

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700333

研究課題名(和文) Musashi1-RNA相互作用ゲノムマッピング

研究課題名(英文) Genome-wide mapping of Musashi1-RNA interaction

研究代表者

矢野 真人 (Yano, Masato)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20445414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：in vivo蛋白質-RNA相互作用検出法、HITS-CLIPにより、神経幹細胞に強く発現するRNA結合蛋白質Musashi1(Msi1)の胎生期マウス脳におけるMsi1-RNA相互作用のゲノムマッピングを行った。その結果、生体内におけるMsi1のRNA結合部位をゲノムワイド1塩基解像度で同定することに成功した。このMsi1-RNA相互作用ゲノムマップを用いる事で、新規のMsi1標的RNA遺伝子群を同定し、これまでの解析で明らかとなっていたMsi1のRNA制御に加え、新たに新規のMsi1の機能の発見を導く事ができた。

研究成果の概要(英文)：To understand a comprehensive role of neural RNA binding protein, Msi1, which is expressed in neural stem cells, we generated genome-wide Msi1-RNA binding map on the mouse embryonic brain by using HITS-CLIP, High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation methods. By using Msi1-RNA interaction map, we identified robust Msi1 RNA binding regions transcribed from the genome, specific in vivo RNA motif at the 1nt resolution, identified by CIMS assay and many novel RNA targets of Msi1. In addition to previously known Msi1 function, we found the novel functions of Msi1 in various aspects of RNA processing, validated in null mutant mice and gain of function study.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：RNA結合蛋白質 HITS-CLIP 転写後調節機構 神経発生

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクト終了以降、限られた DNA 配列情報の限界を超越し、10 万種類以上存在すると言われる機能的蛋白質を産生するには RNA レベルでの制御 'RNA complexity' の重要性が指摘されている。近年、RNA complexity の統合的理解には、より正確かつ unbiased(不偏)な RNA-蛋白質相互作用のゲノムマッピング技術 HITS-CLIP 法といった *in vivo* における生化学的アプローチが必須となってきた。

RNA 結合蛋白質 Msi1 蛋白質は、これまでの研究で、様々な組織特異的幹細胞や癌細胞で高い発現を示し、その増殖維持などといった生物学的機能が注目されている。様々な生理学的役割に対し、これまで Msi1 の分子メカニズムの解析として、分子生物学的解析が進められ、*in vitro* SELEX 法による結合 RNA のコンセンサス配列の同定及び、これを元にした標的遺伝子群の同定、また標的 RNA を介した RNA 制御メカニズム、特に翻訳抑制制御メカニズムが解明された。その中でも、Msi1 の標的 RNA として *Numb* や *p21* といった幹細胞の機能・性質に関与する遺伝子群を中心に想定されてきた。

一方で、研究代表者のこれまで研究を進めてきた RNA 結合蛋白質 Nova2 や他の RNA 結合蛋白質群の解析により、それぞれの RNA が、数百にのぼる標的遺伝子群に対する RNA 制御を担い、神経系発生における遺伝子発現ダイナミクスを形成していることが分かってきた。これらの例を考慮すると Msi1 もまた膨大な標的 RNA 群を介したダイナミックな RNA 遺伝子制御が見積もられ、より正確で包括的な手法 (HITS-CLIP 法) を用いることで、神経幹細胞因子 Msi1 蛋白質の *in vivo* 標的因子群の同定とその RNA 制御ネットワークの解析の必要性が迫られていた。

## 2. 研究の目的

Msi1 の組織幹細胞 (特に神経幹細胞) における発現パターン、幹細胞制御の関連性の重要度を考え、研究代表者がこれまで進めてきた Nova2 蛋白質の解析の成功例に従い HITS-CLIP 法による Msi1-RNA 相互作用ゲノムマッピングを行い、トランスクリプトームワイドな Msi1 の全標的 RNA 群の同定とその RNA 制御メカニズムを包括的蛋白質-RNA 相互作用ゲノムマップを用いて明らかにすることを目的とした。本研究により、発生期の神経幹細胞における Msi1-RNA 相互作用のダイナミクスによる RNA 制御機能と幹細胞の増殖や多分化能維持の謎に RNA complexity という観点から迫る。また、様々な神経系前駆細胞

