

## 研究テーマ

## エストロゲン受容体機能を制御する非コードRNAの解析

## 1. はじめに

最近、我々はcyclin D1プロモーターから転写される200～300塩基の非コード(nc)RNAが、転写を抑制する結果を得た(Wang et al., 2008)。このcyclin D1プロモーターncRNA(pncRNA)はRNA結合タンパク質TLSに結合して、CREB結合タンパク質CBP/アデノウイルスp300タンパク質のヒストンアセチル化酵素活性(HAT)を抑制して、転写抑制作用を示した。さらに、pncRNAがTLSと結合すると、エストロゲン受容体(ER)に結合する予備的結果を得た。この結果を受け、pncRNAがERの制御因子であることを示すことを目的とする。

## 2. 方法

GST沈降法および免疫沈降法で、シグナルはウエスタンブロット法で検出した。

## 3. 結果

大腸菌で発現したGST-ER $\alpha$ 断片と、FLAG-TLSを強制発現したHeLa細胞核抽出液による結合実験から、TLS(1-282)、すなわち、TLSのN末端側にER $\alpha$ が結合する結果を得た(図1)。

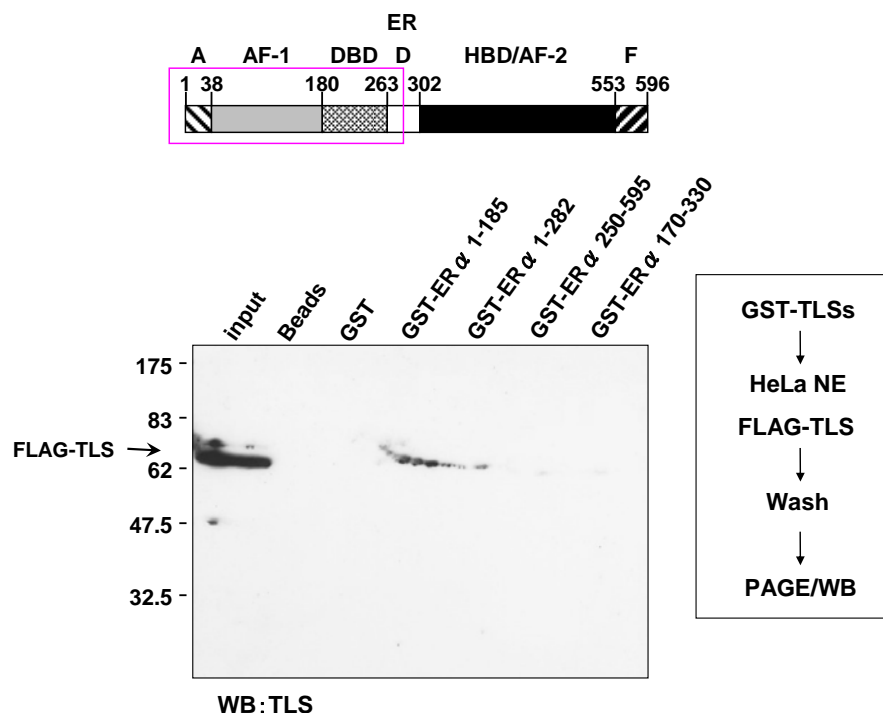


図1 TLS結合部位の同定

次に、GST-TLS 断片と、HeLa 細胞の内因性 ER $\alpha$ を用いた結合実験から、ER $\alpha$ は TLS の C 末端 (211-526)に結合することが示された(図 2)。

