

「RNA と生体機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成23年度終了研究課題－

研究総括 野本 明男

1. 研究領域の概要

本研究領域は、RNA 分子の多様な機能を明らかにし RNA の生命体維持に関する基本原理についての理解を深めると同時に、RNA 分子の医療応用等に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術シーズの創出を目指している。

具体的には、生命現象を支え制御する RNA の新たな機能を探索する研究、および既知の RNA 機能の活用を目指した研究が対象である。後者の研究には、機能性 RNA のデザインや機能向上を目指す技術、機能性 RNA により細胞機能を制御する技術、1分子レベルで特異的 RNA を検出する技術、RNA を標的組織・細胞に送達するドラッグ・デリバリー・システム技術などに関するものが含まれ、先端医療技術等への機能性 RNA 分子の新たな活用技術の開発へとつながることが期待される研究が対象となる。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記のとおり。

- 1) 選考は「RNA と生体機能」領域に設けた選考委員 11 名と研究総括で行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 面接選考においては、申請者の研究の主体性、研究のねらい、研究計画の妥当性、将来性等を中心に審査する。研究構想が本研究領域の趣旨に合っていること、高い独創性と新規性に富むことを重視する。長い歴史を持つ RNA 研究の新展開には、これまでの伝統的研究を大切に生かしつつ、新しい視点を大胆に取り込む姿勢を重視する。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3 名が書類審査を担当、評価を行い、この評価と研究総括の評価をあわせて書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考会での評価および総合選考により採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	84 件	20 件	9 件

備考:

- 1) 平成 20 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価を実施しない。
 ・西村芳樹研究者
 内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」への採択に伴い、同プログラムの規定により平成 23 年 3 月末をもって研究を終了したため。

5. 研究実施期間

平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

6. 領域の活動状況

- 1) 領域会議: 7 回
- 2) 研究報告会(公開): 1 回
- 3) 研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が研究者とその上司を訪問した。上司にさきがけ研究の趣旨を説明、納得してもらい、研究実施にあたっての協力を依頼した。研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、研究実施に支障がないことを確認した。事務的な手続きについての説明もおこなった。

さらに、3年目を迎える研究者を技術参事が訪問し、研究の進捗状況についての研究総括からのメッセージを伝えると共に、今後2年間の目標、問題点と課題などを話し合い、結果を研究総括に伝えると共に領域運営の参考とした。その他、研究者の異動時には研究総括以下のサイトビジットを再度実施した。

7. 評価の手続き

研究者による研究報告書と自己評価を基に、研究総括が領域アドバイザーの協力を得ながら実施した。領域会議での討議や研究報告会の参加者の意見も参考にした。

(評価の流れ)

平成 23 年 12 月	研究報告会開催
平成 24 年 2 月	研究報告書提出
平成 24 年 3 月	研究総括による評価
平成 24 年 3 月	研究期間終了

8. 評価項目

- (1) 研究計画書の目標と研究課題に対する達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、プレスリリースと特許などから見た研究成果と発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事など外部からの評価状況
- (4) 達成した研究成果の科学、技術、社会への貢献度

9. 研究結果

近年になり、リボザイム、miRNA、RNA の分子擬態、その他多くの機能性 non-coding(nc)RNA の発見により、RNA は蛋白質と同等の機能を持つ分子でもあると認識されるようになってきた。今や RNA は、遺伝情報発現や代謝の制御に働く必須の分子であると同時に、発生、分化、疾患の発症など高次複合形質の動態にも深く関与していることが明らかであるが、その研究は緒についたばかりともいえる。

本研究領域では、生命現象における RNA の新たな機能を探索する研究を対象とすると共に、明らかとなっている機能性 RNA を活用し、医療応用等を含めた RNA テクノロジーに関する研究を対象として幅広い研究課題が採択されている。広範な専門分野の研究者間やアドバイザーとの切磋琢磨および協調した研究推進により著明な進展が各課題にみられた。研究者毎に研究のねらい、結果および評価を以下に述べる。

○黒柳 秀人 研究者

「mRNA選択的プロセッシングを制御する細胞暗号の解明」

本研究では、細胞の種類や発生段階に応じて、mRNA 前駆体がそれぞれ特異的・選択的にプロセッシングされるための制御機構の実態解明を目指した。モデル生物として線虫を用い、当研究者らが開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を応用した。遺伝学的な解析を組み合わせた結果、進化的に保存された選択的プロセッシング制御因子やそのシスエレメントを実験的に同定することに成功し、生体内における選択的プロセッシング制御機構解明の手段としての蛍光レポーター系やモデル生物の有用性を示した。コラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的な相互排他的選択的エクソンの制御機構を解明するなど、いくつかの mRNA 前駆体の選択的プロセッシングの運命決定過程を明らかにしたことは評価に値する。この方法により、さらに多くの制御因子やシスエレメントを明らかにし、mRNA 選択的プロセッシング制御に関する役者が出揃うことを期待している。

○佐藤 豊 研究者

「小分子 RNA による植物のゲノム動態制御」

本研究は、動く遺伝子としても知られるトランスポゾンが宿主の遺伝子サイレンシングを利用し、自身を活性化する経路の解析を通し、トランスポゾンによるゲノムの環境適応・進化機構の解明を目指した。また、小分子 RNA 農薬の開発も目指した。前者の研究においては、トランスポゾン遺伝子座から作られる miRNA である *miR820* が、ホストの外来遺伝子に対する防御機構において主要な働きをしている DNA メチル基転移酵素遺伝子 *OsDRM1a* を標的とし、その発現を制御していることを証明した。すなわち、トランスポゾンから作られる小分子 RNA の一種である *miR820* が宿主のサイレンシングを抑制しトランスポゾンの増大に寄与していることを明らかにした。宿主ゲノムとトランスポゾンの双方向の制御を担うシステムの存在を示したもので、高く評価出来る。また、この *miR820* の生産機構に関する解析も行い、転写抑制型クロマチン領域においては、メチル化が通常とは逆に転写に許容的に働いている可能性を示唆した。後者においても、農作物の害虫防除のための効率の良い RNA 農薬を創製した。

この RNA 農薬の作用機序を是非解明して欲しい。

○杉山 智康 研究者

「RNA による染色体分配制御機構の解析」

本研究では、分裂酵母を研究材料とし、RNA による染色体分配制御機構解明を目指したが、この目標を達成することは出来なかった。しかしながら、RNA による染色体上の機能ドメイン(キネトコアおよびヘテロクロマチン形成など)の制御に関し評価に値する成果を挙げた。また、新規核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構についての研究では、Red1 の機能および調節機構、局在部位などを明らかにし、今後の研究の基盤を築いた。

○田村 浩二 研究者

「ヌクレオチドの分子認識能を基盤とした tRNA アミノアシル化機構の解明と応用」

本研究は、RNA ワールドからの生命の進化の過程を想定しつつ、tRNA のアミノアシル化の進化過程を解明し、RNA がヌクレオチドレベルで示すキラル選択性や分子認識・識別メカニズムを明らかにすることを目的としている。同時に、この機構を利用した非天然アミノ酸導入の新しい方法論を確立し、人工タンパク質の合成や RNA ナノテクノロジーの開発を目指している。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応では、L-アミノ酸が D-アミノ酸より約4倍優位に結合する。この実験結果を矛盾なく説明するモデルを作成したことは、高く評価出来る。また、多くのアミノ酸に利用できる tRNA のアミノアシル化法の開発にも成功し、普遍性を与えたことは、今後の応用研究にとって重要である。さらに、ナノ古細菌を使用して、現在の生物系における tRNA のアミノアシル化システムへの進化を研究中である。当研究者の研究は、生命の起源・進化に原点を置いており、常に地球レベルの環境の影響を視点に入れている点が特徴であり、豊かな創造性に繋がっている。

○中川 真一 研究者

「核内 mRNA 型ノンコーディング RNA が関わる新規細胞内プロセスの解明」

本研究では、核内に蓄積する長鎖ノンコーディング RNA に着目し、その生理機能の解明と新規の核内プロセスの解明を目指した。発現量の多い Gomafu, Malat1, MEN α/β に注目し、ノックアウトマウスを作製し、表現形を解析したところ、Gomafu については、基礎活動量が増加することが観察されたが、Malat1 および MEN α/β については、何も観察されなかった。後者については、特定の細胞でのみ機能する遺伝子であることが予想されるが、どのような環境下で必要となるのかを明らかにすることが重要である。Gomafu についての解析はさらに進み、特異的結合タンパク質は、イントロンのブランチ部位結合タンパク質である SF1 であることを明らかにした。また、Gomafu が形成している複合体の構成因子として、スプライシング因子 Celf3 を同定した。同様の方法を用いて、Xist の染色体上への局在には hnRNP U が持つ RNA 結合ドメインと DNA 結合ドメインの両方が必要なことを示した。非常に苦労した研究課題であったが、長年の謎であったエピジェネティックな発現制御に関わる Xist の染色体上への局在を制御するメカニズムを明らかにしたことは、評価出来る。

○松本 健 研究者

「mRNP リモデリングによる mRNA の活性制御」

mRNA は真核細胞内ではつねに特定の蛋白質と mRNP を形成しているので、mRNA の翻訳活性や安定性の変化には、mRNP の構造変化(mRNP リモデリングと呼ぶ)を伴う必要がある。本研究は、mRNA の代謝に重要な細胞質での mRNP のリモデリングが、どのような因子によって担われ、どのような機構でおきるのかを解明すること、新たな翻訳活性制御の機構を明らかにすること、この制御機構を疾患の治療に応用することを目的とした。実際に、YBAP1 が YB-1 に結合活性を持ち、YB-1 を mRNA からはがすための mRNP リモデリング因子として働いていることを明らかにし、翻訳活性制御の新しい方法の存在を示したことは評価出来る。応用研究としては、PRAS40 がユーイング肉腫治療に向けたターゲットの一つになる可能性を示した。

○水谷 壮利 研究者

「HIV-1 転写伸長を制御する noncoding RNA の機能解析」

HIV-1 潜伏感染 T 細胞において、HIV-1 の転写伸長が途中で停止して生じたと考えられる短鎖の RNA が検出される。本研究では、この短鎖 RNA の HIV-1 潜伏感染における存在意義を明らかにし、その生合成機構をも解明することを目的とした。しかしながら、この短鎖 RNA を機能性 RNA の一種と捉える努力が実らなかったことは残念である。一方、生合成機構の研究に関しては、ある程度の結果を得ている。特に、短鎖 RNA の定量を可能にしたことは、これまで実態が不明であった潜伏感染化 HIV を解析するツールとして期

待される技術である。また臨床応用にも貢献できる可能性を示すところまで研究を進めたことを評価している。

○宮川 さとみ 研究者

「small RNA とエピジェネティック制御」

本研究者は、マウス PIWI ファミリーが小分子 RNA である piRNA を介し、DNA のメチル化を制御し転写を抑制するという、新たなエピジェネティック遺伝子発現制御機構を見出した。本研究は、この成果を基盤とし、小分子 RNA による転写抑制機構の分子メカニズムの解明を目指した。小分子 RNA を介する DNA メチル化機構の詳細な解明までには至らなかったものの、研究の過程で作製した遺伝子欠損マウスや、欠損マウス由来の GS 細胞を用いて、piRNA の生合成経路の解明を行い、二次生成の初期段階に MVH が関与すること、および、一次生成に GPAT2 が必須の分子であることを示したことは、高く評価出来る。本研究の中で樹立した細胞系は、今後の解析に有効に機能すると期待している。

10. 評価者

研究総括 野本 明男 微生物化学研究所 所長

領域アドバイザー

伊庭 英夫	東京大学 教授
大野 睦人	京都大学 教授
奥野 哲郎	京都大学 教授
堅田 利明	東京大学 教授
坂本 博	神戸大学 教授
塩見 春彦	慶応義塾大学 教授
杉本亜砂子	東北大学 教授
永田 恭介	筑波大学 教授
古市 泰宏	(株) ジーンケア研究所 会長
松藤 千弥	東京慈恵会医科大学 教授
水本 清久	北里大学 名誉教授

(参考)

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	40	41
口頭	90	30	120
その他	11	3	14
合計	102	73	175

※平成 24 年 3 月 31 日現在

(2) 特許出願件数

国内	国際	計
3	1	4

(3) 受賞等

黒柳 秀人

科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞受賞 平成21年4月

佐藤 豊

日本遺伝学会 GGS Prize 2010(日本遺伝学会誌賞) 平成 22 年 9 月

日本育種学会 奨励賞

平成 22 年 3 月

杉山 智康

日本細胞生物学会日本細胞生物学会若手優秀発表賞 平成 22 年 5 月

(4)招待講演

国際 6 件

国内 11 件

別紙

「RNA と生体機能」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
黒柳 秀人 (兼任)	mRNA選択的プロセッシングを制御する細胞暗号の解明 (東京医科歯科大学 大学院 疾患生命科学研究部)	東京医科歯科大学 大学院 疾患生命科学研究部 准教授 (同上)	44
佐藤 豊 (兼任)	小分子 RNA による植物のゲノム動態制御 (名古屋大学 大学院 生命農学研究科)	名古屋大学 大学院 生命農学研究科 准教授 (同上)	45
杉山 智康 (兼任)	RNA による染色体分配制御機構の解析 (筑波大学 大学院 生命環境科学研究科)	筑波大学 大学院 生命環境科学研究科 助教 (同上)	45
田村 浩二 (兼任)	ヌクレオチドの分子認識能を基盤とした tRNA アミノアシル化機構の解明と応用 (東京理科大学 基礎工学部 生物工学科)	東京理科大学 基礎工学部 生物工学科 准教授 (同上)	40
中川 真一 (兼任)	核内 mRNA 型ノンコーディング RNA が関わる新規細胞内プロセスの解明 (理化学研究所 中川 RNA 生物学研究室)	理化学研究所 中川 RNA 生物学研究室 准主任研究員 (同上 独立主幹研究員)	44
松本 健 (兼任)	mRNP リモデリングによる mRNA の活性制御 (理化学研究所 基幹研究所)	理化学研究所 基幹研究所 専任研究員 (同上)	47
水谷 壮利 (兼任)	HIV-1 転写伸長を制御する noncoding RNA の機能解析 (東京大学 医科学研究所)	東京大学 医科学研究所 助教 (同上)	45
宮川 さとみ (専任)	small RNA とエピジェネティック制御 (大阪大学 大学院 生命機能研究科)	JST さきがけ研究者 (大阪大学 大学院 生命機能研究科 特任助教)	38

研究報告書

「mRNA選択的プロセッシングを制御する細胞暗号の解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：黒柳 秀人

1. 研究のねらい

ヒトを含む多細胞生物の形態の複雑さや機能の巧妙さは、多様な細胞がそれぞれ複雑で巧妙な遺伝子発現を行うことで実現している。しかし、遺伝子の数自体は、ヒトが単細胞生物に比べて桁違いに多いわけではなく、多細胞生物の複雑さや巧妙さは、ひとつの遺伝子転写産物からでも細胞の種類や発生段階に依存して多様な成熟 mRNA を産生できる「mRNA 前駆体の選択的プロセッシング」によって可能になったと考えられる。mRNA の多様性が空間的・時間的に制御されている実態が近年明らかになってきたのに対し、さまざまな遺伝子の mRNA 前駆体が細胞の種類や発生段階に応じてそれぞれ特異的・選択的にプロセッシングされるための制御機構の実体は解明されておらず、「細胞暗号 (cellular codes)」と呼ばれている。

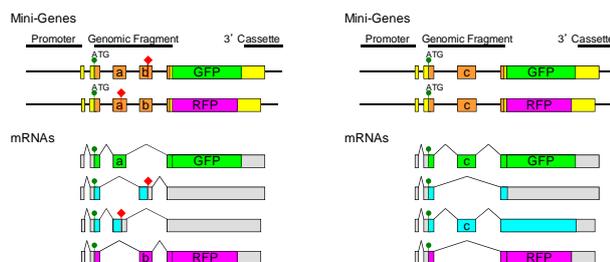
本研究課題では、研究者らが開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を応用して、mRNA 前駆体の選択的プロセッシングの制御因子と制御に必要な塩基配列の同定、プロセッシングの順序の解明を行い、mRNA 前駆体の選択的プロセッシングのための「細胞暗号」の実体を実験的に明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

