

疾患関連非コードRNAと結合タンパク質の機能的相互作用部位の解析

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
廣瀬 哲郎

1. はじめに

今世紀に入り、ヒトゲノムの90%以上の領域から非コードRNAが産生されていることが明らかにされた。これら非コードRNAの大部分は、未だ機能が明らかではないが、哺乳類の高次生命現象や疾患の発症に深く関わっていることが示唆されている。例えばHotairという非コードRNAが、エピジェネティックなリプログラミングを通して癌転移能の獲得に関わることが報告され、今後このような非コードRNAの重要機能が次々と明らかになると期待される。非コードRNAは、単独で機能する訳ではなく、タンパク質とRNP複合体を形成している。そこで、機能未知の非コードRNAの機能へのアプローチ法として、相互作用タンパク質を探索することが有効である。相互作用タンパク質の同定には、RNP複合体を精製して構成成分を同定することが王道であるが、非コードRNAの大部分は微量なため、精製を経るアプローチは困難な場合が多い。そこで申請者は、これまで自身の非コードRNA解析で有効性が確認されたRNA結合タンパク質の網羅的機能抑制系を用いて、疾患に関わる非コードRNAの蓄積に影響を与える因子の同定を目指す。さらに特異的なRNA上のタンパク質結合領域を特定する方法を独自に至適化して、機能的なRNA-タンパク質の相互作用情報を獲得することを目標とする。

2. 方法

エピゲノム制御に関わる非コードRNAの合成や安定性に関わるRNA結合性タンパク質を同定するために、RNA結合性タンパク質のミニRNAiライブラリーを構築した。RNAiライブラリーは、RRMやKHなどのRNA結合モチーフを有するタンパク質の中から、細胞核内に局在していることが分かっている196種類のタンパク質を標的とした。

RNAiはLifeTechnologyのStealth siRNAを用いた。siRNA導入はLifeTechnologyのLipofectamine RNAiMaxを用いて常法通りに行い、導入siRNAが効果的に働いていることを各転写産物のqRT-PCR及びウェスタンブロットニングによって確認した。疾患への関与が報告されているMalat1, Hotair ncRNAの蓄積レベルに影響を与えるRNA結合タンパク質を、siRNA導入細胞由来のRNAを用いてqRT-PCRによって探索した。

Hotair ncRNA 3'プロセッシング部位の詳細な解析は、RNaseプロセクションアッセイ、3' RACE法によって執り行った。RNaseプロセクションアッセイは、Hotair ncRNAの3'末端をまたいだ領域を含む³²P標識のアンチセンスリボプローブを用いて行った。

3. 結果

3-1. 疾患関連非コードRNAの発現レベルを制御するRNA結合因子

196種類のRNA結合タンパク質のRNAiライブラリーを用いて、疾患関連非コードRNA (Hotair, Malat1)の蓄積を変動させるタンパク質を探索した。コントロールとしてGAPDH mRNAを用いた。本報告書では、Hotairに関する解析結果を報告する。図1に示すように、RNAiによってHotair ncRNAの蓄積量が著しく減少する因子を複数見いだした。その後、コントロールGAPDH mRNAレベルの変化や同一タンパク質に対する別配列siRNAによる検証実験などによって、確実にHotair ncRNA量を減少させるタンパク質を2種類(HTAR1, 2)見いだした。