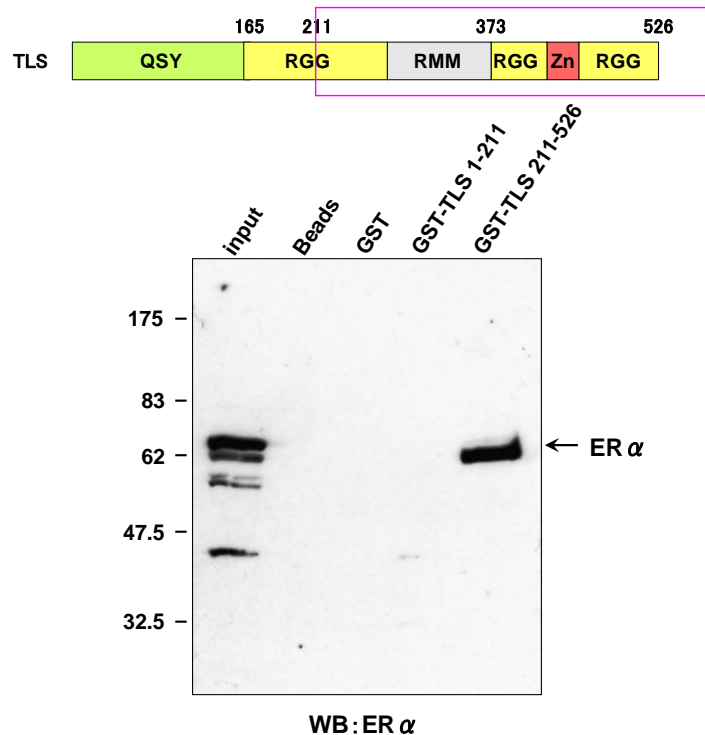


図2 ER $\alpha$ 結合部位の同定

FLAG-TLSをHeLa細胞で強制発現させ、FLAG抗体アガロースビーズで沈降させると、内因性のER $\alpha$ が結合していた(図3)。このTLS-ER $\alpha$ 複合体をRNA分解酵素で処理すると、TLSとER $\alpha$ の結合が阻害された(図3)。さらに、TLS-ER $\alpha$ 複合体をMNase処理して、EGTAで不活性化後に、cyclin D1-pncRNAを添加すると、ER $\alpha$ とTLS結合が回復した(data not shown)。この結果は、pncRNAと結合したTLSがER $\alpha$ と結合するには、pncRNAが必須であることを示している。

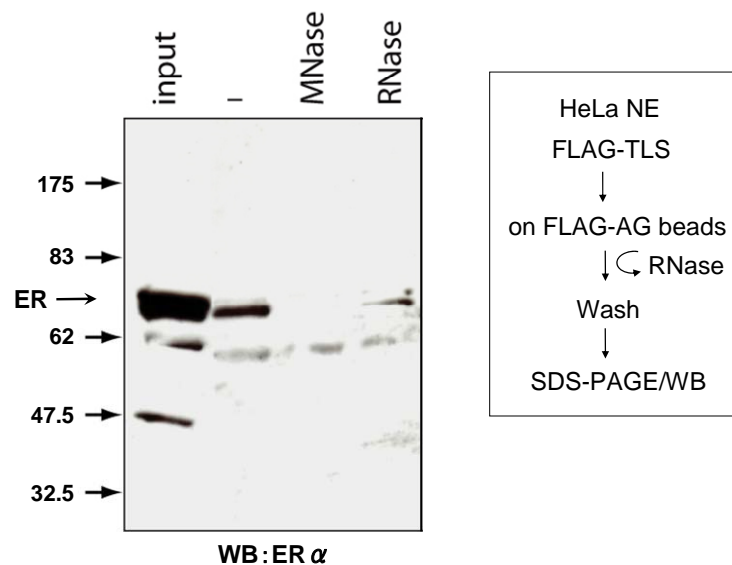


図3 ERとTLSはRNA依存的に結合

#### 4. 考察

TLS の ER $\alpha$  結合には、pncRNA が必須であった(図 4)。これは、pncRNA が ER 制御因子として機能することを示唆している。次は、pncRNA-TLS 複合体が ER $\alpha$  の転写を抑制することを in vitro と in vivo で検証する。一方、ncRNA が直接 ER に結合する可能性もある。実際、ステロイド受容体に RNA が結合する報告がある(Economidis and Rousseau, 1985)。そこで、ER に直接結合する ncRNA を探索し、その制御作用も検討したい。これらの結果は、急展開の ncRNA 研究に新たな方向性を提示し、核酸医薬研究にも新たな領域を開拓すると期待される。

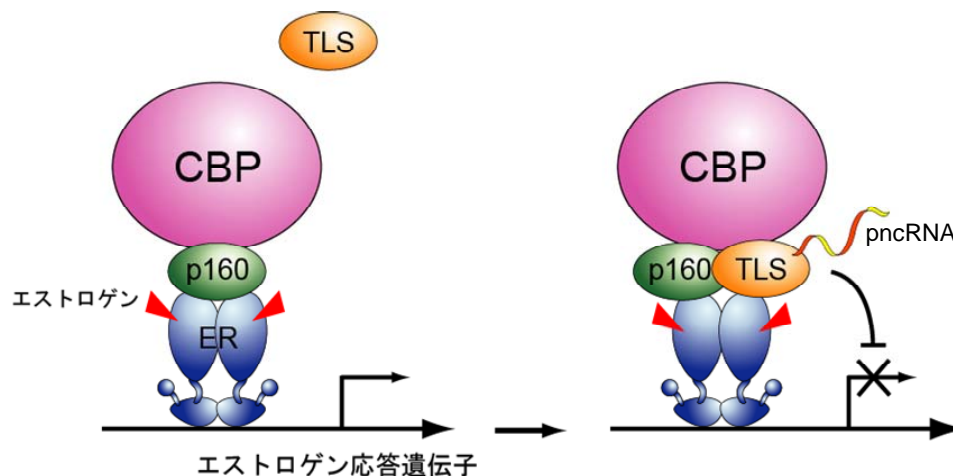


図4 プロモーター由来非コード(pnc)RNAによるER依存性転写の抑制機構

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 発表論文

1. Transcriptional regulation through noncoding RNAs and epigenetic modifications.

**Kurokawa R**, Rosenfeld MG, Glass CK. RNA Biology 6:233-236(2009)

##### 参考文献

1. Association of the glucocorticoid hormone receptor with ribonucleic acid.  
Economidis IV, and Rousseau GG. FEBS Lett 181:47-52(1985)
2. Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription.  
Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, and **Kurokawa R**. Nature 454:126-130(2008)