本研究では、モデル生物である線虫の組織特異的あるいは発生段階依存的に選択的プロセッシングを受ける遺伝子群をモデルとして、さまざまなタイプの選択的プロセッシングの選択性パターンを生体内で可視化するための mRNA プロセッシングレポーターミニ遺伝子の作製を試み、より簡便で成功率の高いミニ遺伝子作製方法の開発を行った。さらに、これらのモデル遺伝子レポーターのうち組織特異的あるいは発生段階依存的選択性を示すものについて、遺伝学的な解析により制御因子やシスエレメントの同定を行い、プロセッシング制御機構を明らかにした。

2-1. 蛍光スプライシングレポーターミニ遺伝子の作製法の開発

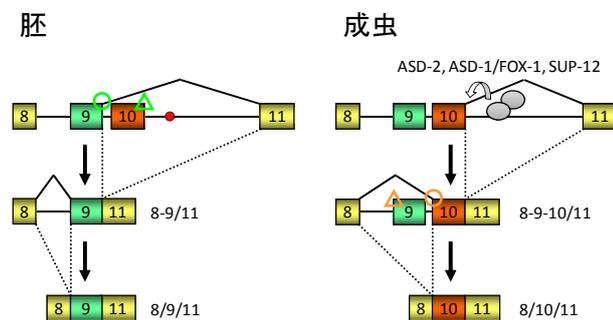
複数の蛍光タンパク質 cDNA を用いて選択的スプライシングパターンを反映して異なる蛍光タンパク質が発現するレポーターミニ遺伝子を相同組換えにより効率よく作るためのミニ遺伝子のデザイン方法、構築方法を工夫、整理、実践し、論文としてまとめた(論文2、右図)。また、特に線虫を用いて蛍光選択的スプライシングレポーター動物を作製し、変異体をスクリーニングするための戦略、方法、遺伝子マッピング方法についても、同論文に詳細を掲載した。



図左、排他的エクソン a/b の使い分けを可視化するためのミニ遺伝子ペア。図右、カセットエクソン c の包含と排除を可視化するためのミニ遺伝子ペア。

2-2. コラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的な相互排他的選択的エクソンの制御機構の解明

線虫のタイプIVコラーゲン $\alpha 2$ 鎖をコードする *let-2* 遺伝子の胚型(エクソン9型)と成虫型(エクソン10型)の相互排他的選択的スプライシングの切替えを可視化するためのレポーターミニ遺伝子を緑色蛍光タンパク質(GFP)と赤色蛍光タンパク質(RFP)を用いて作製し、発生段階依存的な選択的スプライシングの可視化に成功した(論文1)。また、この発生段階依存的なスプライシングの切替えは筋組織特異的に起こることを示した(論文2)。そして、遺伝学的な解析により、この発生段階依存的な制御には、スプライシング制御因子 ASD-2, ASD-1, FOX-1, SUP-12 が必要であること、シスエレメントとしてイントロン10にある CUAAC リピート、UGCAUG 配列、UG リピートが必要であることを見出した。さらに、一部のイントロンのみが除去された mRNA 前駆体プロセッシングの途中段階の RNA を野生型およびスプライシング制御因子変異体で同定、定量することで、イントロン除去の順序を明らかにし、*let-2* 遺伝子の発生段階依存的なスプライシング制御機構のモデルを示した(右図)。



2-3. アクチン結合タンパク質コフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋組織特異的選択的プロセッシング機構の解明

線虫のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子は、1つの遺伝子から UNC-60A と UNC-60B の2つのアイソフォームを産生する。これらの mRNA はエクソン1のみを共有し、UNC-60A のためのエクソン2Aから5Aの下流に UNC-60B のためのエクソン2Bから5Bが配置した遺伝子構造となっており、筋組織は UNC-60B アイソフォームを、他の組織は UNC-60A アイソフォームを発現する組織特異的な選択的プロセッシングを受けることが知られている。本研究では、この筋組織特異的な *unc-60* 遺伝子の選択的プロセッシングパターンの可視化に成功し、筋組織においてはエクソン1とエクソン2Aの間のイントロンの除去が抑制されていること、このイントロンの除去の制御が UNC-60A 型か UNC-60B 型かの運命決定段階であることを示した。そして、このイントロンのスプライシングの抑制に ASD-2 および SUP-12 が協働してかかっていること、これらのシスエレメントが同イントロン上に存在していること明らかにした。

2-3. V-ATPaseの α サブユニットをコードする *unc-32* 遺伝子の神経系特異的選択的スプライシング制御機構の解明

線虫の *unc-32* 遺伝子には2組の相互排他的エクソン(4a/4b/4c, 7a/7b)があることが知られており、本研究で蛍光レポーターを作製したところ、4aは腸、4bは神経系、4cは咽頭に主に発現する組織特異性を、7aは神経系に、7bはその他の組織に発現する組織特異性を示すことが明らかとなった。さらに、エクソン7aが神経系特異的に選択されるための制御因子として、ASD-1, FOX-1 と神経系特異的な RNA 結合タンパク質 UNC-75 を同定し、これらの因子が作用するシスエレメントを特定した。また、UNC-75 が神経系特異的なエクソン4aの選択性にも

必須であることを示した。

3. 今後の展開

本研究により、線虫のようにゲノムサイズが小さく、イントロンの平均長が哺乳類に比べてかなり短いモデル生物であっても、選択的 mRNA プロセシングの制御にはイントロンにある複数のシスエレメントに複数の制御因子が結合することが必要なことが一般的であることが明らかとなった。このことは、制御因子をさまざまに組み合わせることで、さまざまな遺伝子をさまざまな特異性で制御できる可能性を示している。今後も同様の方法で制御因子とそのシスエレメントが明らかになっていくことで、選択的プロセシング制御の細胞暗号の実体ともいえる役者が出揃うことが期待される。

一方、少数の個別のモデル遺伝子の解析で得られた制御因子の発現パターンやそのシスエレメントの配列からを他の多くの遺伝子の選択的プロセシングパターンを予測できるような規則性を導くことの困難さも明らかとなった。規則性の一般化を困難にする要因として、個々のシスエレメントの配列が必ずしも明確なコンセンサスを持たないこと、複数の制御因子が同時に存在して初めて協働的結合や組織特異性を示す場合があることが挙げられる。今後は、より多くの遺伝子の選択性プロファイルや制御因子を網羅的に解析して例数を増やしていくことで、線虫における、さらには他の生物にも当てはまる普遍的な細胞暗号の解明につなげていくことが期待される。

本研究で行ったモデル生物を用いた生体内選択的プロセシングパターンの可視化と順遺伝学的な解析手法は、mRNA 前駆体に直接結合する制御因子以外にも、シグナル伝達機構やエピジェネティックな制御機構など、培養細胞を用いた生化学的解析では同定が困難な間接的なプロセシング制御因子を同定できる可能性を持っている。今後の解析の進展により、生体における遺伝子発現制御機構解明のための予期せぬ新たな手がかりが得られることが期待される。

4. 自己評価

本研究では、さまざまなタイプの選択的プロセシングを受ける個々のモデル遺伝子について、選択性プロファイルの生体内可視化に成功し、さらに、遺伝学的な解析により新規の進化的に保存された選択的プロセシング制御因子やそのシスエレメントを実験的に同定して、mRNA 前駆体の選択的プロセシングの運命決定過程を明らかにすることができた。このことは、生体内における選択的プロセシング制御機構解明の手段としての蛍光レポーター系やモデル生物の有用性を示しており、今後もさまざまなモデル遺伝子を制御する因子やエレメントの解明につながっていくことが期待できる。一方で、プロセシング制御機構の規則性を一般化するための道筋、プロセシング制御因子やシスエレメントが進化的に保存されていることの生物学的意義、個々の制御因子が一群の標的遺伝子をまとめて制御することの生物学的意義を探るための新たな方法論の開発については今後の展開に委ねることとなった。

5. 研究総括の見解

本研究では、細胞の種類や発生段階に応じて、mRNA 前駆体がそれぞれ特異的・選択的に

プロセッシングされるための制御機構の実態解明を目指した。モデル生物として線虫を用い、当研究者らが開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を応用した。遺伝学的な解析を組み合わせた結果、進化的に保存された選択的プロセッシング制御因子やそのシスエレメントを実験的に同定することに成功し、コラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的な相互排他的選択的エクソンの制御機構を解明するなど、いくつかの mRNA 前駆体の選択的プロセッシングの運命決定過程を明らかにしたことは評価に値する。この方法により、さらに多くの制御因子やシスエレメントを明らかにし、mRNA 選択的プロセッシング制御に関する役者が出揃うことを期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Genta Ohno, Masatoshi Hagiwara, Hidehito Kuroyanagi. STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo. **Genes & Development**. (2008) 22: 360-374.
2. Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno, Hiroaki Sakane, Hiroyuki Maruoka & Masatoshi Hagiwara. Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Nature Protocols** (2010) 5: 1495-1516.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表・招待講演

1. Hidehito KUROYANAGI. Alternative splicing reporters offer a path to splicing codes. 文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト線虫シンポジウム—Nematode: An Ideal Model Organism for Functional Genomics—(2008.11.5, 東京).
2. Hidehito Kuroyanagi, Masatoshi Hagiwara. Fox-1 family and CELF family RNA-binding proteins regulate neuron-specific alternative splicing in *C. elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC mRNA PROCESSING (2009.8.18-22).
3. Hidehito Kuroyanagi. Tissue-specific alternative splicing regulation in *C. elegans*. GENE REGULATION PROGRAMME SEMINAR, ICREA and Centre de Regulacio Genomica, Barcelona, Spain (2009.12.16).
4. 黒柳秀人. 蛍光レポーター線虫の作製と遺伝学的解析. 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 細胞光計測・制御のための新規バイオ技術創成クラスター 第2回シンポジウム(2010.3.10、横浜).
5. Hidehito KUROYANAGI. Regulation of Tissue-Specific Alternative Splicing in *C. elegans*. The 19th CDB Meeting“RNA Sciences in Cell and Developmental Biology” (2010.5.10-12, Kobe).

受賞

平成 21 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2009 年 4 月)

総説等

1. KUROYANAGI, H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. (2009) 66: 3895-3907.
2. 黒柳秀人. 選択的スプライシングの可視化と制御機構解明への応用. 蛋白質 核酸 酵素 2009年12月号増刊「mRNAプログラム」、54: 2044-2048.
3. 黒柳秀人. 選択的pre-mRNAスプライシング制御機構解明への新たなアプローチ. 生化学 2010年5月号、82: 402-411.
4. 大野源太、黒柳秀人. 選択的スプライシングの分子機構と生命現象. 実験医学増刊 Vol.28 No.10 拡大・進展を続けるRNA研究の最先端 (2010.6).

研究報告書

「小分子 RNA による植物のゲノム動態制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：佐藤 豊

1. 研究のねらい

動く遺伝子としても知られるトランスポズンは、真核生物ゲノムの主要な構成因子である。トランスポズンは転移の過程でしばしば宿主ゲノムに有害な変異を誘発する一方、ゲノムに多様性をもたらし、宿主の環境適応や進化に一定の役割を果たしている。本研究はトランスポズンが宿主の遺伝子サイレンシングを利用し自身を活性化する経路の解析を通してトランスポズンによるゲノムの環境適応・進化機構の解明を目指す。また、これまでに得られた小分子 RNA と RNA サイレンシングに関する研究成果を、農学分野で応用展開していくことも試みる。具体的には、2重鎖 RNA をベースとして有害昆虫などの抑制に有効な小分子 RNA 農薬の開発を試行する。また、2重鎖 RNA をベースとして有害昆虫などの抑制に有効な小分子 RNA 農薬の作用機序を明らかにするために、昆虫体内への2重鎖 RNA の取り込み機構や、2重鎖 RNA の昆虫体内での増幅機構の解明などに取り組む。

2. 研究成果

(1) 小分子 RNA を介した宿主ゲノムとゲノム寄生因子の攻防に関する解析

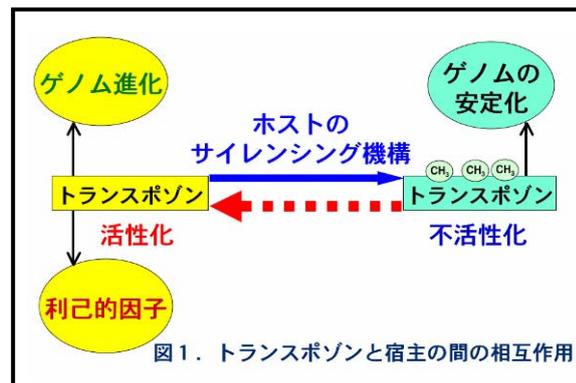
トランスポズンなどの反復配列はゲノム寄生因子とも呼ばれ、多くの真核生物においてゲノムの主要な構成因子になっている。トランスポズンは転移の過程でしばしば宿主ゲノムに変異を誘発する。そこで、宿主ゲノムの安定化にはトランスポズンを不活性化し、その状態を維持する宿主側の機構が必要となる。遺伝子サイレンシングはトランスポズンなどのゲノム寄生因子に対し宿主が獲得した防御機構の一つである。実際、転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) に関わる遺伝子の変異により、不活性化トランスポズンの再活性化がしばしば観察されている。言い換えると、トランスポズンは常に宿主から負の選択にさらされているといえる。一方で、トランスポズンの転移は宿主の表現型にほとんどの場合影響しないで、宿主ゲノムの複製以上の早さで自己複製が可能な究極の利己的 DNA とも解釈できる。このように真核生物のゲノムはゲノム寄生因子と宿主の防御機構との軍拡競争 (arms race) の場といえる。最近では、トランスポズンが多重遺伝子族の形成、ある種の転写因子の進化、また遺伝子発現制御における新規なシス制御配列の導入など、多様性の創出を通して宿主の環境適応や進化に一定の役割を果たしてきたと考えられている。すなわち、ゲノム寄生因子の不活化と活性化はゲノムの安定化と多様性の創出のバランスの元に絶妙な調節を受けていると考えられる。しかしながら、これまでの研究は宿主側のゲノム寄生因子に対する防御機構の解明に焦点が絞られてきたため、利己的な DNA としてのトランスポズンの活性化戦略については未解決な問題が多い。

そこで、本研究ではイネで発見したゲノム寄生因子が宿主の遺伝子サイレンシング機構を利用し自身を活性化する経路の解析を行った。具体的には図1にある破線の経路に関する解析を本研究で行った。この経路は、ゲノム寄生因子にとっての宿主の防御機構を回避する対宿主戦略としての意義と、宿主にとってはゲノムに多様性をもたらす意義の両面を持つまさに諸刃の剣で

ある。

miR820 はトランスポゾン遺伝子座から作られる miRNA で、ホストの外来遺伝子に対する防御機構において主要な働きをしている DNA メチル基転移酵素遺伝子 *OsDRM1a* を標的とすることが予測されていた。そこで、まず実際に *miR820* が *OsDRM1a* の発現を制御しうるかを検証した。具体的には *OsDRM1a* の *miR820* による切断産物の検出を試みた。その結果、予想される切断点を末端とする転写物の検出に成功した。さらに、

mRNA の切断ではなく DNA のメチル化のトリガーとなる 24nt の *miR820* 分子種の存在も他グループから報告されていたことから、*OsDRM1a* 遺伝子座のメチル化を解析した。その結果、*miR820* は mRNA の切断と DNA のメチル化の両方に寄与することが明らかになった。次に、*miR820* を過剰に発現する遺伝子組換え植物の作成や *miR820* を生産できない変異体を作成し、標的である DNA メチル基転移酵素の発現量や切断量を調べたところ、両者に負の相関が見られた。さらに、*miR820* とその標的配列の多様性をイネ族で解析したところ、両者に共進化の痕跡が見られる系統が見つかった。また、この系統において、*miR820* を持つトランスポゾンのコピー数が増大していたことから、トランスポゾンから作られる小分子 RNA の一種である *miR820* が宿主のサイレンシングを抑制しトランスポゾンの増大に寄与していると結論づけた。一方で、配列の共進化は *miR820* による宿主因子の制御が宿主側にとっても何か有利に働いている可能性も示唆された。



