

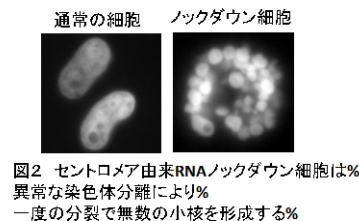
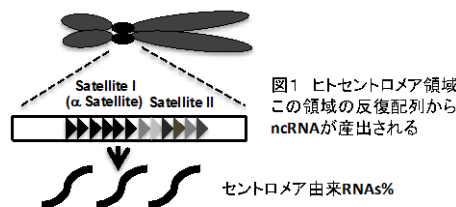
セントロメア由来 RNA による染色体分離制御の解析

熊本大学大学院 自然科学研究科
井手上 賢

1. 序論

がんを克服する手段を探索するにあたり、がん細胞で高頻度におこる染色体分離の異常と、その結果生じる染色体の異数化メカニズムを知ることは、新たな突破口になりうると思われる。染色体の分離過程は複雑かつ厳密に制御されており、この仕組みの中でも分離装置であるキネトコアの形成されるセントロメア領域は、重要な役割を担っていると考えられるが、その複雑な構造ゆえ、この領域において行われている制御の全体像はいまだ明らかでない。セントロメアは染色体上において分裂装置キネトコアが形成される重要な領域である。ヒトにおいてこの領域は、Satellite 配列と呼ばれる 171 nt を 1 単位とした繰り返し配列の並ぶ特徴的な構造をとっている。この反復配列の生物学的意義は不明だが、この領域からは RNA (Satellite RNA) が転写されることが明らかとなり (図 1)、セントロメア機能に何らかの関与することが推測されている。この Satellite RNA を、アンチセンスオリゴ (ASO) によりノックダウンした HeLa 細胞は、葡萄房様小核と呼ばれる無数の小核を生じる表現型を示した (図 2)。タイムラプス解析により、この表現型は、凝集後の染色体が赤道面にうまく整列せず、分離が出来なくなり、その後染色体分離がおこらないにもかかわらず、各々の染色体が脱凝集した結果生じることが明らかとなった。この結果はセントロメア領域から産出される Satellite RNA に、染色体分離を制御する役割が有ることを示している。

本研究では、セントロメア領域で行われる染色体分離に必須な制御において、この領域から転写されるノンコーディング RNA が、正しい染色体分離を制御するメカニズムを解明することを目指した。



2. 方法

各種ノックダウン、ウエスタン解析、免疫染色：セントロメアRNAのノックダウンは、HeLa細胞に対し、アンチセンスオリゴ (ASO) を、200 nMの濃度で48時間おきに2回、Lipofectamine2000 (LifeTech) を用いてトランスフェクションした。Aurora B, RBMXのノックダウンは、siRNAを 40 nMの濃度で48時間おきに2回、Lipofectamine2000 (LifeTech) を用いてトランスフェクションした。抗Aurora B抗体、抗リン酸化型Aurora B抗体、抗HistoneH3抗体、抗リン酸化型HistoneH3抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。また抗Aurora B抗体、抗CENPB抗体を用いて免疫染色実験を行った。

免疫共沈：HeLa細胞を二重チミジンブロック法およびNocodazol処理により分裂期に同調した。分裂期に同調したHeLa細胞から、抗Aurora B抗体を用いて免疫共沈を行い、共沈産物からRT-PCRによりSatellite I RNAを検出した。

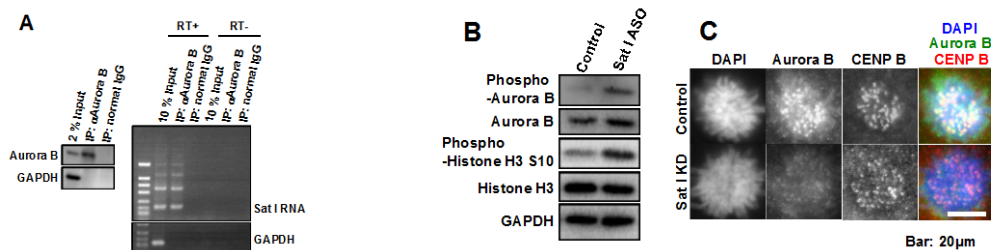
Satellite I RNAプルダウン：未処理のHeLa細胞ならびに分裂期に同調したHeLa細胞から、ビオチンを付加したアンチセンスオリゴを用いてSatellite I RNAプルダウンした。プルダウンサンプルをSDS-PAGEで展開、銀染色した後にバンドを切り出し質量分析にて、Satellite I RNA結合因子を決定した。

Satellite I RNAノックダウン細胞の増殖：Histone H2A-GFP発現HeLa細胞を用いてSatellite I RNAノックダウンを行い、48時間にわたり、5分おきに細胞を撮影した。またコントロールおよびSatellite I RNAノックダウン細胞の、細胞増殖と生存率を、96時間にわたって計測した。

3. 結果

AuroraキナーゼBは、分裂期に特異的に高発現するキナーゼで、染色体分離のキー因子と考えられている。実際にAuroraBをRNAiによりノックダウンすると、Satellite I RNAノックダウン時と同様な葡萄房様小核が出現することから、AuroraBとSatellite I RNAの間に、染色体分離機構に関連する何らかの機能的相関があると考えた。免疫共沈実験により、このAuroraキナーゼBがSatellite RNAに結合することが明らかになった（下図A）。

