の方法

(1) 4.5SH とアンチセンス挿入 SINE B1 が二本鎖 RNA 構造を形成していることの検証

一般に、核内で形成された二本鎖 RNA 構造はアデノシンデアミナーゼ (ADAR) と呼ばれる酵素に認識され、アデニンが脱アミノ化されてイノシンに変換される。イノシンは逆転写反応時にグアニンとして認識されるため、塩基配列を決定した時にアデニンがグアニンに置換されていれば、A to I editing を受けていることになり、核内で二本鎖 RNA 構造を形成していたことが予想される。そこで、4.5SH が、アンチセンス方向に挿入された SINE B1 と実際に二本鎖 RNA 構造を形成していることを調べるために、SINE B1 がセンスもしくはアンチセンス方向に挿入されたレポーター遺伝子を安定に発現する細胞を作製し、SINE B1 挿入配列が A to I の RNA editing を受けているかどうか調べた。

(2) 4.5SH と二本鎖を形成している内在の転写産物の探索

4.5SH のターゲットの転写産物は、4.5SH ノックダウン時に核内繫留が解除されるため細胞質での存在量が増加することが予想される。そこで、4.5SH をノックダウンした細胞およびコントロールの細胞質分画から RNA を回収し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。得られた候補遺伝子に関して、細胞質分画と核分画における挙動の変化を qPCR で確認した。また、それらの転写産物が実際に 4.5SH と複合体を形成していることを確認するために、total RNA から 4.5SH を精製し、候補遺伝子の転写産物が共精製されてくるかどうかを調べた。

(3) 4.5SH と複合体を形成するタンパク質の同定

4.5SH とアンチセンス挿入 SINE B1 は単独で核内繫留されているわけではなく、その複合体を認識するなんらかのタンパク質が存在しているのではないかと考えた。そのタンパク質を同定するために、二本鎖 RNA 結合蛋白質ドメインを持つ 24 種類のタンパク質

をノックダウンし、細胞質において 4.5SH 標的遺伝子が増加するものを探索した。また、同定されたタンパク質に対する抗体を用いてクロスリンク免疫沈降を行い、それらが実際に 4.5SH およびアンチセンス挿入 SINE B1 と複合体を形成しているかどうか検証した。さらに得られた候補遺伝子に関して CRISPR-Cas9 を用いてノックアウトマウスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 4.5SH はアンチセンス挿入 SINE B1 と核内で二本鎖 RNA 構造を形成している。

4.5SH もしくは SINE B1 がセンス、アンチセンス方向に挿入されたレポーター遺伝子について、挿入配列の A to I editing の有無を調べたところ、4.5SH がアンチセンス方向に挿入されたもので顕著な editing がみられた。また、SINE B1 がアンチセンスに挿入されたものについても、頻度は少ないものの editing が観察された。また、これらの editing は ADAR をノックダウンした細胞では全く見られなかった。これらの結果は、4.5SH が内在性のアンチセンス挿入 SINE B1 と核内で二本鎖 RNA 構造を形成していることを強く示唆していた。一方、センス挿入 SINE B1 配列においては、editing はほとんど観察されなかった。SINE B1 の挿入は数多くの mRNA にみられることから、理論上は、それら mRNA に挿入されたセンス、およびアンチセンス挿入 SINE B2 配列同士が二本鎖 RNA 構造を形成することも可能性としては考えられる。しかし、センス挿入 SINE B1 で editing がみられなかったことから、mRNA 分子間でのセンス-アンチセンス相互作用はほとんど起きていないことも予想された。

(2) 4.5SH は Npat や Gastl3 などのアンチセンス挿入 SINE B1 を持つ mRNA の核内繫留を制御している。

4.5SH ノックダウン細胞の細胞質で発現量が増加した遺伝子は全部で 586 種類あったが、そのうち、アンチセンス挿入 SINE B1 を持つ遺伝子は 70 種類と、約 12% 程度であった。アンチセンス挿入 SINE B1 を持たない mRNA がなぜ 4.5sh ノックダウンにより発現変化したのかを調べるために、その細胞内局在を調べたところ、核分画、細胞質分画、ともに発現が上昇していた。一方、アンチセンス SINE B1 が挿入された候補遺伝子の転写産物は、核分画で減少し細胞質分画で上昇している傾向にあった。これらの結果は、アンチセンス SINE B1 が挿入された内在遺伝子の転写産物の核内繫留が 4.5SH のノックダウンによって解除され、その二次的な影響によって多数の遺伝子の発現それ自体が変化していることを示していた。