(2) トランスポゾン由来の miRNA 生産機構に関する解析

これまでに *miR820* を過剰に発現する遺伝子組換え植物の作成を試みてきた。ところが、*miR820* 前駆体を過剰発現する形質転換植物は得られなかったが、その理由はおそらく、トランスポゾン由来の配列を遺伝子導入したために遺伝子サイレンシングの標的となったと考えられた。このことは、トランスポゾン由来の *miR820* がそもそもどのようなメカニズムで転写されているのかという根本的な疑問を投げかけた。そこで、*miR820* の生成機構の解析を行った。まず、イネのリファレンスゲノム上に5コピー存在する *miR820* が座乗するトランスポゾンのヒストンの修飾状態を5コピーに共通の PCR プライマーを用いて ChIP 法により解析した。その結果、セントロメア領域並みに高度な転写抑制型ヒストン修飾領域に相当することが明らかになった。次に、5コピー存在する *miR820* のうち、どのコピーが優先的に転写されているかを解析したところ、ほぼ7番染色体上のコピーからのみ転写されることが明らかになった。そこで、7番染色体上の *miR820* だけに特徴的なクロマチンの状態の有無を、*miR820* を持つ5コピーのトランスポゾンを区別できる PCR プライマーを用いて ChIP 法により確認したところ、7番染色体上のコピーにおいて、*miR820* の転写開始点上流に、転写抑制型のヒストン修飾の程度が下がっている領域が見つかった。さらに、*miR820* の近傍における DNA のシトシン残基のメチル化状態を解析したところ、CG、CHG サイトともに5コピーとも高度にメチル化を受けていた。一方、CHH サイトに関して、7番染色体以外はそれほどメチル化を受けておらず、7番染色体のコピーでのみ特異的に増加していた。また、CHH のメチル化上昇は *miR820* の認識部位が特に顕著であった。以上の結果から、高度に転写抑制型修飾を持つヒストンの存在する領域においても、転写を許容するメカニズムの存在が示

唆された。また、*miR820* がトランスではなくシスに存在する CHH サイトのメチル化のトリガーとしても機能することが示唆された(図 2)。一般に、ユークロマチンにおける小分子 RNA の標的領域は高度に CHH のメチル化が誘導され、転写に抑制的に働くと考えられている。本研究は転写抑制型クロマチン領域においては CHH のメチル化が通常とは逆に転写に許容的に働いている可能性を示唆している。

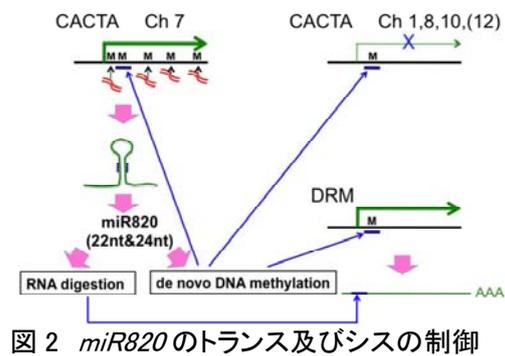


図 2 *miR820* のトランス及びシスの制御

(3) RNA サイレncing を農学分野で利用するための応用・基礎研究

爆発的な人口増加に伴い世界規模での食糧不足が緊迫するなか、驚くべきことに農作物の約 3分の1が病害虫等により消失していることが国連食糧農業機関によって報告されている。すなわち、適切な害虫管理により害虫食害を減少させることができれば、それだけで膨大な食糧増産が見込まれる。従って、世界規模での食糧増産を果たす上で、いかに害虫を管理するかは非常に重要な問題である。現在、世界の農薬市場は年間約 3 兆円に達しており、世界的な食糧増産の必要性からその需要は今後さらに伸びることが予測されている。農薬には化学農薬を用いる殺虫剤、殺菌剤、植物成長調節剤や生物農薬など様々なものがある。化学農薬の多くは毒劇物であり害虫に対する特異性が低く、人畜に対する安全上の問題および環境に対する負荷が大きい。これに対し、現在では資源の循環に基づいた持続的な社会の形成が求められており、環境に配慮した害虫防除法の確立は今後ますます重要な位置を占めると考えられている。また、化学農薬に依存する従来の害虫防除法では、新奇薬剤を開発しても、昆虫はその薬剤に対する抵抗性を短期間のうちに発達させてしまうことが大きな問題となっている。これらの問題点を解決するため、本研究では、RNAi(RNA 干渉)の原理を利用し、遺伝子組換えに依存しない、新奇害虫防除法の開発に向けた基盤形成のための研究を行った。RNAi に基づき有害昆虫の生存に必須の遺伝子の機能阻害をもたらす RNA を“RNA 農薬”と命名し、RNA 農薬の利用システムの構築とその作用機序の解明が本研究の主題である。

まず、昆虫の生存に必須であるアポトーシス阻害因子(inhibitor of apoptosis; IAP)をコードする遺伝子をジャガイモ害虫であるニジュウヤホシテントウからクローニングした。この DNA もとに合成した二本鎖 RNA(dsRNA)を塗布したジャガイモ葉をニジュウヤホシテントウの幼虫に経口投与したところ、摂食が短時間に停止し、致死に至ることが明らかとなった(図 3)。また、IAP 二本鎖 RNA を他の昆虫に摂取したところ同様の効果が認められた。

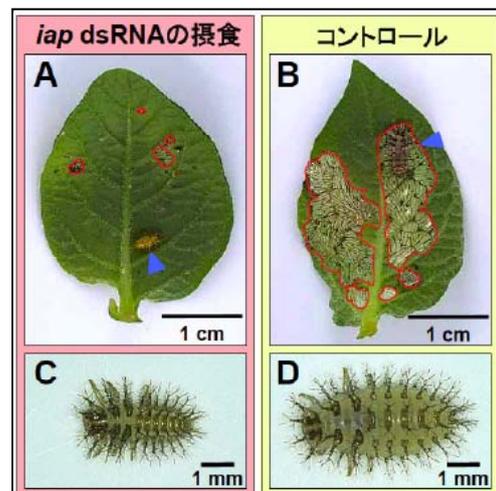


図 3 *iap* dsRNA の摂食による新規害虫防除法。
 (A) *iap* dsRNA 摂食によりジャガイモ葉の食害停止。
 (B) コントロール個体による食害の拡大。
 赤線内：食害領域、青三角：幼虫。
 (C) *iap* dsRNA 摂食による発育停止、致死に至る。
 (D) コントロール個体は正常に発育。

3. 今後の展開

(1) 小分子 RNA を介したによる宿主ゲノムとゲノム寄生因子の攻防に関する解析

本研究はイネのトランスポゾンから産出される小分子 RNA である *miR820* が、宿主ゲノムとトランスポゾンの相互作用に関与することを明らかにした。従来、宿主ゲノムがトランスポゾンをコントロールする一方通行の仕組みに関する研究を中心にこの分野が発展して来たことを考えると、本研究成果は両者の相互作用を示唆する物であり、その新奇性は高い。一方で、*miR820* はイネに特有の小分子 RNA であり、今回の発見はイネにのみ当てはまる一つの例でしかない。今後は、宿主ゲノムとトランスポゾンの双方向の制御をになう良く似たシステムの存在を他の生物種で見つけ出すことにより、今回の発見の普遍性を確かめたい。

(2) トランスポゾン由来の miRNA 生産機構に関する解析

本研究はトランスポゾンから *miR820* が転写・生産される機構を明らかにすることを目的に行った。現状の解析は、*miR820* が高度に転写抑制型ヒストン修飾部位に位置する領域からも転写されうることを示し、この領域が DNA のシトシン残基のメチル化に特有のパターンが見られる現象のみを明らかにした。今後は、この DNA のメチル化パターンが転写抑制型ヒストン修飾領域からの転写にどのように関わるのかその分子機序を明らかにする必要がある。

(3) RNA サイレncing を農学分野で利用するための応用・基礎研究

本研究では dsRNA の摂食投与により昆虫の遺伝子発現を改変するという新奇で応用価値の高い現象を見つけ出すことができた。しかし、その作用機序については皆目明らかにされていない。今後はこの点を重点的に解析する必要がある。また、この現象は植物と昆虫とが植物に内在する dsRNA を介して情報のやり取りをしている可能性を示唆している。今後は、この点も明らかにしてみたい。さらに、RNA 農薬を実際に利用するのに必要な各種試験データなども取得していきたい。また、IAP 以外の dsRNA の標的をスクリーニングし、更なる応用範囲の拡大を目指したい。

4. 自己評価

3 年半、さきがけのサポートを受けて、思う存分やりたいと思った実験をデザインし、取り組むことができた。特に、当初予想もしなかった方向へ進んだ研究もあり、自己の研究テーマに広がりができたことは大きな収穫となった。一方で、当初の想定通り実験が進まなかった計画もある。特に、トランスポゾンと宿主ゲノムの相互作用に関する解析では“レトルスペクティブ”なアプローチだけでは限界があるとの、さきがけの採用面接の時から指摘を受けていた点に関し、何も答えを見つけ出せなかったのは心残りとなった。

5. 研究総括の見解

本研究は、動く遺伝子としても知られるトランスポゾンが宿主の遺伝子サイレンシングを利用し、自身を活性化する経路の解析を通し、トランスポゾンによるゲノムの環境適応・進化機構の解明を目指した。また、小分子 RNA 農薬の開発も目指した。前者の研究においては、トランスポゾン遺伝子座から作られる miRNA である *miR820* が、ホストの外来遺伝子に対する防御機構において主要な働きをしている DNA メチル基転移酵素遺伝子 *OsDRM1a* を標的とし、そ

の発現を制御していることを証明した。すなわち、トランスポゾンから作られる小分子 RNA の一種である *miR820* が宿主のサイレンシングを抑制しトランスポゾンの増大に寄与していることを明らかにした。宿主ゲノムとトランスポゾンの双方向の制御を担うシステムの存在を示したもので、高く評価出来る。また、この *miR820* の生産機構に関する解析も行い、転写抑制型クロマチン領域においては、メチル化が通常とは逆に転写に許容的に働いている可能性を示唆した。後者においても、農作物の害虫防除のための効率の良い RNA 農薬を創製した。この RNA 農薬の作用機序を是非解明して欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Séverine Lacombe, Hiroshi Nagasaki, Carole Santi, David Duval, Benoît Piégu, Martine Bangratz, Jean-Christophe Breitler, Emmanuel Guiderdoni, Christophe Brugidou, Judith Hirsch, Xiaofeng Cao, Claire Brice, Olivier Panaud, Wojciech Karlowski, Yutaka Sato, Manuel Echeverria: Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity of the genomic organization and expression of miRNA genes in rice. <i>BMC Plant Biol.</i> , 8 123, 2008
2. Masashi Abe, Takanori Yoshikawa, Misuzu Nosaka, Hitoshi Sakakibara, Yutaka Sato, Yasuo Nagato, Jun-ichi Itoh: WAVY LEAF 1, an Ortholog of Arabidopsis HEN1, Regulates Shoot Development by Maintaining microRNA and trans-acting siRNA Accumulation in Rice. <i>Plant Physiol.</i> , 2010 154, 1335-1346.
3. Hiroaki Tabuchi, Yu Zhang, Susumu Hattori, Minami Omae, Sae Shimizu-Sato, Tetsuo Oikawa, Qian Qian, Minoru Nishimura, Hidemi Kitano, He Xie, Xiaohua Fang, Hitoshi Yoshida, Junko Kozuka, Fan Chen, and Yutaka Sato: <i>LAX PANICLE2</i> of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. <i>Plant Cell</i> , 23, 3276-3287, 2011.
4. Katsutoshi Tsuda, Yutaka Sato, Yukihiro Itoh, Nori Kurata: Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot meristem maintenance in rice. <i>Plant Cell</i> Published online before print December 2011, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.090050 .

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 5 件

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2009/6/5 特願 2009-136701

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2010/6/5 PCT/JP2010/059499 (WO)

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2011/9/28 2011-518506 (JP)

発明者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊
発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2011/12/2 13/375,842 (US)

発明者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊
発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2012/1/2 10 783 457.4 (EP)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

- (1) 日本育種学会奨励賞 2010.3.25
- (2) GGS Prize 2010 (Genes & Genetic Systems 論文賞) 2010.9.25

研究報告書

「RNAによる染色体分配制御機構の解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：杉山 智康

1. 研究のねらい

真核生物核内には、ヘテロクロマチンや核スペckルなどの機能性ドメインが数多く存在し、染色体分配や遺伝子発現調節などの重要な役割を担うと考えられている。近年の研究の進展により、これら機能性ドメインの構築に非コード RNA(ncRNA)や RNA interference(RNAi)が重要な役割を果たすことが明らかになりつつあるものの、各ドメインの詳細な機能、形成機構など未解明な点は多く残されている。本研究では染色体分配を中心に、RNA 制御と機能性ドメインの関わりを明らかにすることを目標にした。

2. 研究成果

遺伝学、分子生物学、細胞生物学的手法が利用できる分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)を主な研究材料とし、①RNAによる染色体上の機能ドメイン(キネトコアおよびヘテロクロマチン)の制御、および②新規タンパク質 Red1 が形成する核内ドメインの機能および RNA 制御との関連について研究を進め、以下の成果を得た。

①RNAによる染色体上の機能ドメインの制御

【キネトコア由来転写産物の解析】

キネトコアは染色体分配時に紡錘体から伸びてきた微小管が結合する染色体上の機能ドメインである。キネトコア領域では、通常のヌクレオソームではなくヒストン H3 の代わりに CENP-A が存在している。キネトコアの形成は、出芽酵母では DNA 配列に依存して起こるが、分裂酵母やヒトでは DNA 配列ではなく何らかの方法によってキネトコア領域を規定していることが知られている。

我々はヘテロクロマチン形成とキネトコア領域決定は共通点、つまり RNAi によって形成領域が決定されると仮説を立てた。この仮説が正しければ、キネトコア領域由来の RNA が RNAi により small interfering RNA (siRNA) に分解され、キネトコア siRNA が配列特異性を生じさせているものと想定される。この仮説を検証するために、キネトコア領域由来 RNA (kdRNA) の検出を試みた。すると、野生株では kdRNA の存在が認められなかったものの、RNAi 因子欠損株では kdRNA が検出された。さらに、kdRNA は CENP-A 局在化が異常になる変異体や複数のヒストン修飾酵素欠損株においても検出された。したがって、この kdRNA が何らかの形でキネトコアの形成あるいは機能に関与する可能性が示唆された。

【新規染色体制御因子の同定】

RNAi はキネトコア RNA の代謝に関与するだけでなく、ヘテロクロマチン形成や染色体高次構造形成にも重要であるため、新規 RNAi・染色体制御因子の同定は非常に重要である。

複数のデータベースサーチにより RNAi や染色体制御に関与すると予想される遺伝子を選抜し、欠損株の作成を行った。その結果、複数の欠損株がヘテロクロマチン領域での遺伝子発現抑制

(サイレンシング)異常や DNA 障害を引き起こす薬剤に対する高感受性を示した。これら欠損株のうち、ヘテロクロマチンの異常を示したものを *sde1*(silencing defective 1)および *sde2*と名付けた。*sde1* 欠損株はセントロメアでのみサイレンシング異常を示し、一方 *sde2* 欠損株はセントロメアとテロメアでサイレンシング異常を示した。*sde1* 欠損株で観察された表現型は RNAi 欠損株と類似している一方、*sde2* 欠損株の表現型はこれまで報告のないサイレンシング異常であり、非常に興味深いものであった。

Sde2 の更なる機能解析を行ったところ、Sde2 は核タンパク質であること、*sde2* 欠損株では DNA 障害および微小管重合阻害剤に対する感受性が上昇していること、Sde2 の働きによりヒストン脱アセチル化酵素複合体 SHREC (SNF2/HDAC repressor complex) がテロメアヘリクルートされる事を明らかにした。また、他のグループにより Sde2 がスプライシング因子 Prp17 や Prp19 と結合すること (Ren et al, PLoS One, 2011)、およびスプライシング因子はヘテロクロマチン形成に必須であること (Bayne et al, Science, 2008) が報告された。したがって、Sde2 がスプライシング因子と協調的に染色体制御を行っている可能性、あるいは Sde2 がスプライシング因子の一つである可能性も示唆された。

②核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構の解析

【Red1 の機能解析】

我々は蛍光タンパク質の局在を指標にしたスクリーニングにより、複数の機能未知遺伝子が核内構造体を形成することを見出している。このような因子の一つ、Red1 は核内に 1~4 個程度のドットを形成する。Red1 の機能を解析するために、*red1* 欠損株を作成し表現型の解析を行った。その結果、*red1* 欠損株では増殖速度、接合能および孢子形成能の低下が観察された。さらに、野生株と *red1* 欠損株間の遺伝子発現状態をマイクロアレイにより比較したところ、*red1* 欠損株では栄養増殖期であるにもかかわらず、減数分裂期 mRNA が蓄積していた。