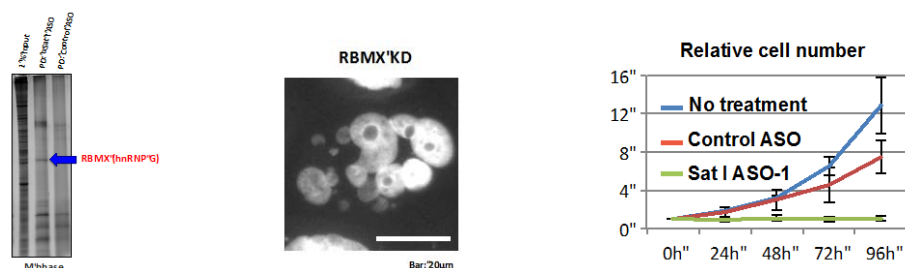
Satellite RNAのノックダウン細胞において、自己リン酸化型のAuroraB量が亢進していた。これはAuroraBのリン酸化活性が上昇していることを示している。この際AuroraBの基質の一つであるHistoneH3のリン酸化状態も亢進していた（下図B）。分裂時においてAuroraBは凝集した染色体上もしくはセントロメア領域に局在するが、RNAノックダウン細胞ではこの局在が消失した（下図C）。これらの結果はAuroraBのリン酸化活性と染色体上への局在の両方がSatellite RNAに制御されていることを示している。



Satellite RNPの構成成分の同定を目的に、Satellite RNAに対するアンチセンスオリゴを用いたプルダウンを試み、インタクトなRNPの精製に成功した。プルダウンにより回収された結合因子を質量分析した結果、複数のRNA結合因子と、細胞周期関連因子を構成成分候補として同定した。興味深いことに分裂期と間期では結合する因子が異なり、細胞周期に依存してRNPの構成が変動することが示唆された。

質量分析の結果、分裂期にSatellite I RNAに結合する因子として同定したRBMX / hnRNP Gについて（下図左）さらに解析を行った。この因子は分子内にRNA結合モチーフ（RRMドメイン）を複数持つ因子であった。実際に抗RBMX抗体を用いて免疫共沈実験を行ったところ、Satellite I RNAが共沈してきたことから、RBMXはこのRNAに結合すると判断した。RBMXは細胞周期を通して発現が認められたが、間期においてはSatellite I RNAとの結合が見られないことから、RNAとの結合は細胞周期に特異的、分裂期特異的であると言える。RBMXをRNAiによりノックダウンしたところ、Satellite RNAおよびAurora Bノックダウン時と同様の葡萄房様小核が出現したことから（下図中）、この因子も染色体分離への何らかの関与が推測された。

Satellite I RNAをノックダウンしたHeLa細胞は著しい増殖阻害を示したことから（下図右）、このRNAのノックダウンが抗がん戦略の選択肢の一つになりうる可能性を持っていることが示された。



4. 考察

Satellite I RNAはヒト染色体のセントロメア領域から転写されるノンコーディングRNAである。FISH解析により、このRNAは転写後もセントロメア領域に局在するものと考えている。Satellite I RNAのノックダウン細胞の表現型が、染色体分離のキープクターとして知られるAurora Bのノックダウンのそれと同様だったことから、両者の関連を調べた。その結果、Aurora BがSatellite I RNAに結合すること、それによりAurora Bはセントロメア領域への局在と、正確なリン酸化活性をコントロールされていることを見出した。Aurora Bを染色体ならびにセントロメア領域へとリクルートする仕組みには、特異的なHistone修飾が知られているが、今回申請者が見出した知見は、RNAもまたAurora Bの局在メカニズムに組み込まれているという新しい知見を示すものである。

AuroraBは染色多分離のキー因子とされることから、有望な抗がん戦略のターゲットとして、その阻害剤の開発が進められている。その多くはAuroraBのATP結合部位をブロックしリン酸化活性の阻害を狙ったものである。今回我々が示したセントロメア由来RNAのノックダウンは、AuroraBのリン酸化活性を異常亢進し、また染色体局在を不能とすることで、その機能を阻害する。これは従来型のAuroraB阻害剤とは異なる作用点によりAuroraBを抑制するもので、抗がん戦略のバリエーションを拡げることが可能である。

今回、Satellite RNAに結合する因子として新規に同定したRBMXは、RNA結合モチーフを持ち、mRNAスプライシング等に関与すると考えられる因子である。染色体分離に関連する機能が有るか否かはこれまで報告されていないが、ノックダウン細胞が葡萄房様小核の表現型を示すことから、この制御に関わる可能性は十分に推測される。Satellite RNAに結合することで染色体分離に作用する因子は、今回解析したAuroraBやRBMXの他にも存在すると考えられ、Satellite RNAプルダウンから同定された結合因子の機能解析により、さらなる制御因子の同定が見込まれる。

本課題で示されたSatellite I RNAの染色体分離制御における知見は、これまで構築されてきた染色体分離の制御機構に、ノンコーディングRNAという新たな役者が組み込まれていることを示すものである。またSatellite I RNAのノックダウンによりHeLa細胞の増殖を著しく阻害することが出来ることから、抗がん剤としての可能性に期待している。今後、各種正常細胞ならびにがん細胞に対する効果など検証していきたい。

5. 発表論文等

投稿中論文

1. **Involvement of satellite I RNA associating with Aurora B in regulation of chromosome segregation.**
Takashi Ideue, Yukiko Cho, Kanako Nishimura and Tokio Tani.

特許出願

1. 染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディングRNAを標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法。 発明者：谷時雄 井手上賢 出願人：熊本大学
国際出願 出願番号：JST/JP2013/069541 出願日 2013, 7, 18

2. 染色体セントロメア由来のサテライトノンコーディング RNA を標的とした核酸抗癌剤、及び該抗癌剤を用いる方法。 発明者：谷時雄 井手上賢 出願人：熊本大学
特願出願 2013-4705 平成 25 年 1 月 15 日