

研究テーマ

核内 non-coding RNA による細胞構造構築機構の解明

1. はじめに

今世紀に入り、大規模トランスクリプトーム解析によって、膨大な数のnon-coding RNA(ncRNA)の存在が明らかになった。しかしながら、ほとんどのものの機能は明らかになっていない現状である。一方で、ncRNAの種類数が生物種の複雑性と相関が見られるという状況証拠や、これまでに他の研究途上で偶然発見されたいくつかのncRNAがクロマチン活性制御や転写制御、蛋白質輸送制御などの重要な機能を果たしているという報告もある。よって近年発見されたncRNAの中には、全く新しい生理機能を果たすものや、それを支える巧妙な分子メカニズムが存在していることが期待できる。大多数のncRNAには、末端にキャップ構造とポリA鎖が存在することから、mRNA型の発現機構によって產生されることが推測されているが、我々のこれまでに細胞内局在解析によると、mRNAとは異なり、多くのものが核内に繫留されていることが明らかになっている。我々は核局在ncRNAを対象に、これらを効率良くノックダウンする解析系を開発し機能解析を進めてきた(1)。その結果、細胞核内のパラスペックルと呼ばれる核内構造体（核内ボディ）のコアとして、ボディの構造形成に必須なncRNAを発見した(2, 3)。このことは、ncRNAが細胞内構造の構築に指導的な役割を果たしている事を示しており、RNA機能、細胞内構造の双方で全く新しい観点を提供するものである。パラスペックルという核内ボディは、哺乳類の培養細胞の核内に共通して一細胞あたり10個程度存在するが、その機能については未だほとんど明らかになっていない。そこで今年度は、このパラスペックルというユニークな核内ボディが、ncRNAを中心に形成される構築機序を明らかにし、未だ不明なパラスペックルの生体機能を明らかにすることを目的として研究を実施した。

2. 方法

新しいパラスペックル蛋白質の同定には、産総研バイオメディシナル情報研究センターの五島研究室が保有するヒト完全長cDNAライブラリーリソースを利用し、Venus蛍光蛋白質との融合蛋白質の局在情報を基にパラスペックル様の核内構造体に局在する蛋白質を产生するcDNAクローンを選別した。個々のクローンをHeLa細胞に導入して観察されるドットが、内在性のパラスペックルマーカー蛋白質(PSF)と重なるかどうかを指標に判別を行った。第二の選別手段として実施した新規同定パラスペックル蛋白質の核小体傍への移行能の解析には、HeLa細胞を0.3μg/mLのアクチノマイシンDで24時間処理した細胞を用いた。パラスペックル蛋白質のノックダウンは、Invitrogen社のStealth siRNAを用いたRNAiにより実施した。RNAiによって引き起こされる影響の判別は、リアルタイムRT-PCRによるパラスペックルコアncRNA(MEN α/β)の定量解析と蛍光顕微鏡によるパラスペックル形状変化により執り行った。その他の基本的な操作は、発表論文を参照されたい(1, 2)。

3. 結果

3-1. 新規パラスペックル蛋白質の同定

ヒト完全長cDNAリソースを利用したヒト蛋白質の細胞内局在情報を基に、核内のパラスペックル様ドットの局在パターンを示すcDNAクローンを選別した結果、68種類のクローンを選別することができた。次にこれらを個別にHeLa細胞内に導入して局在パターンを確認し、同時にパラスペックルのマーカー蛋白質の内在性PSFとの免疫染色パターンとオーバーラップするかどうかを確認した。その結果、34種類のcDNAクローンが産生する蛋白質に正確なパラスペックル局在能があることが明らかになった。次に観察されたパラスペックル局在が、アーティファクトでないことを確認するために、第二の選別を行った。これまで知られているパラスペックル蛋白質は、すべてアクチノマイシンD処理によって、特異的にパラスペックルから核小体傍に局在変化することが知られている。この性質が、上記の34種類の蛋白質に備わっているかどうかを確認した。アクチノマイシン処理したHeLa細胞において34種類の蛋白質の局在を調べたところ、すべてが核小体傍に移行することが確認された。以上のことから、34種類の蛋白質を新規パラスペックル蛋白質として同定した(図1)。

34種類の内訳をみると、RRM, KH, ジンクフィンガーを持つRNA結合性タンパク質が大部分を占め、約1/3が癌などの疾患に関わるという報告があることが明らかになった。

