

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670542

研究課題名(和文)放射線が幹細胞に与える遺伝子転写後調節機能への影響の新規システムによる体系的解析

研究課題名(英文) Analysis of irradiation effects on post-transcriptional control of gene expression by a newly developed method

研究代表者

奥 英二郎 (OKU, Eijiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10569429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、microRNAやRNA結合タンパクによるmRNAからタンパクへの翻訳における転写後調節(Post-transcriptional control)の重要性が明らかになっている。本研究では、“実際に転写後調節を受ける遺伝子(被転写後調節遺伝子)を網羅的に解析できる新規方法を開発し、放射線がこの転写後調節ステップに与える影響を解明する目的で多能性および体性幹細胞に本システムを応用した。多能性および体性幹細胞において放射線により影響を受ける被転写後調節遺伝子群を同定しており、放射線治療における新しいターゲット遺伝子を探索していく。

研究成果の概要(英文)：Recently, post-transcriptional control of gene expression, mediated by such as microRNA and/or RNA-binding protein, has been considered to play an important role in gene regulation. In this study, we developed a novel method to discover a set of genes of post-transcriptionally regulation using retrovirus vector system. In order to find out genes with post-transcriptionally regulation affected by radiation, we applied this method to pluripotent stem cell as well as hematopoietic stem cell with or without irradiation and could detect sets of genes of interest. We will perform further investigation to find out genes for therapeutic targets and to clarify the underlying mechanism of translational control.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：遺伝子発現調節 放射線生物学

1. 研究開始当初の背景

放射線治療は外科手術，化学療法に並ぶ主要ながん治療手段であり，その作用機序についても多くの研究がなされている。放射線照射が遺伝子発現に与える影響の研究としては，すでに遺伝子発現 (mRNA) やタンパク発現等の網羅的解析がなされており，放射線の生体への影響に新しい知見をもたらしてきている。

一方，近年，遺伝子の転写後調節 (Post-transcriptional control) の重要性が明らかになってきており，特に microRNA や RNA 結合タンパクによる主として遺伝子の翻訳制御が注目されている。しかし，この転写後調節の重要性にも関わらず，転写後調節への放射線の影響を“実際に転写後調節で制御される遺伝子そのもの (被転写後調節遺伝子) の観点から評価した解析は，何より適切な方法論が確立されていないため，十分になされていない。

具体的には，(i) microRNA は具体的にどのような遺伝子群を，転写後制御しているのか？ (ii) microRNA、RNA 結合タンパクや mRNA の構造変化など，多岐にわたる転写後調節機構のなかで，各々の機構にはどのような生物学的な役割があるのか？ (iii) 転写後調節の“程度”や“変化(増強・解除)”は，どのような機序で制御されているのか？ (iv) そして，これらの転写後調節システムは，放射線照射によりどのような影響を受けるのか？これらについては十分な研究はなされていない。

これらのメカニズムを明らかにするためには，従来の方法論では不十分であり，実際に転写後調節を受ける遺伝子群を同定し，さらに放射線の与える影響についてそのメカニズムの解析を行うことが求められている。転写後調節遺伝子を同定する新規方法し，放射線照射に応じて変化する被転写後調節遺伝子群を体系的に同定することができれば，放射線治療および防御における新しいターゲット遺伝子の発見につながり，放射線生物学において重要な意義を有する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は，microRNA や RNA 結合タンパクにより制御されている遺伝子転写後調節に対する放射線の影響を解析し，調節を受ける遺伝子群およびそのメカニズムを明らかにすることである。

そのために“実際に転写後調節を受ける遺伝子”を網羅的に解析できる新規の方法を開発し，この方法を放射線の影響において重要となる幹細胞に応用し解析を行う。幹細胞としては，多能性幹細胞として iPS (induced pluripotent stem cell) を，体性幹細胞として造血幹細胞 (HSC) を対象とする。

