

受賞者

廣瀬 哲郎

(独) 産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・機能性RNA工学チーム

研究テーマ

核内低分子non-coding RNAによる遺伝子発現のファインチューニング機構の解明

1. はじめに

真核細胞の核内には、タンパク質をコードしないノンコーディングRNA(ncRNA)種が多数存在する。これらのncRNAは、疾患タンパク質遺伝子の発現制御因子として機能することによって、疾患の様々な局面で重要な役割を果たしていることが期待されている。例えば、核内低分子RNA(snRNA)は、pre-mRNA スプライシングなどのRNAプロセシングに関与していることがよく知られているが、スプライシング異常によって引き起こされる疾患は数多く知られている(1)。また核小体低分子RNA(snoRNA)は、リボソームRNAの転写後修飾装置を構成する一群の低分子ncRNAであるが、最近このRNA修飾の欠損によってリボソーム機能が変化し疾患を引き起こしている例が報告された(2)。このように既に機能が解明された核内ncRNAに加えて、近年新たに機能未知のRNA種が数多く発見されている。例えば、これまでにヒトで300種以上見つかったsnoRNAの中には、リボソームRNAを標的としない機能未知の「オープンsnoRNA」が50種以上存在する。このうちHBII-52 snoRNAは脳特異的に発現し、セロトニン受容体5HT-2C前駆体mRNAのRNAエディティング部位及び選択的スプライシングを制御し、Prader-Willi症候群(PWS)という遺伝性疾患に関わっている可能性が指摘されている(3)。この他にも核内ncRNAには、様々なRNAプロセシング、転写、染色体機能制御などに関わるものが知られている。こうしたことから機能未知の核内ncRNAには、核内の遺伝子発現現象を柔軟に制御し、遺伝子発現のファインチューニングを行っている可能性が指摘されている。しかしながら、これらの核内ncRNAの機能解明には、常法として用いられる細胞質におけるRNA干渉(RNAi)が有効でない。そこで我々の研究グループでは、これまでに核内RNAを高効率かつ特異的に機能阻害するノックダウン手法を開発した。このノックダウン手法では、様々なsnoRNA種、長鎖ncRNA、その他のncRNA種の高効率のノックダウンが可能であることがこれまでに確認されている。そこでこの手法を用いて、1)細胞周期依存的なヒストンmRNAの発現で、ポリA鎖を欠いたmRNA 3'末端形成に関わるU7 snRNA、2)ヒトの多発性内分泌腫瘍座位からの転写物であるMEN $\cdot\cdot$ ncRNA、3)標的が不明の複数の核小体低分子RNA(snoRNA)のノックダウンを実施し、それによって引き起こされる分子レベル、細胞レベルの変化を観察した。

2. 方法

2-1. 核内RNAノックダウン

アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞核内に効率良く導入して、標的RNAとDNA-RNAハイブリッドを形成させ、内在性のRNaseH活性によって標的RNAの分解を誘導する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、バックボーンにチオ化修飾を持ち、2' -O-メチルリボースを両側5ヌクレオチドずつ有し、デオキシヌクレオチドを中央10ヌクレオチド有する20 merのものを化学合成により合成した。アンチセンスオリゴヌクレオチドをHeLa細胞懸濁液と混合し、ヌクレオフェクションによって細胞核内に効率良く導入した。

2-2. ノックダウン効果の検証

ncRNAのノックダウンについては、リアルタイムPCR、ノーザンハイブリダイゼーション、RNaseプロテクションアッセイによってノックダウンの効率を検証した。ノックダウン効果の検証には、分子レベルでの遺伝子発現変動をアジレント社のマイクロアレイ解析(U7 snRNA)、細胞レベルの変化をPI染色のFACS解析による細胞周期変動の検出(U7 snRNA)、さらにin situハイブリダイゼーションによる細胞核内構造体の変化の検出(MEN α/β ncRNA)により行った。

