

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.