新規方法を幹細胞へ応用することにより，

まず幹細胞における転写後調節を受ける遺伝子群の体系的な同定を行い，これら被転写後調節遺伝子群の内より放射線照射により変化する遺伝子の探索・同定を行っていく。さらに，これらの解析結果を基盤として，放射線照射により変化する被転写後調節遺伝子群において幹細胞間で共通した遺伝子の抽出を試み，放射線治療およびその防御における新たなターゲット遺伝子を同定することを目指す。

転写後調節の研究において，調節を受ける個々の遺伝子を詳細に解析することはもちろん重要なアプローチであるが，本研究では，細胞における被転写後調節遺伝子 (複数) を一群のものとして捉え，その役割を解析していく。このような観点により，これら一群としての遺伝子セットを“被転写後調節遺伝子トランスクリプトーム (Transcriptome of post-transcriptional regulated genes) として捉えることで転写後調節の共通項を発見していく。

3. 研究の方法

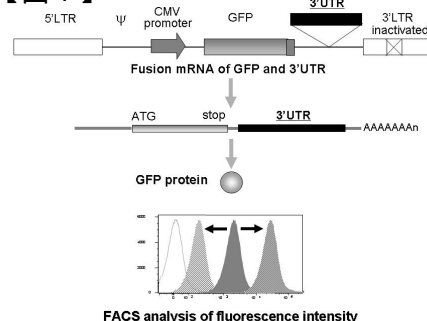
(1) 転写後調整を受ける遺伝子の新規同定法

被転写後調整同定の新規開発ベクター
遺伝子発現における転写後調節の重要性が明らかになってきていることから，放射線照射がこの転写後調節ステップに与える影響の研究は，放射線の生物影響の理解において重要な意義を持つと予測される。しかしこれまで，被転写後調節遺伝子を調べる方法論が十分に確立されていなかったことから，これら被転写後調節遺伝子を遺伝子群として体系的に捉え解析することができなかった。

この問題点を解決するため，転写後調節により制御される遺伝子群を網羅的に同定する新規解析法を開発し，個別にしか解析することができなかった被転写後調節遺伝子を，細胞全体で遺伝子群として俯瞰的な解析が可能となるようにする。

基本構造を図 1 に示している。レトロウイルス・ベクターの GFP 遺伝子下流に目的遺伝子の 3' UTR 領域を挿入し細胞へ導入する。当該領域に転写後調節機能が存在すれば GFP mRNA の転写後翻訳調節に影響を与える。その結果，目的の遺伝子領域の転写後調節活性を GFP 蛍光強度の変化として評価することがで

【図 1】



きる。

本ベクターシステムにより転写後調節機能を“簡便かつ正確に”解析することができ、このシステムを応用して転写後調節を受ける遺伝子群を機能的スクリーニングすることで、被転写後調節遺伝子群を体系的に同定する。

この新規開発法は、転写後制御の機能的スクリーニング法であるため、転写後調節の個別の機序 (microRNA・RNA 結合タンパク・RNA 構造) や特定分子等の制限を受けないという大きな利点があり、全体像の解明に適した方法である。

遺伝子断片のクローニング

新規開発ベクターの導入により転写後調節活性を示した細胞のソート分画から挿入遺伝子断片を PCR 法で回収する。ここで回収された遺伝子断片は次の 2 つの手順で解析を行う。

(a) 直接塩基配列解析：得られた遺伝子断片を再びレトロウイルス・ベクターの GFP 遺伝子下流に組み込み、同様の FACS スクリーニングを 3 ~ 4 回繰り返すことにより、活性をもつ遺伝子断片を濃縮する。最終的に得られた遺伝子断片はランダムにクローンの直接塩基配列解析を行う。この方法により、被転写後調節遺伝子群の候補遺伝子を同定していく。

(b) DNA チップ (Tiling array) による配列分布の解析：得られた遺伝子断片を直接あるいは濃縮の後に、DNA microarray (Tiling array) でチップ解析することで、転写後調節活性をもつ配列解析から“遺伝子群”を抽出し比較解析していく。この方法で各幹細胞間および後述する放射線照射の条件による転写後調節を受ける遺伝子群の変化を捉える。