に働く RNA 結合蛋白質群と強調した神経幹細胞の RNA 制御ネットワークの分子基盤とする。

## 3. 研究の方法

### (1) HITS-CLIP 法を用いた *in vivo* Msi1-RNA 相互作用ゲノムマッピング

胎生期 14 日目の脳組織を UV 照射し、生細胞中で 1 オングストロームの距離にある核酸 (RNA) と蛋白質間を共有結合させた後、脳抽出液を作製した。次に Msi1 特異的抗体を用いた免疫沈降後、SDS-PAGE、ニトロセルロースへの転写後、ラベルされた蛋白質と共有結合した RNA 約 50 塩基長のサイズを切り出し精製し、cDNA 合成によりライブラリー作製後、次世代シーケンサーによって Msi1 結合 RNA を解読した。高精度の RNA マッピングを保証するため、蛋白質-RNA 相互作用の特異性を示すネガティブコントロールして、Msi1 欠損マウス胎児脳を用いた。シーケンス後の解析で、n=5 の別々の野生型マウス胎児脳をサンプルとして HITS-CLIP 解析を行い、ゲノムにアノテーションされたそれぞれの Msi1 蛋白質-RNA タグを少なくとも 3nt 以上の重複領域を持ち、5 タグ以上の複数の脳サンプル由来 RNA タグを含むものをゲノム上の Msi1-RNA 結合部位と定義した。上記手順に従い、マウス胎児脳を用いたトランスクリプトームワイド Msi1-RNA 結合ゲノムマップの作製を行った。次に、Msi1-RNA 結合ゲノムマップを用い、Msi1 の RNA 結合部位の分布、及び、*in vivo* での結合配列の同定、さらに CIMS (Crosslinking-induced mutation site) 解析により 1 塩基解像度でバイオフィォマティクス解析により Msi1 結合配列のコンセンサス配列を同定した。

### (2) ゲノムワイド RNA マップを用いた Msi1 蛋白質による RNA 制御解析

で同定された新規 Msi1 標的遺伝子群に対する Msi1 の機能解析を進めた。同定された 1000 近い標的遺伝子群と脳内に豊富に発現している遺伝子群に対する Gene Ontology 解析を行った。さらに、新規に同定された標的遺伝子群に対し、従来明らかとされていた Msi1 の翻訳抑制制御の役割を検証した。さらに、Msi1 の新規 RNA 制御メカニズムの可能性を考え、今回の Msi1-CLIP データよりこれまで想定されてきた mRNA 配列でないイントロン領域、また非コード RNA 領域、Intergenic 領域と多岐にわたる RNA 結合部位を持つことから、Msi1 が RNA プロセッシング制御を有するかを検証した。それぞれ、Msi1 欠損マウスを用いた、Loss of function 実験、Msi1 の

RNA への直接結合を介した直接制御であることを示すため、Gain of function 実験により確証した。これらの分子生物学的実験に対し、野生型、Msi1 欠損マウス胎生期脳皮質より採取した全 RNA から mRNASeq 用ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を合わせて行った。

#### 4. 研究成果

*in vivo* 蛋白質-RNA 相互作用検出法、HITS-CLIP により、神経幹細胞に強く発現する RNA 結合蛋白質 Musashi1 (Msi1) の胎生期マウス脳における Msi1-RNA 相互作用のゲノムマッピングを行い、Msi1 の RNA 制御メカニズムおよび生体内における役割に迫ることを目的とした。*In vivo* における Msi1 と相互作用している標的 RNA を同定するため、UV 照射したマウス胎児脳の抽出液より Msi1 を認識する抗体を用い Msi1 欠損マウスをネガティブコントロールとした、HITS-CLIP ライブラリーを次世代シーケンサーにより解読した。得られた配列情報をバイオインフォマティクス解析により、再現性、信頼性の高い Msi1-RNA 相互作用部位、約 16,000 部位の同定に成功した。これらの結合部位は、特に 3' 非翻訳領域に多く存在する一方で、Coding エクソン、イントロンや intergenic 領域といった様々な部位に Msi1 結合部位がみられた。さらに、CIMS 解析を合わせ 1 塩基解像度レベルで Msi1-RNA の相互作用部位を検出した結果、従来 *in vitro* で明らかとなった結合配列と同等な配列情報が得られた。さらに、標的遺伝子群を 1000 近く同定し、これらが前脳発生に重要な分子群と関連性が強いことが GO 解析により明らかとなった。Msi1 の分子機能について、従来翻訳抑制因子としてその分子メカニズムが明らかとなっており、本研究において多くの神経発生制御に関わる新規標的遺伝子について翻訳抑制機能を有する事が確かめられた。また、従来の分子機能に加え、様々なゲノム領域における Msi1 の HITS-CLIP マッピングにより、従来の翻訳抑制制御だけでなく新たに 3 つの新規機能を持つ事を明らかにした。それぞれの機能が Msi1-RNA 相互作用依存的である事を、Msi1 欠損マウス、初代培養系を用いることで証明した。