3. 結果 研究成果

3-1. 核内ノックダウンによる各種核内ncRNAの機能阻害

ヒトのHeLa細胞を用いて、核内ncRNAのsnRNA, snoRNA, 長鎖ncRNAのそれぞれに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた核内ノックダウン法によってノックダウンを試みた。ノックダウン処理、24時間後の細胞からRNAを抽出し、RNaseプロテクションアッセイ、ノーザンハイブリダイゼーションで検出した。図1に示すように、snRNAとして分類されるU7 snRNA、

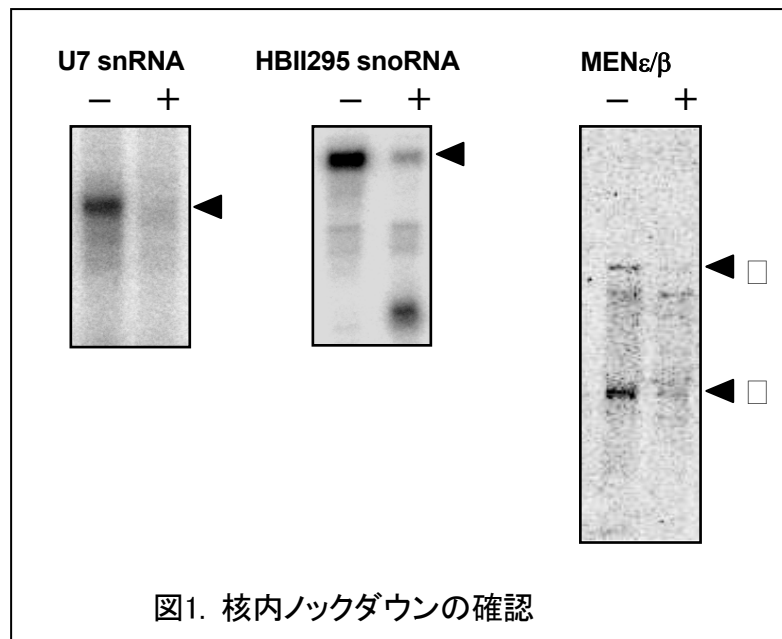


図1. 核内ノックダウンの確認

snoRNAとして分類されるHBII295、長鎖ncRNAとして分類されるMEN α/β ncRNAが、ノックダウン処理によって、著しく減少していることを確認した。この他に mismatchesを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用して、ノックダウン特異性の検定を行い、標的RNAに対して高い特異性でノックダウンできることを証明した。

3-2. U7 snRNAのノックダウンによる異常ヒストンmRNA種の出現と細胞周期遅延

U7 snRNAは細胞核内のCajal bodyに局在し、ヒストン遺伝子の発現に関わっている。ヒストン遺伝子は、真核生物において唯一ポリA鎖がないmRNAとして知られており、その代わりに特異なステム-ループ構造の3'末端を持っている。U7 snRNAには、細胞周期S期におけるヒストン遺伝子発現過程のmRNA 3'末端形成を司っていることが知られている(図2B)。しかしながら、このメカニズムは、in vitro系における解析、Xenopus卵母細胞へのマイクロインジェクション実験でのみ示されており、哺乳類の培養細胞株中の内生遺伝子においては、解析されていなかった。我々の核内ノックダウンによって、U7 snRNAを特異的にHeLa細胞から除去した際の遺伝子発現変化をマイクロアレイによって検出した結果、H1~H4すべてのヒストン遺伝子群の発現レベルが著しく上昇していることが検出された。