分裂酵母では、減数分裂期 mRNA は栄養増殖期・減数分裂期間問わず転写が起きているが、栄養増殖期には RNA 結合タンパク質 Mmi1、ポリ A ポリメラーゼ Pla1、核内 RNase 複合体エキソソームの働きにより分解されている。この減数分裂期 mRNA 分解機構に Red1 が関与すると予想し、種々の実験を行った。その結果、Red1 は Mmi1/Pla1/Rrp6 (エキソソームサブユニット) と結合および共局在した。また、減数分裂期 mRNA 分解にはポリ A 鎖の存在が必須であるが、Red1 非存在下ではポリ A の伸長化が起こらないことから、Red1 は標的 mRNA のポリ A 鎖伸長を促進することで分解に関与しているものと考えられる。

【Red1 の機能調節機構の解明】

Red1 は栄養増殖期において、減数分裂期 mRNA の分解を促進している。しかし、この分解機構は、減数分裂期には何らかの方法によって不活化される必要がある。栄養増殖期および減数分裂期の Red1 局在の観察から、Red1 の核内ドットが減数分裂期には消失することを見出した。また、Red1 の局在は減数分裂終了後の孢子で再び観察されること、ウエスタンブロットにより Red1 タンパク質量に変化は生じないことも明らかとなった。Red1 が消失している時期は、大部分の Red1 標的 mRNA が発現する時期とほぼ一致するため、Red1 の局在変化により Red1 の機能が調節されているものと予想される。

次に、減数分裂時の局在変化がどのような因子によって引き起こされるのかを検討した。Red1 の局在変化が減数分裂開始後の早い段階で起こること、および Mmi1 の局在を制御する

Mei2/*meiRNA*の欠損株においてもRed1 ドットの消失することから、窒素源枯渇、フェロモン応答、あるいは接合のいずれかがトリガーになっている可能性が考えられた。まず、接合が起こらない *fus1* 欠損株を減数分裂期に誘導したところ、野生株と同様にRed1 局在が消失した。次に、*h* および *h⁻ matPc*株を用いて同様の実験を行ったところ、*h* では局在の変化が起こらなかったが、*h⁻ matPc*ではRed1 局在の変化が観察された。これらの結果は、Red1 の局在変化はフェロモン応答によって引き起こされることを示している。

【Red1 以外の減数分裂期 mRNA 抑制因子の探索】

我々が見出した核内構造体を形成する機能未知遺伝子の一つ、Red4 は核内に1〜3個のドットを形成する。Red4 の機能を解析するために、*red4* 欠損株を作成し表現型の解析を行った。その結果、*red4* 欠損株では高温感受性が観察され、更に接合能および胞子形成能が若干低下していた。Red4 と結合する因子を探索したところ、pre-mRNAの3'プロセッシング因子との共沈が観察された。さらに、野生株と*red4* 欠損株間の遺伝子発現状態の違いを調べたところ、*red4* 欠損株では栄養増殖期であるにもかかわらず、一部の減数分裂期mRNAの上昇が確認された。*red4* および*red1* 欠損株で発現レベルが上昇していた減数分裂期mRNAを比較すると、ごく一部が重複するものの大半は別の遺伝子を標的としている結果が得られた。特に、*mei4/rec8*に代表されるRed1 およびMmi1 の標的遺伝子は殆ど含まれていなかった。これらの結果から、Red4 はRed1/Mmi1 とは異なる機構で減数分裂期mRNAの蓄積を抑制するものと考えられた。

3. 今後の展開

①RNAによる染色体上の機能ドメインの制御

本プロジェクトの結果より、キネトコア由来の非コードRNAであるkdRNAが何らかの役割を果たす可能性、新規RNAi因子Sde1によるヘテロクロマチン形成、Sde2による染色体末端テロメア制御を見出した。今後は、それぞれの因子が具体的にどのような役割を果たすのかを明らかにする必要がある。特に、kdRNAはブラックボックスの多いキネトコア形成におけるエピジェネティック因子の候補であるためは、非常に興味深い。また、Sde2とスプライシング因子の結合は、テロメア制御におけるスプライシングの重要性を示唆するものであり、今後重要な課題であると考えられる。

②核内構造体形成因子Red1による選択的mRNA分解機構の解析

本プロジェクトの成果は、分裂酵母における不要なmRNA(=減数分裂期mRNA)分解機構の理解に繋がった。しかし、この分解機構の完全な理解には更なる研究が必要である。今後、分裂酵母減数分裂期mRNA分解機構の全容解明のために、この機構に関わる因子を遺伝学的、生化学的および細胞学的手法を用いて網羅的に同定していく。さらに、分裂酵母で発見された選択的mRNA分解機構が進化的保存されているのか、保存された機構がmRNA分解を介して細胞分化の抑制に関与しているのかを検討する。また、分裂酵母選択的mRNA分解と非常に似た機構が、ヒトにおいてカポジ肉腫ウイルスの病原性と深く関わっていることが明らかになってきており、非常に興味深い。したがって、本研究が進展することにより、真核生物における分化抑制機構、とりわけ体細胞の生殖細胞化の阻害や幹細胞の未分化状態維持へのmRNA分解の関与、およびウイルスによる病態発症機構の理解にも繋がると予想される。これらの研究を進めることにより、分裂酵母のみならず多細胞生物における選択的mRNA分解機構の生理的な役割を明らかにしていきたい。

4. 自己評価

①RNA による染色体上の機能ドメインの制御

染色体制御(キネトコアおよびヘテロクロマチン形成、テロメアサイレンシング、ゲノム安定性)について、一定の成果は得た。しかしながら、当初の目的である「RNA あるいは RNA 制御因子がどのようにして染色体分配を調節するのか」という点については、明らかに出来ず非常に残念である。今後、これまでとは異なるアプローチも含めて、新たな進展ができるよう検討していきたい。

②核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構の解析

我々が同定した Red1 の機能、局在部位、Red1 機能の調節機構を明らかにし、分裂酵母以外の生物でも、同様の機構が働いている可能性を得た。しかし、具体的にどのようにして Red1 が mRNA 分解を促進するかなどの詳細な機構、および Red1 以外の分解促進因子についての成果を得る、または発表するまでの段階には至っていない。これらについて、早急に論文発表を行うことが現在の課題である。

5. 研究総括の見解

本研究では、分裂酵母を研究材料とし、RNAによる染色体分配制御機構解明を目指したが、この目標を達成することは出来なかった。しかしながら、RNA による染色体上の機能ドメイン(キネトコアおよびヘテロクロマチン形成など)の制御に関し評価に値する成果を挙げた。また、新規核内構造体形成因子 Red1 による選択的 mRNA 分解機構についての研究では、Red1 の機能および調節機構、局在部位などを明らかにし、今後の研究の基盤を築いた。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. #[Sugiyama T.](#) and [Sugioka-Sugiyama R.](#) (#corresponding author). (2011). Red1 Promotes the Elimination of Meiosis-Specific mRNAs in Vegetatively Growing Fission Yeast. *The EMBO J.*, 30(6): 1027-1039.
2. *[Sugioka-Sugiyama R.](#) and #*[Sugiyama T.](#) (*: equal contribution, #: corresponding author). (2011). Sde2: a novel nuclear protein essential for telomeric silencing and genomic stability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406(3): 444-448.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

【主要な学会発表】

1. [杉山智康](#)、[杉岡\(杉山\)梨恵](#) “Red proteins that localize as nuclear dots promote selective elimination of meiotic mRNA in vegetative fission yeast“

- 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 16 日(口頭発表)
2. Sugiyama T. and Sugioka-Sugiyama R. “Red1, which forms nuclear bodies, promotes the elimination of meiosis-specific mRNAs in vegetative fission yeast”
The 16th Annual Meeting of the RNA Society, 京都、2011年 6 月 16 日(ポスター発表)
 3. 杉山智康 「核内構造体を形成する Red1 による減数分裂期 mRNA 除去」
第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪、2010 年 5 月 19 日(口頭発表)
 4. Sugiyama T. and Sugioka-Sugiyama R. “A novel protein, which forms nuclear bodies, mediates the down-regulation of meiosis-specific genes during mitosis”
The 5th International Fission Yeast Meeting, 東京、2009 年 10 月 29 日(口頭発表)
 5. 杉山智康、杉岡(杉山)梨恵「減数分裂特異的 mRNA 分解機構の解析」
第 11 回日本 RNA 学会年会、新潟、2009 年 7 月 27 日(口頭発表)

【受賞】

第 62 回日本細胞生物学会大会 日本細胞生物学会若手優秀発表賞 (2010)

【プレス発表】

「不要な mRNA を選択的に分解するしくみを解明 -医療応用への新規番を目指す-

2010 年 2 月 12 日 筑波大学発表

2010 年 3 月 3 日 日刊工業新聞に掲載

研究報告書

「ヌクレオチドの分子認識能を基盤とした tRNA アミノアシル化機構の解明と応用」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：田村 浩二

1. 研究のねらい

現存する生命において、RNA の塩基配列をタンパク質中のアミノ酸の配列に変換するアルゴリズムが遺伝暗号であり、tRNA のアミノアシル化は遺伝暗号の成立過程に関わっている。本研究は、RNA がヌクレオチドレベルで示すキラリ選択性や分子認識・識別メカニズムを明らかにすることにより、生物学的な tRNA のアミノアシル化の進化過程を解明すると同時に、有効な tRNA の化学的アミノアシル化の実現と RNA 超分子創製の基礎構築を目指すものである。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドによる tRNA のアミノアシル化法は、アミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) なしで、有効なアミノアシル化を実現する可能性がある。また、これらの分子メカニズムを解明することによって、生物界のホモキラリティーや遺伝暗号、更には、tRNA のアミノアシル化の起源に迫ることができる。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドは、現在の aaRS の反応中間体であるアミノアシル AMP と同じ結合を有し、生命の進化の連続性の観点からも注目し得る。と同時に、この機構を利用した非天然アミノ酸導入の新しい方法論を確立し、人工タンパク質の合成へのブレイクスルーと RNA ナノテクノロジーの開発を目指す。

2. 研究成果

A. キラリ選択的アミノアシル化メカニズムの解明

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応は、L-アミノ酸を D-アミノ酸より優位に結合する(約4倍の差)が、この差は繰り返し反応が起こることを考慮すれば、天然のタンパク質が L-アミノ酸から構成されている謎についての理由を説明可能である。しかし、この系における L-アミノ酸の識別メカニズムについては明らかになっていなかった。このメカニズムを明確にするために、アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応の詳細な検討を行った。

まず、この系はアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドとミニヘリックスとが、架橋オリゴヌクレオチドを介して近接することによって起こる。5'-リン酸基にアミノアシルリン酸結合を介してつながっているアミノ酸は、高エネルギー状態にあり、このアミノ酸は何もしなければ、加水分解されるが、近接位置に水に代わる官能基が存在すれば、その位置への結合の転移が起こりうる。丘を下るが如くの、いわゆる downhill reaction であり、その可能性の場としては、ミニヘリックスの 3' 末端アデノシンの 2'-OH か 3'-OH の部位がその candidate となる。しかし、この反応は、3'-OH にしか起こらないことが分かった。これは、反応部位が自由な環境にあるのではなく、極めて空間的に制限を受けた形で構成されていることに由来する。これを可能にするのが、架橋オリゴヌクレオチドによって二重らせん様構造 (Extended Double Helix 構造と呼ぶ) が作られているからであり、これらを構成するヌクレオチドは C3'-endo 型のパッカーリングコンフォメーションを取っていることが明らかになった。アミノアシル化部位に最近接した位置のオリゴヌクレオチドの塩基配列置換体 (G-T、G-U、I-T、G-T(2'-O-CH₃)) を用いた実験から、D-アミノ酸

側鎖の立体障害が反応性の低さを説明することが示唆されたが、そのモデルは実験結果を矛盾なく説明することができた。ただし、I-Tの場合において、Iのケト・エノール変換の影響については、今後、検討して行く必要がある。また、L-アミノ酸、および、D-アミノ酸の双方を用いて、反応系を構成する分子の構造解析に向けた試みを現在進行中である。

B. アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いた tRNA の新規アミノアシル化法の開発

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応を tRNA に応用することを試みた。tRNA もミニヘリックスと同様に 3' 末端部分に CCA という一本鎖配列を有しており、架橋オリゴヌクレオチドによって、ミニヘリックスと同様の反応が起こると期待できる。しかも、L-アミノ酸は D-アミノ酸より優位に結合するすとは言え、D-アミノ酸は結合されないわけではないので、ドナー側のアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを大量に使用することで、どのようなアミノ酸にも利用できる tRNA のアミノアシル化法の開発を目指した。

まず、非天然蛍光アミノ酸である β -[benzo[b]acridin-12(5H)-on-2-yl]-L-alanine をサブプレッサー tRNA にアミノアシル化することに成功した。さらに、非天然アミノ酸を含む複数のアミノ酸をアンバーサブプレッサー tRNA に導入することに成功し、得られたアミノアシル-tRNA を、3 番目のコドンをストックドン(アンバーコドン)に変換した eGFP 発現プラスミドを含む大腸菌の S30 *in vitro* translation 系に導入したところ、従来の方法では、わずか1種類のアミノ酸の導入だけでも容易でないのに対し、20 種類の天然型 L-アミノ酸のすべてに加え、D-アミノ酸を5種類、さらに、非天然アミノ酸を2種類の、計 27 種類のアミノ酸を eGFP に導入することに成功した。これらは、eGFP が持つ 509nm の蛍光検出を行うことで確認した。

このアミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いたアミノアシル化法を用いた、非天然アミノ酸導入タンパク質の合成法の問題点として、バックグラウンドの高さが顕著に現れることが明らかになった。これに対処するために、アクセプターステム中に C1-G72 塩基対を導入した tRNA を大量に調製する必要が生じた。T7RNA ポリメラーゼによる転写は G がスタートでないと、その効率が著しく落ちるため、C1 でスタートする tRNA の上流に、この C1 の 5'-リン酸基を残すように切断するリボザイムの配列を有する RNA トランスクリプトを転写するシステムを構築した。現在、このリボザイムの切断活性を最適化するための条件を検討していると同時に、G1-C72 塩基対を導入した tRNA を用いたアミノアシル化効率の向上を試みている。

C. ナノ古細菌のアミノアシル化システムの解明と分子認識

現在の生物系における tRNA のアミノアシル化システムがどのように進化してきたのかを明らかにするために、最小のゲノムサイズを持つ古細菌であるナノアーキア (*Nanoarchaeum equitans*) のアミノアシル化過程の解析を行った。まずはアラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS) とグリシル tRNA 合成酵素 (GlyRS) の遺伝子を、ナノアーキアのゲノム DNA からクローニングし、大腸菌内でのこれらのタンパク質の発現系を構築した。ナノアーキアの AlaRS は α 、 β 、2 つのペプチドに分断されてコードされているが、 α 、 β 、および、その変異体のタンパク質発現系を構築し、得られたタンパク質と tRNA^{Ala} トランスクリプトを用いたアミノアシル化活性の測定を行った。その結果、ナノアーキアの AlaRS は α 、 β の両方が存在しないとアミノアシル化が起こらないこと、および、 β は全長でなく、N 末端側の約 100 アミノ酸残基 (β') だけで、全長と同程度のアミノアシル化への寄与をすることが明らかになった。さらに、 β ドメインの最小化

をはかるために、新たな変異体(β'')の構築を行った。GlyRSによるtRNA^{Gly}の認識機構について研究を行った結果、tRNA^{Gly}のディスクリミネーター塩基、アクセプターステム中の塩基対、および、アンチコドン2文字目、3文字目がGlyRSによって認識されていることが明らかになった。しかし、これらの塩基の認識の度合いは、他の生物のGlyRSによる認識とは違っていることが明らかになった。また、グリシルtRNA合成酵素(GlyRS)とアラニルtRNA合成酵素(AlaRS)についての機能最小化の解析を継続的に行っており、特に、GlyRSのCCD(Catalytic Central Domain)について、*T. thermophilus*のGlyRSとの相違を発見した。

3. 今後の展開

本研究の典型的な応用は、新規人工タンパク質の作製であろう。上記のオリゴヌクレオチドを用いたアミノアシル化の系を利用して、少数の限られたアミノ酸に留まらず(従来の aaRS の変異体を用いた方法では、天然に似たようなアミノ酸しか導入できない)、任意のアミノ酸を有効に容易に tRNA にアミノアシル化することが可能になり、また、さまざまな RNA に見られる高次相互作用を、アミノ酸と RNA の新規相互作用、及び、金属イオンを介した新しい相互作用、Kissing 相互作用などと組み合わせることにより、新たな超分子 RNA ナノテクノロジーの創製にもつながる可能性があろう。これらは RNA 超分子形成機構の解明とも相まって、将来的な創薬などをも見据えた社会への貢献は大きい。また本研究は、RNA が持つ本質的な分子認識機構を解明することも目指しているため、純粋な科学としての観点からも極めて重要であり、医療技術等の応用につながると同時に、生命の起源の謎の解明にもつながる基礎研究になる可能性もある。