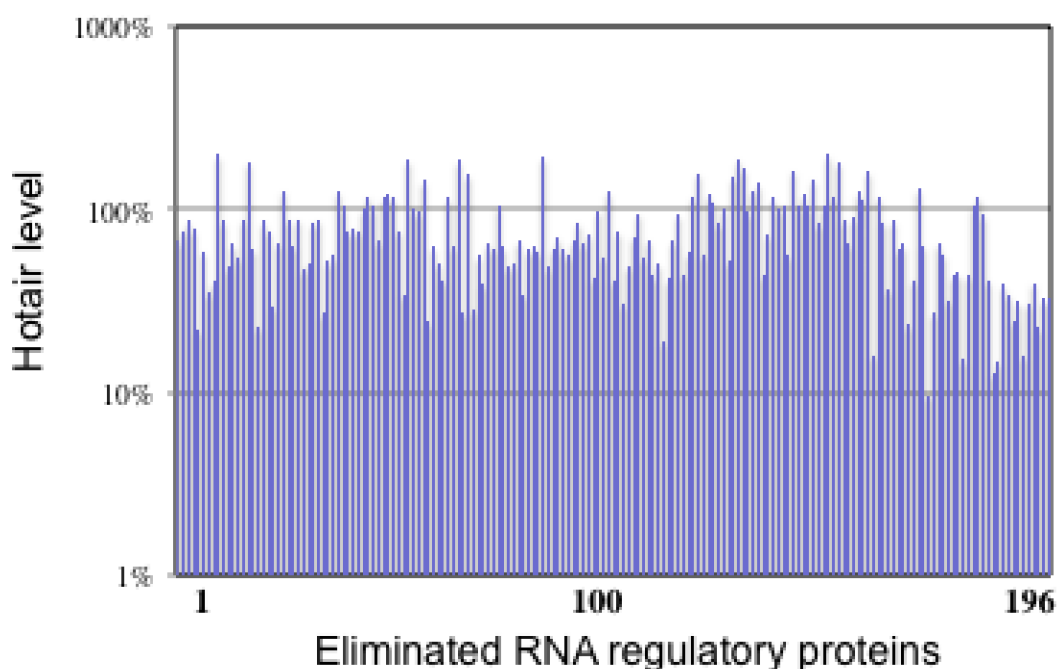


図1. 疾患関連 ncRNA の蓄積を制御する RNA 結合タンパク質の解析。

3-2. 疾患関連非コードRNAの3'プロセッシング制御

HTAR1, 2は、ヘテロダイマーを形成して一群のmRNA 3'ポリA付加制御に関わっていることが知られているため、Hotair ncRNAの3'末端プロセッシングに関わるかどうかを検討した。その結果HTAR1,2は、共にHotair 5'末端から2.3kb部位の報告済の3'末端形成を強く促進することが明らかになった。HTAR1,2をRNAiによって機能抑制したところ、Hotairの3'末端は約1.1kb部位にシフトすることが明らかになった(図2)。ESTデータベース情報を精査すると、シフトした1.1kb部位の3'末端が選択されたHotair転写物が、RNAi処理を施さない細胞でもある程度の量存在することが明らかになった。このことからHotairには、2つのアイソフォームが存在することが明らかになった。そこでRNaseプロテクションアッセイによって、2つのアイソフォームの存在比率を測定したところ、HeLa細胞ではlong form (L: 2.3kb)とshort form (S: 1.1kb)の比率が5:1であることが明らかになった(図2 レーンCt)。またHTAR1,2をそれぞれRNAiによって機能抑制すると、その比率は1:1になることも観察された(図2)。これによってHotairが、発現の量的制御

以外に、3'末端の選択によって質的な制御を受けていることが示された。

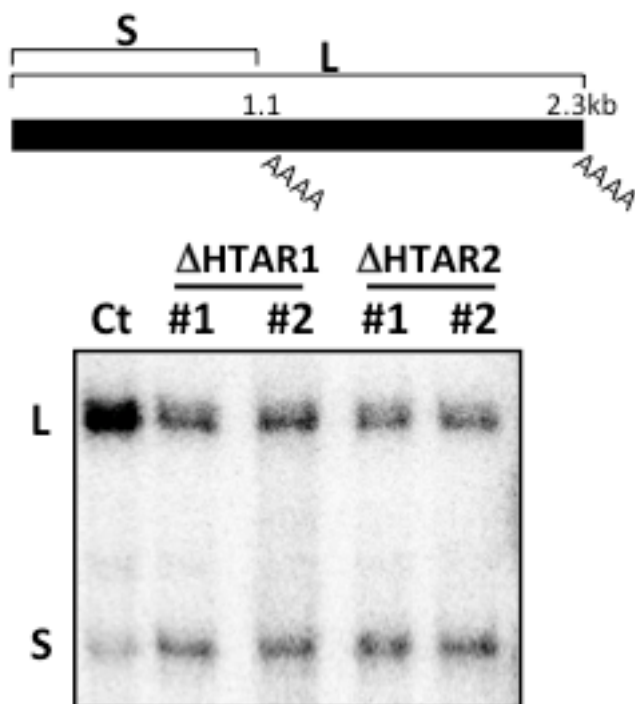


図2. 疾患関連 ncRNA の新規アイソフォームの同定。

L, S アイソフォームの模式図を上部に示す。RNase プロテクションアッセイによるアイソフォームの定量を下部に示す。HTAR1,2 それぞれについて2種類の siRNA(#1, #2)を用いて RNAi を行った。

3-3. 疾患関連非コードRNAの3'プロセッシング制御の重要性

3'末端部位の変化がHotairの機能に影響するかどうかを検証するために、Hotair機能を通じた発現抑制が報告されているHoxD8のmRNAレベルをqRT-PCRによって定量した。その結果、HTAR1,2のRNAiによってHotair ncRNAの3'末端が上流にシフトした細胞では、HoxD8 mRNA量が1.8倍程度に上昇することが明らかになった。このことは、Hotairの3'末端変化によって標的遺伝子の抑制能が低下したことを示している。

4. 考察

Hotairは、2つのエピゲノム制御複合体(PRC2とLSD1)と結合し、これらの複合体を特定のゲノム領域に協調的にリクルートする役割を果たすと考えられている。我々が見いだしたShort isoformは、報告されたLSD1の結合領域を欠いている。つまりHotairによる2つの複合体の協調的制御が失われると考えられ、これによって標的遺伝子のエピゲノム制御が変化する可能性がある。Hotairは、異常発現亢進によって乳癌などの複数の癌の転移能獲得に関わることが報告されている。本研究によって、こうした量的変化だけではなく、アイソフォーム比率の質的変化が、Hotairによるエピゲノム制御パターンをさらに複雑している可能性が浮上した。今後この質的変動を様々な癌においてモニターし、癌の悪性化に関係する新規な制御機構を見出したいと考える。