これらの解析によって同定された 4.5SH の

ターゲットとなる内在遺伝子には Npat や Gastl3 などがあった。興味深いことに、total RNA から 4.5SH を精製すると、これらの遺伝子の mRNA も共精製されてくることが分かった。この結果は、Npat や Gastl3 が 4.5SH によって核内繫留されていることを強く示唆していた。

(3) NF110 は 4.5SH とアンチセンス挿入 SINE B1 複合体を認識し、それらを核内に繫留させている。

マウスゲノムには二本鎖 RNA 結合ドメインを持つタンパク質が計 24 種類存在する。それらをひとつずつノックダウンした結果、NF110 と呼ばれるタンパク質をノックダウンすると、4.5SH をノックダウンした時と同様にアンチセンス挿入 SINE B1 の核内繫留が解除されることが分かった。また、NF110 に対する抗体を用いてクロスリンク免疫沈降実験を行った結果、4.5SH、Npat、Gastl3 とともに共沈降されてくることが分かった。また、NF110 には選択的スプライシングの結果作られる NF90 というアイソフォームも存在するが、NF110 をノックダウンした時の効果は NF90 によってレスキューすることはできなかった。NF110 にはプリオン様ドメインという、グルタミン、セリン、チロシンなどの非電荷極性アミノ酸に富むドメインが C 末端側に存在するが、このドメインを NF90 は持たない。また、NF90 は主として核小体に存在することに対し、NF110 は核質全体に存在することも分かった。NF110 の生理機能を確かめるために、CRISPR-Cas9 のシステムを用いて、プリオン様ドメインにナンセンス変異を導入したマウスの作製を試み、2 系統のノックインヘテロマウスを得ることができた。

これら一連の研究により、レトロトランスポゾン挿入配列を介した mRNA の新規核内繫留機構を明らかにすることができた。

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 5 件)

原著論文

① Ishizuka, A., Hasegawa, Y., Ishida, K., Yanaka, K. & Nakagawa, S. Formation of nuclear bodies by the lncRNA Gomafu-associating proteins Celf3 and SF1. *Genes Cells* 19, 704-21 (2014). 査読有 doi: 10.1111/gtc.12169.

英文総説

Nakagawa, S. & Kageyama, Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-Beyond skepticism. *Biochim. Biophys. Act.* 1839, 215-22 (2013). 査読有

doi: 10.1016/j.bbagr.2015.03.001

和文総説

石田賢太郎, 中川真一 レトロトランスポゾン配列を介して形成される二本鎖 RNA による遺伝子発現制御
細胞工学 34, 38-42 (2015)、査読無

中川真一, 石田賢太郎 mRNA 非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入配列による転後遺伝子発現制御
実験医学増刊号 (2013) 31, 1079-1085、査読無

中川真一 転移因子・ウイルスと宿主のせめぎ合いによりもたらされるゲノム進化.
実験医学増刊号, 31 (7), 83-90 (2013)、査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

- ①中川真一、石田 賢太郎「レトロトランスポゾン SINE B1 と相同配列を持つ核内ノンコーディング RNA によるグローバルな遺伝子発現制御」第 85 回日本遺伝学会、慶應義塾大学日吉キャンパス、神奈川県横浜市 2013 年 9 月 19 日

Ishida K., Nakagawa S.

A novel gene expression regulatory mechanism controlled by 90nt nuclear non-coding RNA through the nuclear retention
第 14 回日本 RNA 学会年会、東北大学百年記念会館、宮城県仙台市、2012 年 7 月 18 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riken.jp/lab-www/nakagawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 真一 (NAKAGAWA SHINICHI)
独立行政法人理化学研究所・中川 RNA 生物学研究室・准主任研究員
研究者番号：50324679