4. 自己評価

さきがけ研究期間で、今後につながる数々の結果が得られた。文字通り「さきがけ」としての取っ掛かりはつかめたが、まだ詳細に至る詰め段階には到達していない。当然ながら、当初の目標に対して、十分でない点多々あることも否めない。以下、具体的に、それらを記載したい。

キラル選択的アミノアシル化メカニズムの解明に関しては、実験結果を矛盾なく説明するモデルを作成することができたが、このモデルは極端に単純化した状態を説明しているに過ぎない可能性がある。Extended Double Helix を構成しているであろう反応システムにおいて、モデルが主張している結果が正しいのかどうかには、最終的には X 線結晶構造解析などの構造生物学的な解析が重要である。当初の目標においてもこれを掲げていたが、不安定な実際の反応系をミミックする安定物質のアナログ合成に思いのほか手間取り、この点についての進展は余りなかった。今後、これらについて、研究を進めていきたい。

アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを用いた tRNA の新規アミノアシル化法の開発については、複数のアミノ酸に対して、普遍的に使える可能性は示唆できたが、まだまだ実用段階にはほど遠い状況である。今後、反応条件の最適化を行い、効率的に tRNA のアミノアシル化とタンパク質合成が行えるようにしていきたい。

ナノ古細菌のアミノアシル化システムの解明と分子認識に関しては、いくつかの個々の系においては、個々の認識機構の一端を明らかにすることができた。しかしながら、あくまでも

一端に過ぎないので、今後は、全貌の解明に努力したい。そして、その延長線上には、やはり、生命が単純な系からどのように現在の系になっていったのかという、生命の本質の理解があると思う。

「知を愛する」というところから来ている科学の歴史を鑑み、即効的に目に見えるような技術だけではなく、科学の成果というものは、知的文化、知的遺産といった人類共通の文化の構築の点からも捉えるべきであろう。その意味でも、本研究の発展は人間の知的好奇心にも訴えるに違いないと信じている。

5. 研究総括の見解

本研究は、RNA ワールドからの生命の進化の過程を想定しつつ、tRNA のアミノアシル化の進化過程を解明し、RNA がヌクレオチドレベルで示すキラル選択性や分子認識・識別メカニズムを明らかにすることを目的としている。同時に、この機構を利用した非天然アミノ酸導入の新しい方法論を確立し、人工タンパク質の合成や RNA ナノテクノロジーの開発を目指している。アミノアシル-p-オリゴヌクレオチドを利用したミニヘリックスのアミノアシル化反応では、L-アミノ酸が D-アミノ酸より約4倍優位に結合する。この実験結果を矛盾なく説明するモデルを作成したことは、高く評価出来る。また、多くのアミノ酸に利用できる tRNA のアミノアシル化法の開発にも成功し、普遍性を与えたことは、今後の応用研究にとって重要である。さらに、ナノ古細菌を使用して、現在の生物系における tRNA のアミノアシル化システムへの進化を研究中である。当研究者の研究は、生命の起源・進化に原点を置いており、常に地球レベルの環境の影響を視点に入れている点が特徴であり、豊かな創造性に繋がっている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Tamura, K. Ribosome evolution: Emergence of peptide synthesis machinery. <i>Journal of Biosciences</i> , Vol. 36, 921-928, 2011 |
| 2. Tamura, K. Molecular Basis for Chiral Selection in RNA Aminoacylation. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , Vol. 12, 4745-4757, 2011 |
| 3. Tamura, K. Peptide Bond Formation: RNA's Big Bang. <i>Journal of Cosmology</i> , Vol. 13, 3800-3810, 2011 |
| 4. Tamura, K. Amino Acid Homochirality and the RNA World: Necessities for Life on Earth. <i>Journal of Cosmology</i> , Vol. 5, 883-889, 2010 |
| 5. Tamura, K. Molecular handedness of life: significance of RNA aminoacylation. <i>Journal of Biosciences</i> , Vol. 34, 991-994, 2009 |

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

1. 田村浩二、RNA ワールドと生命における L-アミノ酸の起源、理研・千葉工大共催シンポジウム「生命システム原材料の起源と進化：生体分子は如何にして作られたか？」(2011.11.26)
2. 田村浩二、地球上の生物が左利きアミノ酸を使うようになった理由についての一考察、明治大学科学技術研究所・2011 年度 第 2 回公開講演会「ケミカルバイオロジー研究の地平線」(2011.10.22)
3. 田村浩二、RNA のキラル選択的アミノアシル化と識別メカニズム、千葉工業大学・第8回構造生物学セミナー (2010.7.9)
4. 田村浩二、アミノ酸のホモキラリティーの起源：RNA ワールドの立場から、弘前大学・第 65 回遺伝子実験施設セミナー (2009.9.29)

主要な学会発表

1. 阿留多伎美沙, 榎原琢哉, 田村浩二、ナノアーキアAlaRSによるtRNA^{Ala}の認識機構の解明、第 34 回日本分子生物学会年会 (2011.12.14 横浜)
2. 田村浩二、RNA ワールドとアミノ酸のキラル選択性の起源、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (2010.12.8 神戸)
3. 田村浩二、アミノ酸ホモキラリティー選択性の分子基盤、第 35 回生命の起原および進化学会学術講演会 (2010.3.16 函館)
4. 田村浩二、アミノ酸のホモキラリティーの起源と tRNA のアミノアシル化、第 82 回日本生化学会大会 (2009.10.24 神戸)
5. Tamura, K. Molecular basis for chiral-selective aminoacylation of an RNA minihelix. International Meeting on Fluorinated-Peptide Chemistry, Ochanomizu University, Tokyo (2008.11.4)

著作物

1. Tamura, K. Amino Acid Homochirality and the RNA World: Necessities for Life on Earth. Origins, Abiogenesis and the Search for Life (2010.10 Edited by Michael Russell, Cosmology Science Publishers, Cambridge, MA)
2. 田村浩二、アミノ酸の非対称性の起源：RNA ワールドの観点から、生物物理, Vol. 50, 180-181, 2010

研究報告書

「核内 mRNA 型ノンコーディング RNA が関わる新規細胞内プロセスの解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：中川 真一

1. 研究のねらい

高等真核細胞で発現している「mRNA 型ノンコーディング RNA」(以下、現在主に使われている名称である「長鎖ノンコーディング RNA」を用いる)のなかには、転写産物が細胞質に運ばれず核内に蓄積するという非常にユニークな性質を示すものがいくつか知られている。本研究では、これら核内長鎖ノンコーディング RNA という新しいカテゴリーの分子群に注目し、その生理的な機能を明らかにすることで、これまでに知られていなかったような新規の核内プロセスを解明することを目指した。

2. 研究成果

研究を開始した当初、核内長鎖ノンコーディング RNA の生理機能については、Xist などエピジェネティックな発現制御にかかわる一部の遺伝子を除けば、ほとんど分かっていなかった。そこで、核内長鎖ノンコーディング RNA の中でも特に発現量の多い Gomafu、Malat1、MENε/β の三種類の核内ノンコーディング RNA に注目し、それらのノックアウトマウスを作製してその表現型を解析することにした。

(1) 新規核内構造体を形成する Gomafu の機能解析

Gomafu は神経系において細胞タイプ特異的に発現する遺伝子をスクリーニングする過程で同定された全長約 9 kb の長鎖ノンコーディング RNA で、発生期から成体まで神経系で強い発現が見られ、その転写産物は核内で新規構造体を形成している(Sone et al., J Cell Sci 120, 2007)。Gomafu の生理機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作製したところ、発生過程に異常は見られず、生殖能力もあることが分かった。しかしながら、Gomafu は発生期のみならず成体の神経系でも強い発現が見られることから、神経系の機能に何らかの異常が見られることが期待された。そこで各種行動実験を行ったところ、基礎活動量が増加するという表現型が観察された。また、これらの表現型は、覚醒剤の連続投与により顕著に増強されることが分かった(論文投稿準備中)。

次に、Gomafu の分子機能を明らかにするため、Gomafu と特異的に結合する蛋白質を同定することを試みた。まず、異なる種間の Gomafu で高度に保存されている配列があるかどうかを調べるために、ニワトリの Gomafu 遺伝子を同定することにした。ニワトリのゲノムデータベースを BLAST 検索したところ、マウスおよびヒトの Gomafu と相同配列を持つ遺伝子は見つからなかった。一方、EST データベースを検索したところ、ニワトリ 15 番染色体のシンテニー領域が活発に転写されていることが明らかになった。この遺伝子は主に神経系で発現しており、転写産物が核内に局在していたことから、ニワトリの Gomafu であると考えた。ニワトリの Gomafu とマウスの Gomafu の配列を比較したところ、通常の BLAST アルゴリズムでは相同配列は見つからなかったものの、より短い保存配列を抽出することのできる MIMIC アルゴリズムを用いたところ、UACUAAC という7塩基の配列がタンデムに存在することが分かった。次に、

このタンDEM繰り返し配列に結合する蛋白質をアフィニティー精製によって同定したところ、イントロンのブランチ部位結合タンパク質であるSF1が特異的に結合することが分かった。さらに、SF1がGomafuに結合するかどうかをCLIP法を用いて調べたところ、実際に細胞内でSF1とGomafuが結合していることが明らかとなった。UACUAACは出芽酵母イントロンの保存ブランチ部位配列として知られており、SF1に対して高アフィニティーで結合する。一方、マウスを含む脊椎動物においてはブランチ部位の配列は保存されておらず、SF1に対してより低いアフィニティーでしか結合しないことが報告されている。これらの事実は、GomafuがSF1と競合的に結合し、内在イントロンのスプライシング反応を阻害している可能性を示している。この仮説を検証するために、*in vitro* スプライシング反応系にGomafuのリピート配列を含むRNA断片を加えたところ、弱いブランチ部位配列を持つIgMのpre-mRNAのスプライシング反応速度が低下することが分かった。一方、アデノウイルスMINX第一イントロンのように強いブランチ部位配列を持つpre-mRNAのスプライシングは影響を受けなかった。これらのことから、GomafuはSF1と競合的に結合することで、弱いブランチ部位配列を持つイントロンのスプライシング反応を阻害することが予想された(Tsujii et al., *Genes Cells* 16, 2011)。

続いて、Gomafuが形成している複合体の構成因子をさらに明らかにするため、高発現量のRNA結合タンパク質に対してデザインしたカスタムsiRNAライブラリーを作製し、特定の遺伝子をノックダウンしたときにGomafuの存在量や局在が変化するかどうかを調べた。その結果、Celf3と呼ばれるスプライシング因子をノックダウンするとGomafuが不安定化すること、また、Celf3はGomafuと直接結合していることなどが分かった(投稿準備中)。また、このライブラリーを用いて、Xistの染色体局在化因子を同定することを試みた。Xistは、哺乳類のメス個体において2本あるうちの片方のX染色体から発現し、染色体全体を覆い尽くし、クロマチン修飾酵素を呼び込むことで染色体レベルでの不活性化を制御している。しかしながら、どのようにしてこの長鎖ノンコーディングRNAがX染色体上に結合するのか、そのメカニズムは長年の謎であった。そこで、上記のsiRNAライブラリーを用いてXistの局在を変化させる遺伝子をスクリーニングしたところ、核マトリクス蛋白質として知られていたhnRNP Uをノックダウンすると、Xistが染色体から解離することが分かった。また、Xistの染色体上への局在にはhnRNP Uが持つRNA結合ドメインとDNA結合ドメインの両方が必要なこと、hnRNP Uをノックダウンした細胞では不活性化X染色体の形成に異常が起きることなどが分かった(Hasegawa et al., *Dev Cell* 19, 2010)。

(2) 核内構造体パラスペックルを形成する長鎖ノンコーディングRNA、MEN ϵ/β の機能解析

高等真核生物の核内には核小体をはじめとする核内構造体が多数存在しており、特異的な核内プロセスを制御している。パラスペックルは比較的最近になって同定された核内ボディであり、長鎖ノンコーディングRNAであるMEN ϵ/β がその骨格として機能している。生体内におけるパラスペックルの機能を明らかにするためにMEN ϵ/β のノックアウトマウスを作製したところ、意外なことに通常の飼育条件下では表現型を示さないことが明らかとなった。また、MEN ϵ/β の発現解析により、従来ユビキタな構造体と思われていたパラスペックルが、生体内ではごく一部の細胞でしか形成されていないことも明らかとなった。これらの結果から、パラスペックルは特殊な条件下でのみ機能する核内構造体であることが予想された(Nakagawa et al., *J Cell Biol* 193, 2011)。

(3)核スペckルに局在する長鎖ノンコーディング RNA、Malat1 の機能解析

Malat1 はスプライシング因子の貯蔵庫と考えられている核スペckルに局在する長鎖ノンコーディング RNA で、SRファミリー蛋白質の核スペckル局在を制御するほか、ガン細胞の増殖や血清応答、神経細胞のシナプス形成など多様な現象に関わっていることが培養細胞を用いた研究によって明らかにされている。そこで、Malat1 の生体内における機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作製したところ、意外なことに、これまで培養細胞を用いて報告されていたような表現型は全く観察されず、核スペckルの構成分子の局在にも異常は見られなかった。一方、ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞および消化管の一部の細胞において、パラスペckルの骨格因子である MEN ϵ/β の発現が減少し、パラスペckルの数や大きさが減少することが明らかになった。これらのことから、Malat1 は、MEN ϵ/β 同様、通常的环境下では必須ではないが、一部のガン細胞など特定の細胞でのみ機能する遺伝子であることが予想された(論文投稿中)。

3. 今後の展開

本研究の主な成果として、以下の二つがあげられる。一つは、エピジェネティックな発現制御に関わる長鎖ノンコーディング RNA が染色体と相互作用するための分子基盤が明らかになったことであり、もう一つは核内長鎖ノンコーディング RNA が動物の行動などの高次生命現象を制御していることが明らかとなったことである。そのそれぞれについて、今後、以下のような展開が期待される。

1)エピジェネティックな発現制御に関わる長鎖ノンコーディング RNA の作用機序の解明

哺乳類においては、Xist以外にも、染色体上に局在してクロマチン修飾の状態を変化させる長鎖ノンコーディング RNA が複数知られており、それらの多くはインプリンティングを初めとするエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わっている。hnRNP U はそれらの長鎖ノンコーディング RNA の染色体上への局在も制御しているという予備的な結果が得られており、hnRNP U が形成する複合体の機能解析を進める事によって、エピジェネティックな発現制御に関わる長鎖ノンコーディング RNA の作用機序が明らかになることが期待される。エピジェネティックな発現制御に関わる長鎖ノンコーディング RNA の中には特定のガン細胞で発現が大きく変化するものも知られており、発ガンに至る新しい分子メカニズムが解明されることも期待される。

2)長鎖ノンコーディング RNA と精神疾患の関連の解明

本研究によって、新規核内長鎖ノンコーディング RNA である Gomafu を欠損するマウスにおいて、基礎活動量が増加し、さらに覚醒剤の連続投与に対する感受性が著しく更新することが明らかとなった。これらの発見は、Gomafu の異常が多動性障害などの精神疾患の原因となっていることを示唆しており、各種精神疾患の患者における Gomafu の発現や変異を調べることに今後重要となってくると思われる。これまで、精神疾患研究のほとんどは蛋白質の異常に注目したものであったが、Gomafu を含めた長鎖ノンコーディング RNA に注目した研究を推進することによって、あらたな分子病態が明らかとなることが期待される。

4. 自己評価

新規核内長鎖ノンコーディング RNA が全く新しい分子プロセスを制御しているのではないか

ということを期待して研究を進めてきたが、結果として分かったのは、それらがスプライシングの制御や核内構造体の形成制御など、大きなカテゴリーとしては既知の分子プロセスを制御しているということであった。その点に関しては、目標は達成できなかったといえる。しかしながら、研究の副産物ながら、これまで長年の謎とされてきたエピジェネティックな発現制御に関わる Xist の染色体上への局在を制御するメカニズムが明らかとなったことは、大きな成果であると言える。また、培養細胞を用いた実験で必須遺伝子と考えられてきた Malat1 と MEN ϵ/β のノックアウトマウスが、通常の飼育環境下で全く異常を示さなかったという結果も、関連研究分野の研究者からは大きな驚きを持って迎えられた。今後は、どのような環境下で長鎖ノンコーディング RNA が必要となるのか、それを明らかにする事が重要になると思われるが、そのような研究の方向性を示すことが出来たという点で、重要な貢献が出来たと考えている。

