

胚性致死を引き起こす非コードRNAの作用機構

北海道大学 大学院薬学研究院 RNA 生物研究室
栗原美寿々

<背景>

ヒトやマウスをはじめとする高等真核生物のゲノムは多くの反復配列を保持している。反復配列はレトロトランスポゾンのようにゲノム上にランダムに散在する散在反復配列と、セントロメアやテロメアのサテライト配列のように、ゲノムの特定の領域でタンデムリピートを形成する非散在反復配列に大別される。散在反復配列は、遺伝子領域に挿入されることでターゲット遺伝子を直接破壊することや、非遺伝子領域に挿入されることで、新規プロモーターを付与するなどゲノムの進化過程で重要な役割を果たしてきたことが知られている。一方、非散在反復配列に関しては、マウスにおいて少なくとも60種類以上が知られているが、大多数の機能は不明で、個体レベルでの機能解析の報告はほとんど存在しない。

4.5SHクラスタは齧歯類の中でも小型で世代時間の短いネズミ目ゲノムに特異的に見られる非散在反復配列で、マウスでは6番染色体上で4.2 kbのユニットが約200コピー並んだ全長約900kbの巨大タンデムクラスタ配列を形成している(図1)。4.5SHクラスタの生理機能を明らかにする目的で、4.5SHクラスタ全領域を欠失する変異マウスの作製したその結果、4.5SHクラスタ変異マウスは着床直後に致死となることが明らかとなった (Yoshimoto et al. under review) (図2)。このことから、これまでゲノム上のダークマターであった巨大タンデムクラスタが生理的に重要な機能を担う配列である可能性が示された。

図1. 小型齧歯類特異的な4.5SHクラスタ

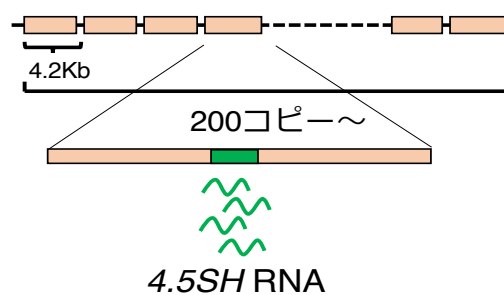
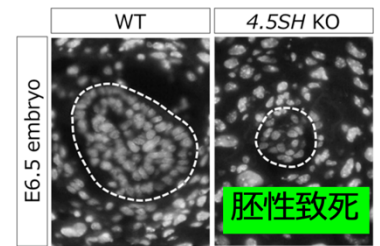


図2. 4.5SHクラスタ欠損マウスは胚性致死となる

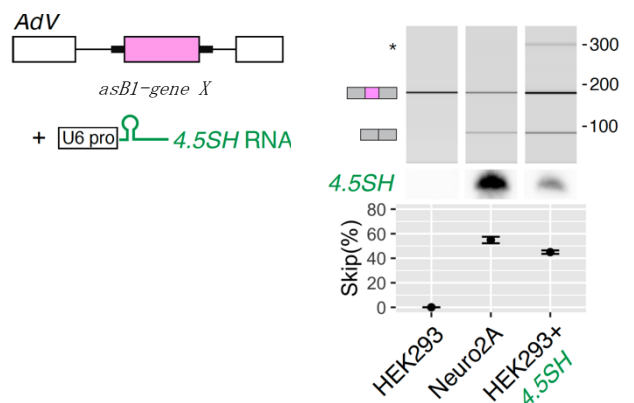


<結果と考察>

1) 4.5SH RNAについて

4.5SH RNAは、4.5SHクラスタから多量に転写される非コードRNAであり、レトロトランスポゾンのSINE B1に似た配列から構成される (Ishida et al. Genes Cells, 2015)。そこで、本研究では4.5SH RNAの生理機能について解析を行うため、本クラスタを欠損したES細胞を作成しトランスクリプトーム解析を行なった。その結果、4.5SH ES欠損細胞では、野生型では転写されないexonや、新たにexon化した配列を含んだ転写産物が多数出現することが判明した。これらの異常exonの出現により正常なタンパク質の合成が妨げられ、胚性致死となることが予想された。さらに、これらの異常exonの配列を解析した結果、その多くがアンチセンス方向のSINE B1配列(asB1)を有することが判明した。

図3. 4.5SH RNA 依存的にターゲット遺伝子の exon skipping が誘導された



ヒトの培養細胞において、4.5SH ES欠損細胞において新たにexon化したasB1配列を含む遺伝子と、4.5SH RNAを共に導入したところ、4.5SH RNA依存的にexonスキッピングが引き起こされていることが判明した(図3)。そこで、4.5SH RNAによるexonスキッピングに関わる分子を明らかにするため、4.5SHの配列の一部を使ってRNA pull downを行ったところ、4.5SH RNAはA, B, Cといったタンパク質と相互作用することが判明した(図4)。これらのタンパク質をノックダウンすると、4.5SH RNA存在下でもexonスキッピングが減少した。以上の結果から、4.5SH RNAはこれらのタンパク質と協調的に働くことで、アンチセンス方向のSINE B1がexon化するのを防いでいることが明らかとなった(図5)。(Yoshimoto et al. under review)

図4. 4.5SH RNAはタンパク質A,B,Cと特異的に相互作用していた

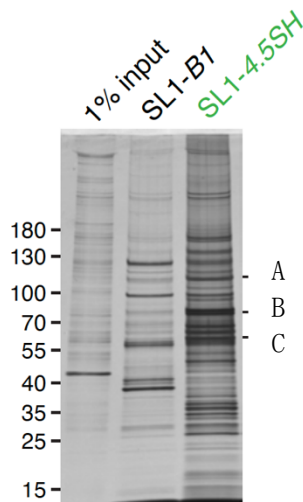
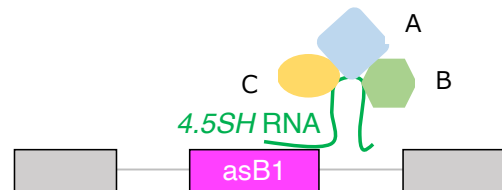