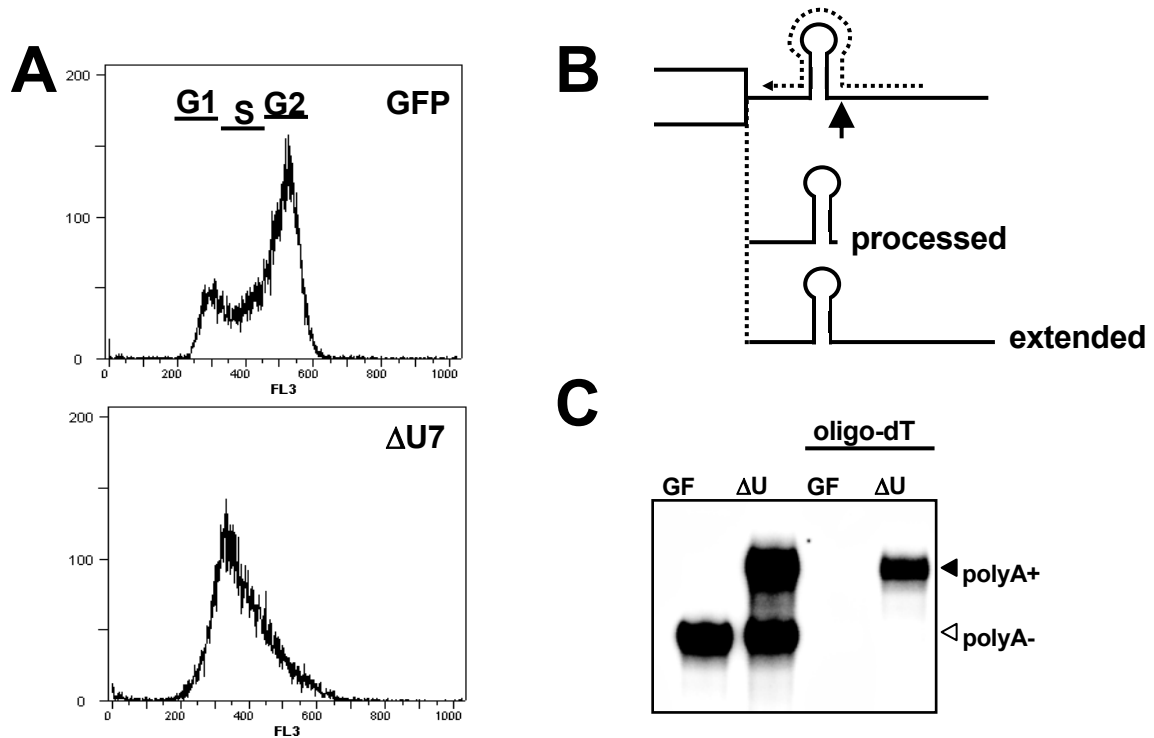


図2. U7 snRNAノックダウンの影響。A. FACSによる細胞周期遅延の検出。GFPはコントロールを表す。B. ヒストンmRNAの3' プロセシング模式図 C. RNaseプロテクションアッセイによる Δ U7細胞中の異常ヒストンmRNAの検出。Oligo-dTレーンには、polyA+ RNA画分を示す。

次にRNaseプロテクションアッセイによって、U7ノックダウン細胞におけるヒストンH2B mRNAの3'末端を調べたところ、通常の3'プロセシング部位よりも下流まで伸びたmRNA種が検出され、それがoligo(dT)選択によって濃縮されたことから、ポリA付加されたヒストンmRNA種が出現したことが明らかになった(図2C)。マイクロアレイ解析では、通常oligo(dT)プライマーのcDNA合成によってプローブを合成するので、ヒストン遺伝子群の発現が上昇した、と現れたこともこれで説明できる。次に、U7ノックダウン細胞の細胞レベルの変化をFACSによって解析した。G1/S期で細胞周期の進行をブロックした細胞に、アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入しU7をノックダウンし、その後細胞周期ブロックを解除し、細胞周期進行をモニターしたところ、U7ノックダウン細胞では、著しくS期の進行が遅延することが明らかになった(図2A)。さらに予期せぬ事に、G1/S期のブロック状態では、通常ヒストン遺伝子群の発現は低く抑えられているが、U7ノックダウン細胞では、ヒストンmRNAの蓄積が3~8倍程度に上昇していることが明らかになった。