5. 研究総括の見解

本研究では、核内に蓄積する長鎖ノンコーディング RNA に着目し、その生理機能の解明と新規の核内プロセスの解明を目指した。発現量の多い Gomafu, Malat1, MEN ϵ/β に注目し、ノックアウトマウスを作製し、表現形を解析したところ、Gomafu については、基礎活動量が増加することが観察されたが、Malat1 および MEN ϵ/β については、何も観察されなかった。後者については、特定の細胞でのみ機能する遺伝子であることが予想されるが、どのような環境下で必要となるのかを明らかにすることが重要である。Gomafu についての解析はさらに進み、特異的結合タンパク質は、イントロンのブランチ部位結合タンパク質である SF1 であることを明らかにした。また、Gomafu が形成している複合体の構成因子として、スプライシング因子 Celf3 を同定した。同様の方法を用いて、Xist の染色体上への局在には hnRNP U が持つ RNA 結合ドメインと DNA 結合ドメインの両方が必要なことを示した。非常に苦労した研究課題であったが、長年の謎であったエピジェネティックな発現制御に関わる Xist の染色体上への局在を制御するメカニズムを明らかにしたことは、評価出来る。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tsuiji H, Yoshimoto R, Hasegawa Y, Furuno M, Yoshida M, Nakagawa S. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor 1. *Genes Cells* 16 (5), p479-490 (2011).
2. Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. *J Cell Biol* 193 (1), p31-39 (2011).
3. Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Tsutui K, Nakagawa S. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev Cell* 19 (3), p469-476 (2010)

(2) 特許出願

該当無し

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

Nakagawa, S. "Functional analyses of nuclear enriched abundant long noncoding RNAs" 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜、2011年12月。

Nakagawa, S. "Nonessentials for nothing?-Nuclear bodies paraspeckles are not essential for animal's life" 第63回日本細胞生物学会大会シンポジウム、札幌、2011年8月。

中川真一「大量に蓄積する核内ノンコーディングRNAの機能解析-Gomafuを例にとつて」第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) シンポジウム、神戸、2010年12月。

中川真一「核内長鎖ノンコーディングRNA Gomafuは動物の行動を制御する」第12回日本RNA学会年会、東京、2010年7月。

中川真一「新規核内高分子ノンコーディングRNA Gomafuの機能解析」第82回日本生化学会大会シンポジウム、神戸、2009年10月。

Nakagawa, S. "Functional analysis of a novel mRNA-like noncoding RNA Gomafu", 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会合同大会シンポジウム、神戸、2008年12月。

総説(査読あり)

Ip JY and Nakagawa S. Long non-coding RNAs in nuclear bodies. **Dev Growth Differ**, in press (2011)

Hasegawa Y and Nakagawa S. Revisiting the function of nuclear scaffold/matrix binding proteins in X chromosome inactivation. **RNA Biol** 8(5), in press (2011)

Nakagawa S and Prasanth KV. eXIST with matrix-associated proteins. **Trends Cell Biol** 21(6), p321-7 (2011)

総説(査読なし)

中川真一 核内構造体に活躍の場を求めたノンコーディング RNA たち 細胞工学, 734-739 (2011)

中川真一、影山裕二 長鎖 ncRNA 研究のはじまりの終わり 実験医学, 29 (11),1702-1707 (2011)

中川真一 進化的に「新しい」バイオマテリアル-核内長鎖 noncoding RNA に何が出来るのか 実験医学増刊号「RNA 研究の最先端」(7), 24-29 (2010)

中川真一 核内高分子ノンコーディング RNA の世界 生化学, 82 (1), 42-46 (2010)

中川真一 核内長鎖 non-coding RNA. 実験医学増刊号「RNA の機能解明と医療応用」第2章 (7), 94-98. (2008)

中川真一 大量の核内長鎖 non-coding RNA が語るもの. 蛋白質核酸酵素 53 (15), 1932-19939. (2008)

各種研究集会における招待講演

中川真一「核内長鎖ノンコーディングRNAと疾患との関連」第9回RCGMフロンティアシンポジウム「遺伝子発現制御とRNA-基礎と臨床をつなぐ分子」、埼玉医科大学、2011年11月。

Nakagawa, S. " Long nuclear-retained noncoding RNA Gomafu controls behavior of animals", 4th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2010), Okazaki, Japan, Nov. 2011.

Nakagawa, S. " A long noncoding RNA Gomafu regulates behavior of animals", RiboClub Annual Meeting 2010, Cheribourg, Canada, Oct. 2011.

研究報告書

「mRNP リモデリングによる mRNA の活性制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：松本 健

1. 研究のねらい

mRNA は真核細胞内ではつねに特定の蛋白質と mRNP を形成しているので、mRNA の翻訳活性や安定性の変化には、mRNP の構造変化 (mRNP リモデリングと呼ぶ) を伴う必要がある。本研究は、mRNA の代謝に重要な細胞質での mRNP のリモデリングが、どのような因子によって担われ、どのような機構でおきるのかを解明することをゴールとする。本研究ではこれまでに研究者がみいだした YBAP1 を mRNP リモデリング因子の候補と考え、細胞内でも mRNP の構造や活性を変化させる活性をもつかどうか調べた。また、mRNP 構成因子の量の調節や修飾による mRNP リモデリングを介した翻訳制御の機構解明をめざした。

2. 研究成果

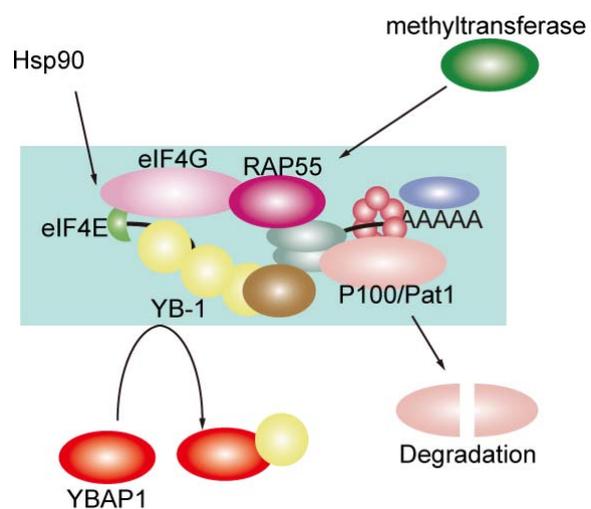
高等真核細胞の mRNP を構成している蛋白質は数多いが、我々のグループを含めたこれまでの研究の結果、翻訳が抑制された状態の mRNP には Y-box 蛋白質、poly(A)結合蛋白質(PABP)のほか、RAP55、RCK、Pat1、4E-T などの翻訳抑制因子が結合していることが示されている。これらの蛋白質の量や活性の調節が mRNP の構造変化を誘導し、mRNA 安定性や翻訳活性を調節すると考えられる。さらに特定の mRNA に親和性高く結合する RNA 結合蛋白質が mRNA 特異的に mRNA 代謝や翻訳活性調節に関わる。

そこで本研究では以下の課題に取り組んだ。

(1) Y-box 蛋白質の YBAP1 による活性調節

YBAP1 は Y-box 蛋白質 YB-1 に結合する酸性蛋白質である。以前の試験管内での実験より、YB-1 と mRNA だけからなるモデル mRNP から YB-1 を一部はがすことで、このモデル mRNP の翻訳活性を上昇させることがわかってきた。そこで細胞内でも同様の活性をもつかどうか検討した。細胞に YB-1 を高発現するとレポーター mRNA が安定化されるが、同時に YBAP1 を高発現することで、この mRNA 安定化(分解抑制)が一部阻害されることがわかった。しかし YB-1 高発現により同じレポーター mRNA の翻訳は抑制されたが、YBAP1 高発現によっても翻訳活性は回復しなかった。

次に、MS2 蛋白質の結合配列を付加したルシフェラーゼレポーター mRNA と、MS2-FLAG 蛋白質を共発現した細胞の抽出液から、抗 FLAG 抗体での免疫沈降によってレポーター



mRNAをもつ mRNP を調製した。この mRNP 画分には YB-1、PABP など既知の mRNP 構成因子が含まれており、ルシフェラーゼ mRNA を含む一方で GAPDH や β -アクチンなど細胞に豊富に存在する mRNA は殆ど含まなかった。このルシフェラーゼ mRNP と YBAP1 をインキュベートした後、ショ糖密度勾配遠心で分画すると、YB-1 が mRNP から外れて、軽い画分に移動した。この結果は、YB-1/mRNA 複合体だけではなく、細胞から単離した mRNP においても YBAP1 が YB-1 を mRNA から外す活性を持つことを示す。

(2) P100 蛋白質の分解による翻訳活性制御

P100 蛋白質はアフリカツメガエル卵母細胞特異的な蛋白質で、出芽酵母の Pat1 と相同性を持つ。カエル卵母細胞抽出液で Y-box 蛋白質と同じ mRNP に含まれていたため、P100 の機能を調べた。P100 は卵母細胞の細胞質に卵母細胞成長初期から存在するが、卵成熟ホルモンの刺激後、核膜崩壊とともに消失した。脊椎動物には Pat1 のホモログが 2 種類 (Pat1a と Pat1b) 存在し、P100 は Pat1a に相当する。カエル Pat1b 蛋白質は卵母細胞成長後期から発現し、卵成熟過程、初期胚を通じて存在した。つまり卵成熟を境に Pat1a と Pat1b の置き換えが起きていた。レポーター mRNA を用いた実験から P100 は卵母細胞内で翻訳抑制因子として働き、卵成熟過程で翻訳が開始される必要がある *c-mos* やサイクリン B1 mRNA に結合していることがわかった。そこで P100 の消失がこれらの mRNA の翻訳を介して卵成熟の進行に必要なのではないかと予想した。大量の P100 mRNA を卵母細胞に注入し P100 蛋白質を増やした後に卵成熟ホルモンで刺激すると、卵成熟が顕著に遅延していた。このとき高発現した P100 は消失しなかった。卵成熟遅延の原因を探るため *c-Mos* やサイクリン B1 蛋白質の発現を調べると、P100 高発現した卵母細胞ではコントロールに比べ、これらの蛋白質の発現開始の遅れと発現量の低下が見られた。P100 に対するモルフォリノオリゴヌクレオチドを注入した後に卵成熟ホルモンで刺激すると、注入した mRNA から発現した P100 は内在の P100 と同様に速やかに消失した。つまりこれらの結果は、P100 が卵成熟ホルモン刺激によって速やかに分解・消失することが、卵成熟進行に必要な mRNA からの翻訳にとって必須であることを示している。

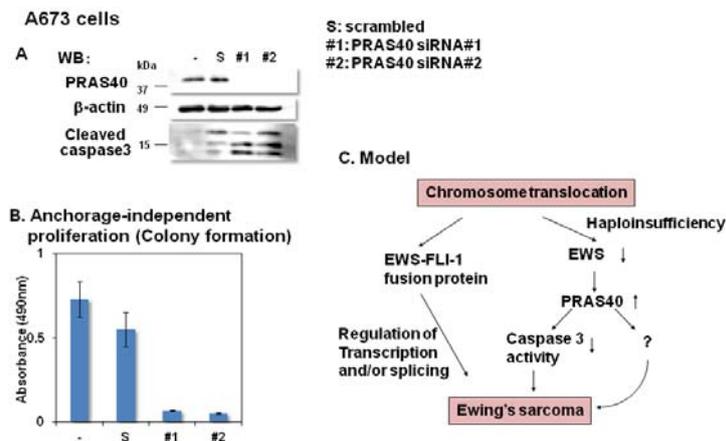
(3) Hsp90 の分子シャペロン機能による調節

過去の報告により、Argonaute2(Ago2)が Hsp90 と結合すること、および Hsp90 阻害剤ゲルダナマイシン(GA)で細胞を処理すると Ago2 蛋白質が減少することが知られていた。また、Hsp90 β 遺伝子破壊株の解析より、Hsp90 が IgM の翻訳に関わる可能性が考えられた。そこで GA 処理により、翻訳開始因子の相互作用や局在に影響がみられるかを検討した。その結果、GA 処理あるいは別の Hsp90 阻害剤であるラディシコールの処理により、細胞質 mRNP 顆粒である P-body をもつ細胞が約 50% まで減少した。一方、熱ストレスによって生じるストレス顆粒をいくつかのマーカー蛋白質に対する抗体で観察すると、顆粒が小さくなり、核周縁部への局在が細胞質全体へと変化した。また eIF4E と 4E-T が特異的にストレス顆粒から消失したが、eIF4G のストレス顆粒への局在は変化なかった。GA 処理により、4E-T のリン酸化が減少した。これは 4E-T のリン酸化に関わるキナーゼが GA によりフォールディングに支障を来し、不活化したものと考えられた。さらに m7GTP レジンへの結合で調べたところ、GA 処理した細胞では eIF4G の eIF4E を介したキャップへの結合が減少していることがわかった。

(4)mRNA 結合蛋白質による調節

EWS 遺伝子は、ユーイング肉腫患者の細胞で、染色体転座によって ETS ファミリー転写因子の FLI-1 遺伝子などと融合遺伝子となっていることから発見された。我々は、EWS 蛋白質の転写後調節に果た

す機能を検討した。レポーター mRNA に強制的に結合させる系において、EWS はレポーター mRNA からの蛋白質合成を抑制することが明らかになった。ユーイング肉腫は若年者の骨に発生する未分化で悪性度の高い腫瘍で、EWS/FLI-1 融合蛋白質が強力な転写因子として働くことにより腫瘍が引き起こされる。しかし、EWS/FLI-1 は単独でヒトの培養細胞をトランスフォームすることはできず、むしろアポトーシスを引き起こすので、EWS/FLI-1 だけでは腫瘍形成に十分でないと考えられる。肉腫細胞では多くても一つの染色体からのみ EWS が発現するので、EWS 蛋白質の量が少ない。上記の実験結果に基づき、EWS が結合している mRNA からの蛋白質発現が減少することが腫瘍形成に関係する可能性を追求した。EWS 蛋白質が細胞内で結合している mRNA をマイクロアレイによって網羅的に同定し、細胞増殖や発がんに関係しうること、かつ EWS 高発現によって産物である蛋白質の量が減少することを規準として PRAS40 mRNA に着目した。解析の結果、EWS は PRAS40 3' UTR に結合することで PRAS40 蛋白質の発現を負に制御していることがわかった。さらに、ユーイング肉腫細胞において PRAS40 をノックダウンすると、細胞増殖、遊走、浸潤能の低下が認められた。これらの結果より、PRAS40 はユーイング肉腫治療に向けたターゲットの一つになり得ると考えられる。



3. 今後の展開

本研究により、高等真核細胞の mRNP の主要な構成因子である Y-box 蛋白質の RNA 結合が YBAP1 によって制御されることがわかったが、YBAP1 がどのような分子機構によって YB-1 の RNA 結合を制御し、YB-1 を RNA から引きはがしているのかは明らかでない。この点は、YB-1-YBAP1 結合部位の詳細な解析、YB-1-YBAP1 複合体の構造解析などによって明らかにできるものと考えている。YB-1 以外の mRNP 構成因子も、分子シャペロンの機能や翻訳後修飾、時期特異的な分解などによって調節されている。これらがどのように翻訳や mRNA 代謝の制御に関わるかについての解析を進めるために、今後無細胞系の確立を目指して研究を進めたい。EWS の解析については、EWS が、結合する mRNA からの蛋白質発現をどのような機構で抑制しているのか、が大きな課題である。また、PRAS40 は mTOR キナーゼの活性を調節することが知られているが、その機能とユーイング肉腫細胞の増殖や遊走等の関わりについても明らかにしていくことによって、ユーイング肉腫克服に向けての基盤となる知見を得るこ

とをめざす。

4. 自己評価

YBAP1 が単純なモデル mRNP だけでなく、(1)細胞内でのレポーター-mRNP の mRNA 安定化調節に関わること、(2)細胞から調製した多種類の蛋白質を含む mRNP においても YB-1 を RNA からはがす活性を持つこと、がわかったので、YBAP1 が mRNP リモデリング因子として働くことを示すことができたと考えている。しかし、細胞抽出液を利用した mRNP リモデリングと翻訳、mRNA 安定化を観察する系を確立することはできていない。これは一つには、細胞から一種類の mRNP を安定に調製する事に非常に手間取ったためである。もう一つは、EWS 蛋白質の解析とその結合 mRNA の腫瘍細胞での機能解析に発展的に研究を展開したことによる。後者の研究では、RNA 結合蛋白質遺伝子の染色体転座に関わる腫瘍形成について新たな機構を提示し、結合 mRNA の網羅的同定によって肉腫細胞増殖にかかわる新たな因子を同定することができた。

5. 研究総括の見解

本研究は、mRNA の翻訳活性や安定性を制御する mRNP の構造変化(mRNP リモデリング)に関わる因子を明らかにし、新たな翻訳活性制御の機構を明らかにすることを目的とした。また、この制御機構を疾患の治療に応用することも目的とした。実際に、YBAP1 が YB-1 に結合活性を持ち、YB-1 を mRNA からはがすための mRNP リモデリング因子として働いていることを明らかにし、翻訳活性制御の新しい方法の存在を示したことは評価出来る。応用研究としては、PRAS40 がユースイング肉腫治療に向けたターゲットの一つになる可能性を示した。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- 1) Suzuki, Y., Minami, M., Suzuki, M., Abe, K., Zenno, S., Tsujimoto, M., Matsumoto, K., and Minami, Y.: The Hsp90 inhibitor geldanamycin abrogates colocalization of eIF4E and 4E-T into stress granules and association of eIF4E with eIF4G. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35597-35604 (2009).
- 2) Nakamura, Y., Tanaka, K. J., Miyauchi, M., Huang, L., Tsujimoto, M., and Matsumoto, K.: Translational repression by the oocyte-specific protein P100 in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, **344**, 272-283 (2010).
- 3) Huang, L., Nakai, Y., Kuwahara, I., and Matsumoto, K.: PRAS40 is a functionally critical target for EWS repression in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.*, Published Online First January 12, 2012; doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2254 (2012)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(招待講演)

- 1) 松本 健: 翻訳抑制因子の局在と活性調節、日本薬学会第 130 年会シンポジウム「RNA研究の最前線」、岡山、2010.3.