遺伝子候補の転写後調節の確認

これらスクリーニングにより同定された遺伝子候補群が、実際に細胞内で転写後調節を受けているかどうかの確認を行う。そのためクローニングした領域を再びレトロウイルス・ベクターに挿入し、当該細胞で GFP 発現が抑制されることを確認する。配列上に RNA 結合タンパクあるいは microRNA の結合領域が予想される場合には、さらに遺伝子変異解析を行い、転写後調節機序を明らかにする。対応する抗体が得られる場合には Western blot による翻訳制御の確認実験を行うとともに、後述のゲノム編集による遺伝子改変を導入する。

(2) 解析対象とする細胞と放射線照射

放射線の影響において重要となる“幹細胞”を対象とし、特に多能性幹細胞として iPS を、体性幹細胞として造血幹細胞 (HSC) を用いる。ここで iPS 細胞は、ヒト末梢血単核球に山中 4 因子を含むセンダイウイルスを感染させることで複数クローンを樹立した。HSC は骨髓あるいは臍帯血中の CD34 陽性細胞をビーズセレクション法により分

離した。

これらの細胞に新規開発法を応用し、放射線照射により影響を受ける被転写後調節遺伝子群を同定し、次の 4 項目：(i) 幹細胞における転写後調節を受ける遺伝子群の体系的同定、(ii) 放射線により変化する被転写後調節遺伝子群の探索・同定、(iii) 放射線により変化する被転写後調節遺伝子群において各幹細胞間で共通した遺伝子の抽出、(iv) 放射線治療および防御における、新たなターゲット遺伝子の探索、を主に解析を行う。本法の導入により、放射線が幹細胞に与える転写後調節機能への影響を、幹細胞を対象として網羅的に解析し、これまで解析困難であった転写後調節機能への放射線の影響の基盤データを構築する。

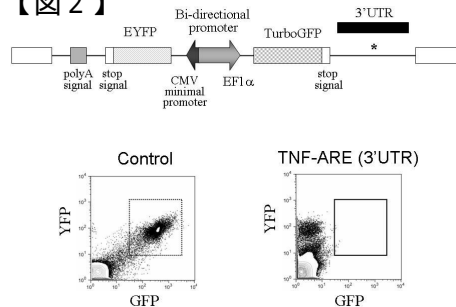
4. 研究成果

(1) 転写後調節を受ける遺伝子群の体系的解析

本研究目的のため、転写後調節により制御される遺伝子群を網羅的に同定する新規解析法を開発した。

基本構造としては、GFP 遺伝子下流に目的遺伝子の 3' UTR 領域を挿入しレトロウイルス・ベクターであるが、レトロウイルス導入効率や細胞種でのプロモーター活性の違いを補正するため、両方向性プロモーター (bi-directional promoter) を導入し、YFP 遺伝子を補正用のコントロールとするベクターを構築した (図 2)。

【図 2】

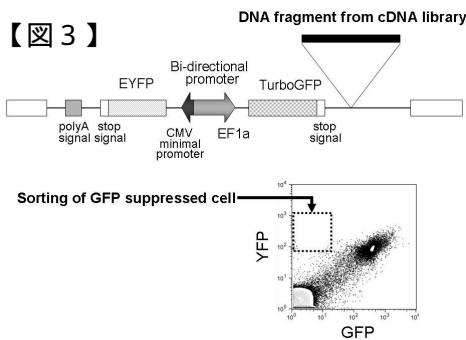


基本構造のベクターと同様に、コントロールでは、GFP、YFP 両遺伝子から同等レベルの蛍光発現が認められるが (図 2 左下)、TNF 遺伝子の 3' UTR の ARE 領域の挿入により、造血幹細胞で GFP 発現のみが強く抑制されており (図 2 右下) TNF-ARE 配列に転写後抑制活性が存在することが明確に捉えられることが分かる。