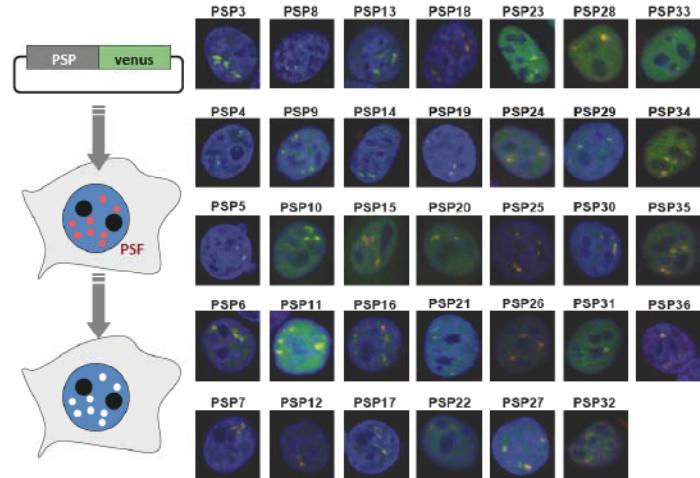


図1. 新規パラスペックル蛋白質の同定

3-2. ncRNAと新規同定蛋白質との共同作業によるパラスペックル構築機構の解析

これまでの我々の研究によって、既知のパラスペックル蛋白質(PSF, p54nrb)とMEN β ncRNAとの相互作用がパラスペックル構造構築に必須であること、そしてPSP1蛋白質は基本的な構造構築には必須ではないことを明らかにした(2, 3)。この結果によって、パラスペックルを構成する蛋白質は、コアとなるMEN α/β ncRNAとの相互作用の様式の違いにより、パラスペックル構築における役割が分担されていると考えられる。そこで新規に明らかにしたパラスペックル構成タンパク質のそれぞれがMEN α/β ncRNAの安定性保持にどのような影響を与えており、引いてはパラスペックル構造の維持にどのような役割を果たしているか解析を行った。その結果、MEN α/β の2つのアイソフォームの内、片方だけの蓄積に影響を与えるものを含めて、以下の5つのパターンに分けられることが明らかになった。1. MEN α/β の双方の蓄積に必須で、且つパラスペックル構築に必須のもの、2. MEN β の蓄積に必須で、且つパラスペックル構築に必須のもの、3. MEN α の蓄積に必須であるが、パラスペックル構築には必須でないもの、4. MEN α/β の蓄積、パラスペックル構築共に必須ではないがある程度必要なもの、5. MEN α/β の蓄積、パラスペックル構築共に必要ないもの。以上のことから、まず新規同定蛋白質によるMEN α/β の2つのアイソフォームを産生し維持するメカニズムが存在する事、MEN β の産生がパラスペックル構築に必須でMEN α は必須ではないこと、MEN α/β ncRNAを中心としたパラスペックル蛋白質の階層構造が存在することが示された。

3-3. パラスペックルと疾患との接点

前述の通り、パラスペックル構成蛋白質は、様々な疾患に関わるという報告がある。その中で、PSP4として同定された蛋白質は、FUS/TLSとしてこれまでに脂肪肉腫などの癌に関わることが報告されているRNA結合性タンパク質である。2009年初頭、米国の2つのグループがFUS/TLSの変異が難治性神経疾患の一つである家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となることを報告した。我々の解析によって、FUS/TLSがパラスペックルに局在し、MEN ϵ/β ncRNAの蓄積に影響を及ぼすこと(上記4にあてはまる)が上記解析で明らかになった。一方、これまでに家族性ALSの原因蛋白質としては、TDP43というRNA結合性タンパク質が知られていたため、TDP43の細胞内局在をパラスペックルマーカーPSFとの免疫共染色で調べたところ、TDP43が局在する核内ボディの中にパラスペックルが一部含まれることが明らかになった。次にTDP43のRNAiを行ったところ、FUS/TLSのRNAiの際と同様に、MEN ϵ/β ncRNAの蓄積量が40%までに減少し、パラスペックルが部分的に分散することが観察された。以上のことから、TDP43とFUS/TLSという2つの家族性ALSの原因蛋白質が共にパラスペックルに局在し、コアとなるncRNAの蓄積とパラスペックル構造維持に影響を与えていていることが明らかになった。

4. まとめ

哺乳類の細胞核内に存在するパラスペックルという機能未知な核内ボディを構成する34種類の新規蛋白質を同定した。これらの多くは、RNA結合性タンパク質であり、この核内ボディのコアとなるMEN ϵ/β ncRNAと直接あるいは間接的に相互作用することによって、この構造体構築に関わっていると考えられる。MEN ϵ/β の2つのアイソフォームの産生には、それぞれのアイソフォームを選択的に産生し維持する蛋白質因子が存在することが明らかになった。このうちパラスペックル構造構築には、MEN β が必須でありMEN ϵ は必要ないことも明らかになった。パラスペックルを構成する蛋白質には、様々な疾患に関わる因子が含まれており、最近報告された家族性ALS原因蛋白質の3種類のうち、2種類までもがパラスペックルに局在し、MEN ϵ/β ncRNAの蓄積とパラスペックル構造構築に影響を与えていることが示された。パラスペックルは、ncRNAを中心にこうしたRNAレベルの制御因子を集約し、核内での各因子の機能をモジュレートする役割を果たしていることが推測できる。さらにその制御因子が様々な疾患にリンクしていることも明らかになった。今後のncRNAによる各因子の制御機構の解明によって、ncRNAの新しい機能概念の確立と共に、疾患発症機構の解明にもつながることが期待できる。

5. 発表論文

- (1) Ideue, T., Hino, K., Kitao, S., Yokoi, T., Hirose, T. Efficient oligonucleotide-mediated degradation of nuclear noncoding RNAs in mammalian cultured cells. *RNA* 15:1578–1587 (2009)
- (2) Sasaki, Y.T., Ideue, T., Sano, M., Mitsuyama, T., Hirose, T. MEN ϵ / β noncoding RNAs are essential structural components of nuclear paraspeckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 2525–2530 (2009)
- (3) Sasaki, YT., Hirose, T. How to build paraspeckles? *Genome Biol.* 10, 227.1–227.5 (2009)