3-3. MEN⁺ ncRNAは細胞核内構造体のコアとして機能する

核内長鎖ncRNAのMEN⁺は、機能不明のncRNAで3.7kb(●)と23kb(○)の二つのアイソフォームからなる。細胞分画によって、単離核をさらに3つのサブ画分に分画し、そこから調整したRNAを用いてncRNAの局在解析を行ったところ、MEN⁺はユニークな高密度画分に濃縮されることが明らかになった。そのため、このncRNAは、細胞核内の何らかの構造体に含まれていることが期待された。そ

ここで RNA in situ ハイブリダイゼーション (RNA-FISH) によって局在を調べたところ、二つのアイソフォームは共にパラスペックルと呼ばれる核内構造体に特異的に局在していることが明らかになった。次に上記核内ノックダウン法によって、この ncRNA をノックダウンしたところ、パラスペックル自体のシグナルが消失することが明らかになり、この ncRNA はパラスペックル構造の構造維持に必須であることが明らかになった。

4. 考察、まとめ

新たに開発した核内 RNA ノックダウンの手法は、解析が進んでいない核内 ncRNA の機能解析を推進する上で強力なツールとして用いられることが、今回の一連の解析で明らかになった。U7 snRNA については、これまでにヒストン mRNA の 3' 末端プロセッシングに関わることが明らかにされ、in vitro 系において分子レベルでのメカニズム解明がなされている。しかしこの 3' プロセッシング機構の重要性は、モデル鋳型を用いた解析に終始しており、内生遺伝子における役割の解析はなされていなかった。またこの機構の欠損によるヒストン遺伝子発現の変化が細胞に与える影響についても解析された例はない。我々の U7 ノックダウン細胞の解析によって、U7 snRNA の除去によって、in vivo でもヒストン mRNA の 3' 末端プロセッシングが著しく阻害されること、さらにそれに代わり、本来ほとんど存在しないポリ A 鎖が付加した mRNA 種が出現することが明らかになった。ヒストン mRNA へのポリ A 鎖の付加は、3' プロセッシングが非効率なことから、転写がさらに下流まで進み、そこに存在するポリ A 付加シグナル様の配列を利用してポリ A 付加が起こったものと推測できる。これらのポリ A 付加ヒストン mRNA は、通常の mRNA に比べてどのように異なる振る舞いをするのかについては、現在解析中である。さらにこれによって引き起こされる細胞周期 S 期の遅延がポリ A 付加されたヒストン mRNA の蓄積によるものなのかどうかとも併せて解析している。さらに驚くべき事に、U7 snRNA のノックダウンによって、通常ヒストン遺伝子発現の活性化が起こっていない G1/S 期での細胞周期ブロック状態のヒストン mRNA の蓄積量が著しく上昇することが明らかになった。このことは、U7 snRNA が、S 期外において、ヒストン遺伝子の発現を負に制御していることを示唆している。これまでに U7 snRNA が、転写因子の一つと相互作用している事を示す報告があるので、この転写因子機能を阻害することによって、S 期外でヒストン遺伝子の転写を負に制御していることが考えられる。この可能性は、S 期でのヒストン遺伝子発現の特異性を顕著にするための新しい機構として興味深い。

MEN β ncRNA は、多発性内分泌腫瘍座位から転写される長鎖 ncRNA でこれまでにその機能は明らかになっていなかった。今回の解析によって、この ncRNA が核内構造体パラスペックルの構造コアとして、パラスペックルの維持に必須であることが明らかになった(4)。パラスペックルは、6 年程前に発見された機能未知の核内構造体である。パラスペックルには、複数の多機能 RNA 結合タンパク質が局在していることが知られていたが、今回の ncRNA によるこの構造体の維持機構の発見によって、この構造体を介した新しい遺伝子発現制御機構あるいは局在 RNA 結合タンパク質の制御機構が明らかになることが期待される。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Cartegni, L. et al., Nat Rev Genet. 3: 285-298 (2002)
- (2) Yoon, A. et al., Science 312, 902-906 (2006)

(3) Caveille, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 14311-14316 (2000)

(4) Sasaki, YF. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2009) in press.