従来、転写後調節を受ける遺伝子を発見するためには、個々の遺伝子をクローニングし各細胞で機能解析をする必要があり、時間と労力が必要とされてきたが、新規に開発したレトロウイルスによるシステムでは、対象細胞における被転写後調節遺伝子を簡便に“遺伝子群”として同定することが可能となっており、システムが目的通りに動作すること

が実証できている（後述）。

ベクターに挿入する遺伝子断片としては、iPS および HSC 細胞の抽出 mRNA から cDNA ライブラリーを構築し、その cDNA を sonication により 200 ~ 500bp に断片化することで作成した。この遺伝子断片を本レトロウイルス・ベクターの GFP 遺伝子の下流にクローニングした。



この遺伝子断片を挿入したベクター・ライブラリーからレトロウイルス・ライブラリーを作成し、各幹細胞へウイルス感染により導入する。この際、cDNA 断片に転写後調節活性が存在すれば、その活性に応じてレトロウイルス導入細胞の GFP 遺伝子の発現が抑制されるため、図 3 下の点線枠部分にそれらの細胞がプロットされる。この細胞を FACS Aria でソーティングし、挿入された cDNA 断片を配列解析することで転写後調節を受ける遺伝子を網羅的に同定した。

(2) 幹細胞における転写後調節を受ける遺伝子群の同定および放射線の影響

本システムを幹細胞に応用することで転写後調節を受ける遺伝子を探索した。FACS ソーティングした GFP 発現 low 細胞集団からクローニングされた遺伝子断片から候補遺伝子を同定した。それら候補遺伝子の一部においては、ウイルスベクターへ再クローニングで転写後調節活性を確認するとともに、実際のタンパクレベルでの翻訳制御が確認されている。

興味深い分子として、c-Fos、Notch1、GATA3、HPRT、CDK7、ANXA5、NPM1 など一連の遺伝子が抽出されており、特に、c-Fos は放射線照射によってその転写後調節に影響がみられている。c-Fos は細胞性がん遺伝子の一つであり細胞の分化や増殖にも重要な役割を果たしていると考えられていると同時にシナプスの可塑性つまり長期記憶において重要な役割があることから、その転写後調節の生物学的意義を明らかにするため事項(3)の機能解析を進めている。また、Notch1、GATA3 は HSC から同定されたが、いずれも T 細胞の分化決定に重要であることが報告されており、HSC から T 細胞への分化過程に転写後調節が関与していることが推定される。さらに、HPRT プリン代謝酵素は、小児急性白血病の主要薬剤である抗がん剤 GMP の活性化に関与しており、HSC での HPRT 転写後抑制が造血抑制

の制御につながっている可能性があり、薬剤代謝制御に遺伝子の転写後調節がはたしているという重要な知見を得ることができている。

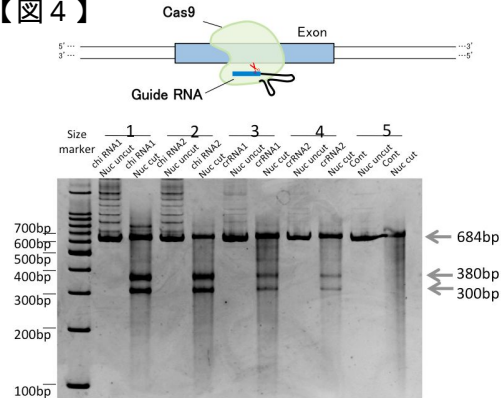
一方、同定された被転写制御遺伝子群の中に AU-rich 配列を共通して含んでいる遺伝子群があり、RNA 結合タンパクが遺伝子制御に関与している可能性が明らかになった。PCR および Western blot で幹細胞での存在を確認した RNA 結合タンパクの中で、AUF1 を制御遺伝子の候補として定常状態および放射線照射における転写後調節への機能的影響を解析することとした。