図5. 4.5SH RNAはタンパク質A, B, Cと相互作用することで、asB1のexon化を防いでいる



2) lincRNA4.5SHについて

解析を進める過程で、4.5SH クラスタからは新たな非コードRNAである lincRNA 4.5SH が転写されていることが判明した。本研究ではこの非コードRNAについても解析を行った。lincRNA 4.5SH は4.5SH RNA と異なり、4.5SH クラスタ近傍に局在し、何らかのタンパク質よって覆われていることがRNA FISHによって明らかとなった(図6)。また、4.5SH 欠損細胞を用いたトランスクリプトーム解析の結果、4.5SH 欠損細胞では4.5SH クラスタが位置する6番染色体の転写が野生型と比べて上昇していることが判明した(図7)。そこで、4.5SH 欠損細胞の6番染色体の本数を確認したところ、4.5SH クラスタを欠損したどのクローンにおいても6番染色体がトリソミー化していることが明らかとなった(図8)。これまで、ES細胞において8番染色体がトリソミー化しやすいことは多く報告されているが(Kim et al. Mole. Cytogenetic, 2013)、6番染色体については調べた限り報告はない。従って、4.5SH クラスタの欠損が6番染色体の安定性に影響を与えた可能性が示唆された。

図6. lincRNA4.5SHはProteinase Kによるタンパク質除去を行うとRNA FISHによってシグナルを観察することができた

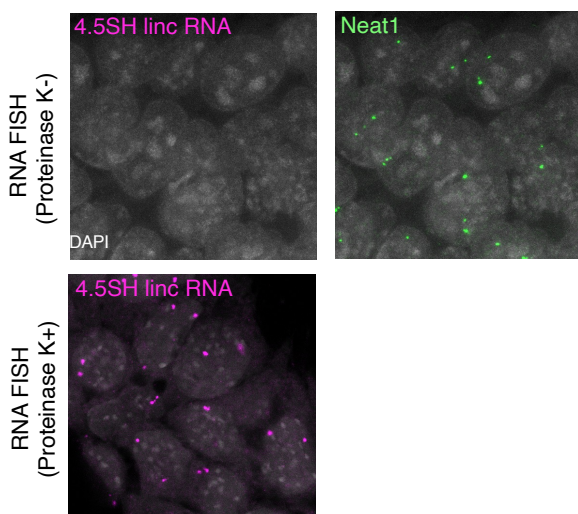
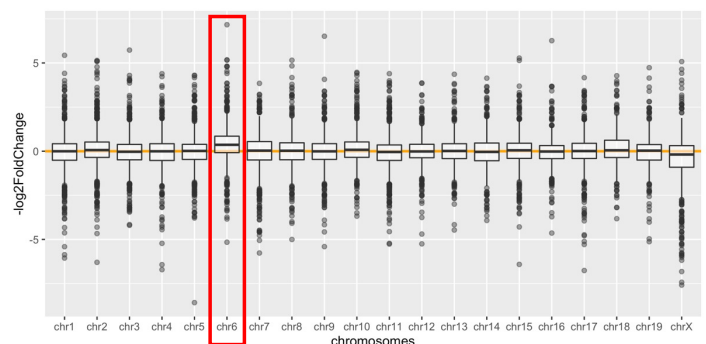
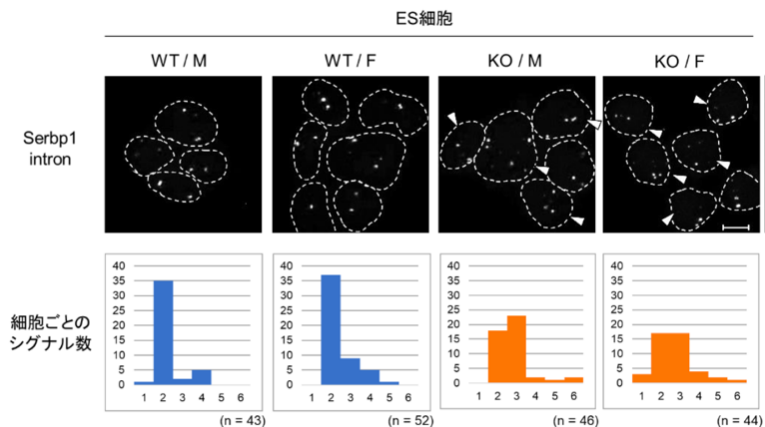


図7. 4.5SH クラスタ欠損細胞では6番染色体の転写量が上昇していた



そこで、4.5SH クラスタが野生型の細胞においてどういったゲノム領域と相互作用するかを 4C 法によって調べた。その結果、4.5SH クラスタは 6 番染色体の多くのゲノム領域と相互作用することが明らかとなった。このことから、4.5SH クラスタは、lincRNA 4.5SH を介してタンパク質や DNA を含んだ複合体を形成し、6 番染色体の安定に寄与する可能性が考えられた。今後は、本仮説を証明するため、lincRNA4.5SH と結合するタンパク質の同定や、4.5SH クラスタの染色体安定性への寄与など多角的に検証を行っていく。

図 8. 4.5SH クラスタ欠損細胞では 6 番染色体がトリソミー化していた



<謝辞>

本助成をいただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会の皆様へ深く感謝いたします。また 北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物のメンバーの方々、特にご指導いただいた中川真一教授、本研究の推進に中心的な役割を果たして頂いた摂南大学の芳本怜講師に深く感謝の意を表します。