(総説)

- 1) 中村依子、松本 健(2009)カエル卵母細胞の貯蔵RNP複合体、蛋白質核酸酵素 増刊「mRNAプログラム」、54、2165-2170.

研究報告書

「HIV-1 転写伸長を制御する non-coding RNA の機能解析」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：水谷 壮利

1, 研究のねらい

HIV-1 は潜伏感染することで抗ウイルス薬、宿主の免疫学的排除から逃れることが知られている。HIV-1 の潜伏感染において特徴的なのは、HIV-1 の転写伸長が不完全に停止して生じたと考えられる短鎖の RNA が、潜伏感染化 T 細胞において検出される点にある。本研究ではこの短鎖 RNA の HIV の潜伏感染における存在意義を明らかにし、その分子機構を明らかにすることを旨ととも短鎖 RNA の生合成機構を明らかにすることで HIV-1 潜伏感染化のメカニズムの解明を目指した。

2, 研究成果

現在のAIDS治療において、抗レトロウイルス薬のカクテル療法(多剤併用療法)が非常に有効であり、AIDSはかつての不治の病から、治癒も可能な生涯付き合い続ける病気へと変わりつつある。多剤併用療法の処方により、血液中のウイルス量は検出限界以下となり、処方から二、三年で体内から完全にウイルスを除外できると当初は試算されたが、そのとおりにとはならなかった。原因は患者体内にはウイルスが活発に増殖するとされる活性型のCD4陽性T細胞以外にもウイルスが存在し続けることができる細胞があるからである。それらはウイルスを産生していない潜伏感染化状態にあり、薬剤や、免疫細胞が到達しにくいことが考えられた。HIV-1はCD4陽性T細胞やマクロファージ以外にも、免疫担当細胞が手を出せない、サンクチュアリともいわれる脳や精巣、網膜といった場所にもウイルスが存在し続けると考えられている。AIDS感染症を考える上で潜伏感染化ウイルスをどのように扱っていくかが重要である。そこで本研究ではHIVの潜伏感染に関与する宿主因子およびそのクロマチン環境を明らかにすることでHIVの潜伏感染化の分子機構の解明を試みた。

①Brm型SWI/SNF複合体はHIV-1 の転写伸張を正に制御する。

HIV-1 の LTR を備えたウイルスベクターを種々のがん細胞株に導入し、クローニングを行い、感染クローンの個々の発現レベルについて GFP を指標に解析した結果、HIV-1 ベクターは Brm を欠失した細胞株で際だってその発現が抑制を受けやすいことを見いだした。GFP の発現抑制を受けたクローンの HIV-1 ベクターの mRNA を調べてみると、転写は開始しているものの、転写伸張レベルが律速となっていることを明らかにした。HIV-1 の転写開始点直下にはヌクレオソームが形成されること

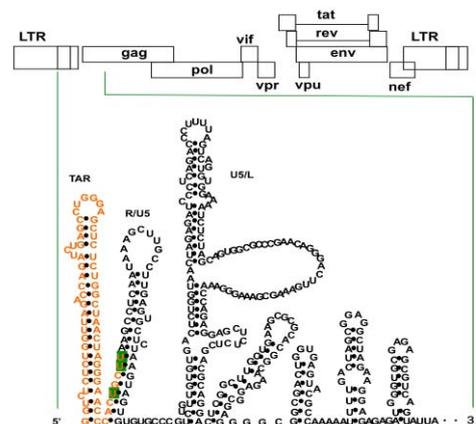


図1 HIV-1 RNA構造予想図とshort transcript (赤)

が知られているが、Brm 型 SWI/SNF 複合体はこのヌクレオソームの弛緩に必要であることを明らかにした。興味深い点として、Brm タンパク質は、HIV-1 が潜伏感染するとされる、静止期の T 細胞株においてその発現レベルが減弱していることを示し、Brm 型 SWI/SNF 複合体の枯渇という細胞内環境の変遷が HIV-1 の潜伏感染化に分子機構に寄与していることが考えられた。一方、Brm 欠失細胞株で見られた発現抑制を受けた HIV-1 の中途転写停止の mRNA の停止位置はおおよそ 60 nt であり、これは転写開始点直後に形成されるトランスアクチベーターである Tat タンパク質の結合部位である TAR のステムループが終わる部位近傍であることを RNase Protection assay 法により、明らかにした(図 1)。

②HEXIM1-7SK 複合体による HIV-1 short transcriptの生合成機構の解析

次に DNA から読み出された RNA は多くの RNA 結合性の核内宿主因子によって転写伸張およびスプライシング等の制御を受けることが知られている。HIV-1 は潜伏感染時に 60 nt ほど short transcript を作り、転写停止していることから潜伏感染化の律速段階は転写伸張レベルにあると考え、RNA 結合性の転写制御因子の存在を仮定し、その同定を進めた。この結果、hnRNP A1 依存的に HEXIM1-7SK 複合体が転写開始直後の short transcript を介してプロモーターに動員されることを明らかにした。HEXIM1-7SK 複合体は RNA Polymerase II の CTD のリン酸化の kinase である P-TEFb と結合することでその kinase 活性を不活化することが既に知られているが、本研究ではさらに転写伸張因子である TFIIIS (TCEA1/2) は HEXIM1 と相互作用し、HEXIM1-7SK 複合体によって不活化される証拠を得た。RNA Polymerase II は RNA 合成中に塩基の取り込み異常などが起きた時に転写を停止し、10 塩基ほど 5' 側に戻る現象が知られており (back track)、この時に TFIIIS は 3' 側の新生 RNA 鎖を切り出し、転写を再開させる機能があることが報告されている。そこで short transcript を後述する方法にて増幅し、その配列を次世代シーケンサーにて解析を行った。その結果、short transcript は 60 塩基を中心としたおおよそ 50 塩基から 70 塩基で停止していること(図 2)を明らかにすると同時に

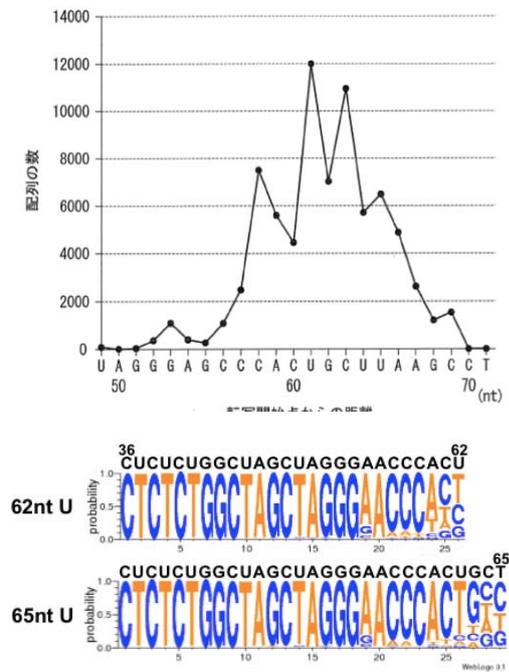


図3 short transcriptの配列解析

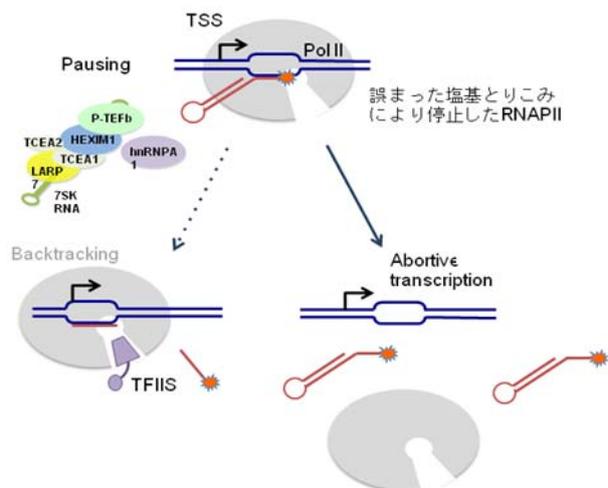


図4 HEXIM1-7SKによるHIV転写伸張阻害モデル

塩基の末端に 5-10 塩基ほどに誤った塩基の取り込みが起きており、RNA の取り込み異常を呈して停止していることを明らかにした(図 3)。この結果から HIV の short transcript の生合成機構のひとつの分子機構として HEXIM1-7SK 複合体が LTR から読まれている最中の short transcript に動員され、RNA polymerase II 複合体の直近において TFIIS を不活化することにより、転写の不完全な停止を引き起こしているモデルが考えられる(図 4)。

③HIV-1 short transcriptの効率的定量法の作製

HIV-1 感染症において、血液中のウイルス量は病態の程度や経過を把握する指標となり、治療開始の判断や抗ウイルス薬の効果判定、治療変更の判断などに利用される。とりわけHIV感染症の検査のうち、高感度法として現在、血中に存在するウイルスゲノムのRNA量を定量する核酸増幅検査法(以下、qRT-PCR)が一般的であり、抗原、抗体検査と併用して行われている。我が国では血清検体による測定が一般的であり、この検査キットは主に血清中に存在する HIV-1 のRNA を蛍光プローブにて検出する。この方法による急性感染期の患者の検査における問題点として主に以下の二点が挙げられる。

①血清中のウイルス量が検出閾値以上に達するまでに、平均で12日ほどをウイルス暴露から日数として必要とする(window period)。

②症例によっては感染していながらも極めて低値な血中ウイルスRNA量の場合、検出が困難となる場合や、逆にある頻度で偽陽性が生じることがある。

以上の問題点を解決する為にも現行のHIV検査法のさらなる確定感度、安定性を改善することは、window periodの短縮や、今後、世界的な方向性になりつつあるエイズ予防治験機構により昨年発表された臨床治験の結果が推奨するHIV早期発見、早期治療にも直結し、HIV感染者が右肩上がりが増加し続ける日本、ひいては発展途上国においても緊急性が高く、社会的要請が非常に強いことが示唆される。

本研究期間において、感染後、HIVが宿主ゲノムにインテグレートされた後に発現するおよそ 60 nt ほどの短鎖RNA(short transcript)が存在することを見だし、そのshort transcriptを簡便かつ効率的にTaqMan probeを用いた定量法を確立した(図5、6)。このshort transcriptはウイルスの発現初期段階で読まれていることに着目し、感染暴露直後の急性感染期の血中HIV検出

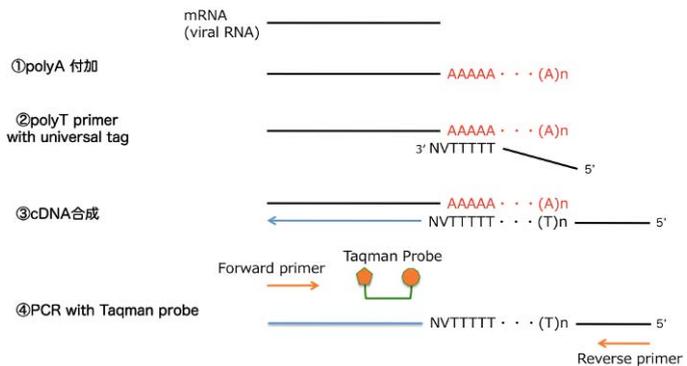


図5 HIV-1 short transcript 定量のためのPCR法の原理

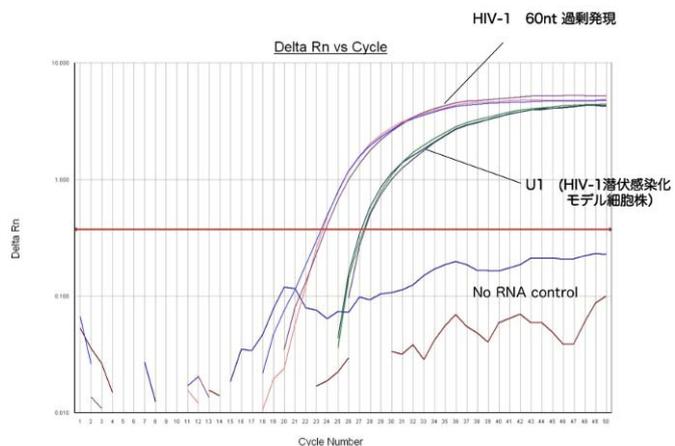


図6 Real Time PCRによるHIV-1 short transcript 検出法の結果

法としてwindow periodのさらなる短縮ができる可能性がある。一方、興味深い特筆すべき点として、この短鎖RNAはウイルスを産生していないと考えられる潜伏感染細胞でも検出されることにある。すなわち考案したshort transcriptを検出する方法論を用いることでこれまでにその挙動が未解明である感染者体内の潜伏感染細胞や潜伏ウイルスの挙動を数値化できる技術に発展する可能性があり、血液検査応用によるwindow periodの短縮化のみならず、現行では検出限界以下のウイルスの増殖をモニターすることで、カクテルに用いる抗ウイルス薬の是非についてもより効果的に選択出来るようになる可能性がある。また将来的には本方法と免疫染色等を組み合わせることで、各臓器、組織における治療中のHIVの潜伏先などが特定できるようになり、新たな治療戦略の礎となることが期待される。

3. 今後の展開

本研究結果より、一部のHIV-1の潜伏感染化の原因は転写開始ではなく転写伸張段階にあることを明らかにするとともに、転写伸張を抑制的に制御する宿主側因子を同定するとともに、その新規の転写抑制モデルを提案できた。さらにその分子機構は不明であるが、short transcriptの末端の配列は塩基の誤った取り込みが蓄積して転写停止していることを見いだした。しかしHIV-1のshort transcriptの末端配列の塩基の誤った取り込みがいつどのように起きているのかという新たな疑問が生まれ、この分子機構を明らかにすることで、より一層、潜伏状態のHIVの実態にせまれるのではないかと考えている。一方、short transcriptの検出法は実態の見えなかった潜伏感染化HIVを解析するツールとして今後さらに基礎研究を必要とするものの、臨床応用にも貢献できると考えている。

4. 自己評価

申請者の目標は機能性RNAとしてshort transcriptを位置づけ、HIV潜伏感染化におけるその機能を明らかにするというものであったが、当初の見込みの甘さからか、仮説を裏付けるデータを研究期間内で得られなかったことが反省点である。しかしサブテーマとして提案した、short transcriptの生合成機構については研究期間内にそれなりの進捗を得ることができた。特にshort transcriptを定量出来るようになったことが、研究進捗の上で大きかったと考えている。