これまで、Msi 蛋白質研究の歴史で、成体神経幹細胞の存在、細胞運命決定因子、新しい翻訳抑制制御メカニズムなど様々な発見がなされてきた。その中で本研究課題により、正確な Msi1 の RNA 結合ゲノムマッピングに成功したことで、これまでゲノム上の約 80% 以上の領域から転写されるという RNA 群に対する Msi1 の足跡を辿る事が可能となり、新

しい Msi1 研究のスタート地点 (研究リソース的意義) 及び Msi1 の新規機能の発見に至った。今後、神経幹細胞因子 Msi1 とさらに複数因子の RNA ゲノムマップとの相互 RNA 制御ネットワークをひも解いていくことで、神経幹細胞から成体脳までの分化成熟過程のヒストリーを追跡する RNA ロードマップを使った RNA ダイナミクスによる脳の発生分化の統合的理解が進むものと期待される。

#### 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)

(以下、全て査読有)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Masato Yano<sup>\*</sup>, Takafumi Ohtsuka, Hideyuki Okano<sup>\*</sup>: RNA-binding protein research with transcriptome-wide technologies in neural development: *Cell & Tissue Research* 2014 *in press* (\*Co-corresponding Author)

2. Donny D. Licatalosi, Masato Yano, John J. Fak, Aldo Mele, Sarah E. Grabinski, Chaolin Zhang and Robert B. Darnell: Ptpb2 represses adult-specific splicing to regulate the generation of neuronal precursors in the embryonic brain: *Genes & Development* 2012 July 15;26:1626-1642

3. 矢野真人, 岡野栄之: 幹細胞制御と RNA ネットワーク 細胞 44(9)pp381-384(2012年7月)

4. Shinsuke Shibata, Masahiko Umei, Hironori Kawahara, Masato Yano, Shinji Makino, Hideyuki Okano: Characterization of the RNA-binding protein Musashi1 in zebrafish: *Brain Research* 2012 June 26;1462:162-73

[学会発表](計 6 件)

1. 矢野真人: Transcriptome wide mapping of glial cell lineage RNA binding proteins-RNA interaction in Brain. 第 19 回グリアカラブ (新潟) (2014 年 3 月 1 日)

2. Masato Yano, Satoe Banno, Ikuko Koya, Robert B. Darnell and Hideyuki Okano: Transcriptome-wide mapping of Msi1-RNA interactions in neural stem cell 第 4 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジ

ウム RNA world in Brain (2013 年 7 月 27 日) 新潟

3.大塚貴文,矢野真人,芳川昇之,岡野栄之:  
神経特異的 RNA 結合蛋白質 Elavl2 の成体脳  
における RNA 制御機構の解析 Neuro2013  
(京都)(2013 年 6 月 21 日)

4.陶山智史,矢野真人,岡野栄之 Quaking  
isoform 5(Qki5)による細胞周期制御機構の  
解明 Neuro2013 (京都) (2013年6月21日)

5.Masato Yano, Satoe Banno, Nobuyuki  
Yoshikawa, Takafumu Ohtsuka, Shinsuke  
Shibata Robert B. Darnell and Hideyuki  
Okano : Transcriptome-wide analysis of RNA  
processing by neural RNABPs during  
neurogenesis 第35回日本分子生物学会2012  
年12月13日 福岡

6.Masato Yano, Jak Fak, Aldo Mele, Yoshika  
Hayakawa-Yano, Hideyuki Okano and Robert  
Darnel: HITS-CLIP as a tool for stem cell  
research; International Society for Stem  
Cell Research, 10<sup>th</sup> Annual meeting Yokohama,  
Japan June 15,2012

〔図書〕(計 1 件)

1.矢野真人,岡野栄之:メディカル・サイエ  
ンス・インターナショナル: カンデル神経科学  
PRINCIPLES OF NEURAL SCIENCE Fifth Edition  
Chapter3 「遺伝子と行動」 翻訳担当  
(page38-64) 2014 年 4 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 真人(Masato Yano)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号:20445414