(3) 同定された転写後調節を受ける候補遺伝子の機能解析

これらの同定された転写後調節を受ける遺伝子群、さらにこれらの遺伝子群を制御する RNA 結合タンパクについて、転写後調節の生物学的機能およびメカニズムを明らかにするために個々の遺伝子の機能解析を行う必要がある。本研究開始時には、(i)機能領域に対するアンチセンス DNA による結合タンパク会合抑制、(ii)RNAi による RNA 結合タンパクのノックダウン、2つの方法論を準備していた。

まず、同定された c-Fos 遺伝子に対して機能領域(3' -UTR)に対するアンチセンス DNA を実施したが、アンチセンス DNA は c-Fos 遺伝子の転写後調節を抑制しなかった。転写後調節が結合タンパク以外の機序で行われている可能性もあるが、この方法論では安定した結果が得ることができないことが判明した。また、RNA 結合タンパクである AUF1 の機能解析のために RNAi ノックダウンを施行したが、一部の遺伝子で転写後調節効果への影響が現れたもののその効率は十分でなかった。いずれの方法論も partial な効果にとどまり、期待する表現型を得ることができなかった。

【図 4】



genome: CGGCAGAGCTGGAGGAGGAAGGGCTGAGTCCGAGCAGAAGAAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCCATTGCC
 Guide sequence: GAGTCCGAGCAGAAGAA
 Clone1: CGGCAGAGCTGGAGGAGGAAGGGCTGAGTCCGAGCAGAAGAAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCCATTGCC
 Clone11: CGGCAGAGCTGGAGGAGGAAGGGCTGAGTCCGAGCAGAAGAAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCCATTGCC
 Clone12: CGGCAGAGCTGGAGGAGGAAGGGCTGAGTCCGAGCAGAAGAAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCCATTGCC
 Clone18: CGGCAGAGCTGGAGGAGGAAGGGCTGAGTCCGAGCAGAAGAAAGGGCTCCATCACATCAACCGTGGCCATTGCC

そこで、確実に遺伝子あるいは遺伝子調節

領域の改変を行うため、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を導入した。CRISPR/Cas9 法は、図 4 に示すように、Cas9 および guide-RNA を遺伝子導入することでターゲットとするゲノム領域に遺伝子欠失変異を誘導することができる (図 4 中・下)。さらにベクターに数 100bp 程度のアームを設置することにより遺伝子ノックインを実行することも可能であった。実際に iPS および HSC 細胞で CRISPR/Cas9 法が動作することを確認できたことから、転写後調節を受ける遺伝子として c-Fos、HPRT 遺伝子の 3' -UTR 領域の欠失変異の作成および RNA 結合タンパク AUF1 のノックアウト細胞の作成を行っており、定常状態での機能解析を行うとともに放射線に対する反応を解析する。

本研究で確立したシステムは転写後調節の“質” (程度と変化) を簡便に解析することが可能であり、目的遺伝子群の同定とともに、探索された遺伝子における転写後調節の生物学的意義を検討してゆくことが可能である。転写後調節を受ける遺伝子群の同定からそれぞれの遺伝子の機能評価へと移行し、引き続き放射線の影響機序を解明する。一方、当該遺伝子の転写後調節のメカニズムとして、microRNA、RNA 結合タンパクあるいは RNA 構造等それぞれの遺伝子制御機構を解析していく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takata Y, Seki R, Kanajii T, Nohara M, Koteda S, Kawaguchi K, Nomura K, Nakamura T, Morishige S, Oku E, Osaki K, Hashiguchi E, Mouri F, Yoshimoto K, Nagafuji K, Okamura T.

Association between thromboembolic events and the JAK2 V617F mutation in myeloproliferative neoplasms, *Kurume Med J*, 査読有, 60 巻, 2014, 89-97.

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

奥 英二郎 (OKU, Eijiro)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 1 0 5 6 9 4 2 9