この方法論はHIV感染症、ひいては他のウイルスを含め臨床検査技術に応用できる可能性があるという点で、さらなる基礎研究推進を進め、社会還元に貢献していきたい。

5. 研究総括の見解

HIV-1潜伏感染T細胞において、HIV-1の転写伸長が途中で停止して生じたと考えられる短鎖のRNAが検出される。本研究では、この短鎖RNAのHIV-1潜伏感染における存在意義を明らかにし、その生合成機構をも解明することを目的とした。しかしながら、この短鎖RNAを機能性RNAの一種と捉える努力が実らなかったことは残念である。一方、生合成機構の研究に関しては、ある程度の結果を得ている。特に、短鎖RNAの定量を可能にしたことは、これまで実態が不明であった潜伏感染化HIVを解析するツールとして期待される技術である。また臨床応用にも貢献できる可能性を示すところまで研究を進めたことを評価している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. ***Mizutani T**, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. J Virol. 83:11569-80. 2009

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 水谷 壮利

発明の名称: HIV 検出用オリゴヌクレオチド、HIV 検出キット、及び HIV 検出方法

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 2012/1/25

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. HIV-1 promoter is negatively regulated by hnRNP A1
水谷 壮利、石坂 彩、伊庭 英夫
第 59 回 日本ウイルス学会学術総会、国際微生物学連合 2011 会議、合同学会(2011.9.11-16)
2. RNA affinity tandem purification を利用した HIV-1 RNA 結合因子の探索
水谷 壮利、石坂 彩、伊庭 英夫
第 58 回 日本ウイルス学会学術総会(2010.11.7-9 徳島)
3. Analysis for the regulation of transcriptional elongation of HIV-1 transcript by proviral non-coding RNA
Taketoshi Mizutani, Aya Ishizaka, and Hideo Iba
第 10 回 あわじしま感染・免疫フォーラム (2010.9.7-10)

研究報告書

「small RNA とエピジェネティック制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：宮川 さとみ

1. 研究のねらい

RNA サイレンシングとは、small RNA(以下、小分子 RNA と表記)を介した遺伝子発現抑制機構であり、転写後抑制と転写抑制とが存在する。哺乳類において、小分子 RNA が、転写後抑制に重要な役割を担っていることはよく知られているが、転写抑制における機能は不明であった。しかし、我々は、マウス PIWI ファミリーが、piRNA (Piwi interacting RNA) とよばれる小分子 RNA を介して DNA のメチル化を制御し転写を抑制する、という新たなエピジェネティック遺伝子発現制御機構を見出した。本研究では、その成果を展開させ、小分子 RNA を介する遺伝子抑制機構、すなわちエピジェネティックな転写抑制機構の分子メカニズムの解明をおこなう。また、遺伝子欠損マウスや、欠損マウス由来の germ line stem cell (GS 細胞)を用いて、piRNA の生合成経路の解明をおこなう。

2. 研究成果

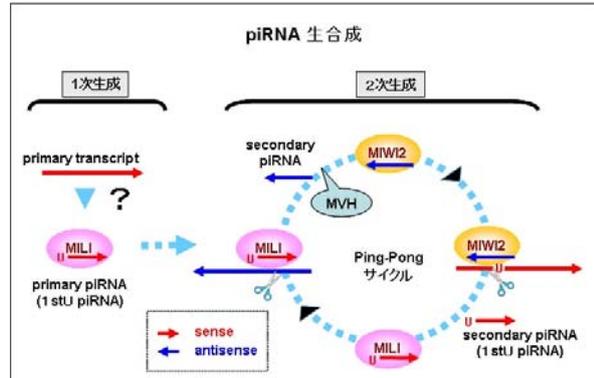
piRNA は、生殖細胞特異的に発現する小分子 RNA である。piRNA は、哺乳類の胎生期においては、幼弱な雄性生殖細胞(ゴノサイト)で発現しており、遺伝子の DNA メチル化を介して、レトロトランスポソンの発現を抑制すると考えられている。胎仔期のゴノサイトにおける piRNA 生合成には MILI (Miwi like) および MIWI2 (Mouse Piwi 2) といったマウス PIWI ファミリー蛋白が関与しているが、その過程には不明な点がたくさん残されている。本研究期間内では、遺伝子欠損マウスや GS 細胞を用いて、マウスの piRNA 生合成に関する以下の知見を得た。

【1】 piRNA 産生とレトロトランスポソンの発現抑制における MVH の機能

VASA は、生殖細胞特異的に発現している DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼで、さまざまな生物において生殖細胞の発生・分化に必須であることが知られている。そのマウスホモログ MVH (mouse vasa homologue) は胎仔期から成体の生殖細胞で発現し、欠損オスマウスは精子形成が減数分裂初期で停止し不妊であることが知られていた。通常、レトロトランスポソンは胎仔期の精子形成過程において、その制御領域に DNA メチル化が獲得される。しかし、MVH 欠損マウスにおいてはその *de novo* DNA メチル化が低下し、レトロトランスポソン遺伝子の発現が上昇していた。これらの MVH 欠損マウスでみとめられた表現型は、MILI 欠損マウスおよび MIWI2 欠損マウスの表現型と酷似していた。また、胎仔期の精巣には、MILI および MIWI2 に結合する piRNA が存在しており、その piRNA の多くはレトロトランスポソンに対する配列を持つ。一方、MVH は piRNA とは結合しないが、欠損マウスにおいて piRNA の発現低下がみとめられた。

胎生期の雄性生殖細胞であるゴノサイトでは、レトロトランスポソンに対する piRNA は、一次生成過程 (primary processing) と二次生成過程 (secondary processing) によって産生される。まず一次生成過程により、レトロトランスポソン由来の転写産物から 5' 末端の塩基がウラシル

であるpiRNA (1stU piRNA)が切り出されMILIに結合する。二次生成過程では、MILIのRNA切断活性 (slicer活性)によって、piRNAと相補的なRNAが、piRNAの5'側から10番目の位置で切断される。その結果、10番目のヌクレオチドがアデニンであるpiRNA (10thA piRNA)が産生され、そのpiRNAがMIWI2に取り込まれる。MVH欠損マウスのゴノサイトでは、MILIに結合するpiRNAは存在していたが、MIWI2に結合するpiRNAは認められなかった。しかし、次世代シーケンサーによるpiRNAの網羅的解析の結果より、10thA piRNAの割合がコントロールと同様に高かったことから、二次生成のMILIのslicer活性によるRNAの切断は生じていると考えられた。以上の結果より、MVHはpiRNAの二次生成過程の初期の段階において機能することを明らかにした。



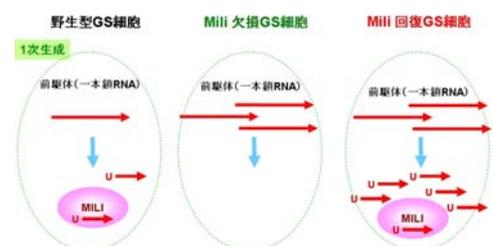
生殖細胞には古くより、ミトコンドリアとミトコンドリアの間に、inter-mitochondrial cement (IMC)と呼ばれる電子密度の高い顆粒が存在することが知られている。このIMCには、MILIおよびMVHが局在することが知られており、それぞれの欠損マウスにおいては、このIMCが消失していた。また、IMCはpiRNA産生のもととされていることから、MVHはpiRNA産生のもとであるIMCの形成においても重要な役割を有している。

以上の結果は、“MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons” *Genes Dev.* 23, (24): 887-892 (2010) に報告した。

【2】GS細胞を用いたpiRNA生合成経路の解析

Germline Stem Cell (GS細胞)は出生直後の精巣から樹立できる細胞株であり、その性質は精巣の精原細胞に相当する精巣性幹細胞である。本研究では、MILI欠損マウス由来のGS細胞を樹立し、MILIによるpiRNA産生機構の解析をおこなった。MILIを欠損する精巣では、レトロトランスポゾンに対するpiRNAの発現が障害され、レトロトランスポゾン遺伝子の転写調節領域におけるDNAメチル化が低下し、その転写産物の発現が上昇している。MILI欠損GS細胞を解析したところ、MILIを欠損するマウスと同様にLTRタイプのレトロトランスポゾンであるIAP遺伝子のDNAメチル化が低下しており、その転写産物の発現上昇が認められた。次にセンダイウイルスベクターを用いて、MILI欠損GS細胞にMili遺伝子を導入し、MILIの発現を回復させた細胞株 (MILI回復GS細胞)を樹立した。MILIの発現回復によって、IAP遺伝子のDNAメチル化とその発現抑制は回復できなかったが、MILI結合piRNAの発現は顕著に上昇した。

GS細胞におけるpiRNAの産生機構

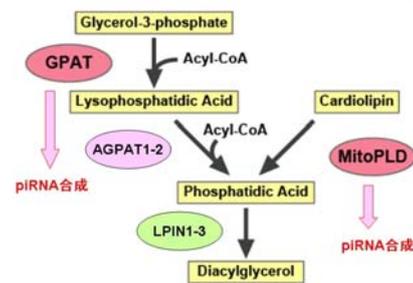


そこで、MILI回復GS細胞において発現する小分子RNAの網羅的解析をおこなったところ、piRNAの産生量が野生型に比較して約3倍に上昇しており、さらに、一次生成の結果産生されたと考えられる1stU piRNA、特に、IAPレトロトランスポゾンに対する配列をもつ1stU piRNAが

20 倍以上に増加していることが明らかになった。一方で、二次生成機構の結果生成される 10thA piRNAは野生型においてもMILI回復GS細胞においてもほとんど認められなかった。以上の結果は、GS細胞は、二次生成機構によるpiRNA産生はほとんど生じておらず、一次生成機構のみによってpiRNAを産出していること、および、MILIが一次生成機構においても重要な役割を担っていることを示している。同時に、MILI回復GS細胞は、哺乳類のpiRNAの1次生成機構を解析する上で、非常に有用な細胞であることが明らかとなった。

このGS細胞を材料として抗MILI抗体を用いて免疫沈降を行い、ミトコンドリアの外膜に存在するGPAT2(glycerol-3-phosphate acyltransferase 2)をMILI結合タンパクとして同定した。グルセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(GPAT)はグリセロ脂質合成の初期及び律速段階を触媒する脂質代謝酵素であり、GPAT2は精巣で非常に発現が高いことが知られていた。GS細胞におけるGPAT2の発現をノックダウンしたところ、piRNAの発現がMILI欠損GS細胞と同程度にまで低下したことから、GPAT2はpiRNAの一次生成に必須の分子であることが明らかとなった。これまでに、他のミトコンドリア外膜タンパクであり、脂質代謝に関わるMitoPLDがpiRNA合成に必須のタンパクであるとして報告されている(Watanabe et.al. *Dev Cell*. 23(3):364-75(2011))ことから、piRNA合成には脂質代謝、あるいはミトコンドリアへの局在が重要であると考えられた。

ミトコンドリアにおける脂質代謝とpiRNA合成



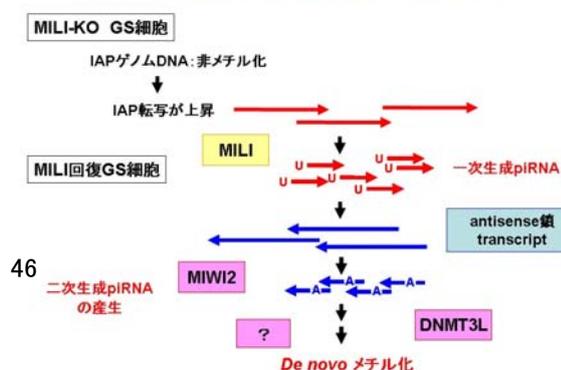
以上の結果は、“GPAT2, a Mitochondrial Acyltransferase, in piRNA Biogenesis in Germline Stem Cells”(Shiromoto Y, et al.)として現在、投稿中である。

3. 今後の展開

小分子 RNA を介する遺伝子発現抑制機構の解析は、この 10 年余で飛躍的な進歩を遂げてきた。我々は、哺乳類において、piRNA の産生がレトロトランスポゾン遺伝子の DNA メチル化に重要であり、RNA ヘリカーゼである MVH が piRNA の二次生成機構に参与していること、さらには、ミトコンドリアに存在する脂質代謝酵素である GPAT2 が piRNA 一次生成に参与していることを明らかにしてきた。しかし、哺乳類における詳細な piRNA の産生機構や、piRNA がどのようにして DNA メチル化を生じさせるのか、など、未解明な部分が多く、その詳細な分子メカニズムはこれからの課題である。

これまで、マウスにおける piRNA の生合成経路は、種々の遺伝子欠損マウスにおける piRNA の網羅的解析の結果と、ショウジョウバエでの生化学的解析の結果とを総合して間接的に推測されてきたにすぎない。これは、マウス個体から均一な生殖細胞を単離することが困難であること、piRNA を発現する哺乳類の細胞株が知られていなかったことなどにより、生化学的な実験が不可能に近かったためである。今回、GS 細胞において piRNA が発現していること、センダイウイルスベクターを用いることにより、効率よく同時に複数の遺伝子を GS 細胞に導入可能であること、を見いだしている。したがって、この実験系を

De novo メチル化の再構成系ができるか？



駆使することにより、piRNA の生成機構の解析を一気に進め、現時点でほとんど不明な哺乳類の piRNA 生成の分子機構の全容解明が可能ではないかと考えている。また、GS 細胞では、piRNA 生成過程の1次生成と2次生成とを分離して解析できることがわかってきたため、1 次生成過程の全貌を明らかにできるのではないかと考えている。さらに、GS 細胞への遺伝子導入により、2次生成によるpiRNA 合成の再構成、さらには、DNA のメチル化を誘導することができれば、現在ブラックボックスとなっている piRNA を介した新たな DNA メチル化獲得のメカニズムの解析にも一石を投じることができる。

4. 自己評価

哺乳類の小分子 RNA がエピジェネティックな抑制機構に関与する可能性を示したことから、本研究では、その成果を発展させ、piRNA を介した DNA メチル化機構を明らかにすることを目標にしてきた。残念ながらその目標に達することはできなかったが、一方で哺乳類の piRNA 生成過程の解明に GS 細胞株を用いた系を導入し、一次生成に必須の分子の同定をおこなうことができた。今後、その細胞系を用いて DNA メチル化を誘導する系を作り上げることができれば、piRNA を介する DNA メチル化を生化学的に解析することができる。今回、GS 細胞、特に MILI 回復 GS 細胞を樹立したことは、哺乳類の piRNA を解析するための有効なツールとして、意義深いと考えている。

5. 研究総括の見解

本研究者は、マウス PIWI ファミリーが小分子 RNA である piRNA を介し、DNA のメチル化を制御し転写を抑制するという、新たなエピジェネティック遺伝子発現制御機構を見出した。本研究は、この成果を基盤とし、小分子 RNA による転写抑制機構の分子メカニズムの解明を目指した。DNA メチル化機構を明らかにすることは出来なかったが、研究の過程で作製した、遺伝子欠損マウスや、欠損マウス由来の GS 細胞を用いて、piRNA の生合成経路の解明を行い、一次生成に GPAT2 が必須の分子であることを示したことは、高く評価出来る。本研究の中で樹立した細胞系は、今後の解析に有効に機能すると期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, Nakano T. Associations between PIWI proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. *Genes to Cells*. 14(10):1155-1165 (2009)
2. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, and Nakano T. MVH in piRNA Processing and Gene Silencing of Retrotransposons *Genes Dev*. 23, (24): 887-892 (2010)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表(口頭・シンポジウム等)

DNA methylation of retrotransposon genes is important for meiotic synapsis in spermatogenesis

宮川-倉持さとみ、木村 透、仲野 徹

第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム『Mobile elements and its biological functions』(2011.12.16 横浜)

piRNA生合成におけるMVHの役割

宮川-倉持さとみ、渡部聡朗、高松加奈、中馬新一郎、後藤健吾、小島-北加奈子、城本悠助、伊藤大介、木村 透、野瀬俊明、佐々木裕之、仲野 徹

第 12 回日本RNA学会年会(2010.7.27-29 東京)

Molecular Function of MVH on piRNA Production in Fetal Male Germ Cells

The 19th CDB Meeting 'RNA Sciences in Cell and Developmental Biology' (2010.5.12 神戸理研)

small RNA とエピジェネティック制御

第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム(2009.10.22 神戸)

招待講演・セミナー等

piRNA: its production and possible functions

2010 SDB and JSDB Joint Meeting (2010.8.5 Albuquerque, USA)

small RNAとレトロエレメント抑制

千里ライフサイエンスセミナー エピジェネティクス:ゲノムを管理し活用する戦略(2009.4.17 大阪 千里ライフサイエンスセンター)

small RNA とエピジェネティック制御

第 41 回ケムバイオシンポジウム 次世代医療: microRNA と cancer stem cells(2009.3.5 東工大)

小分子 RNA とエピジェネティック制御

東大医科研セミナー (2009.05.13 東京大学・医科学研究研)