

論文の内容の要旨

論文題目 X 染色体不活性化における Xist RNA 制御機構の解析

氏名 長谷川 優子

本文

【序論】

セントラルドグマという概念において、RNA は DNA とタンパク質との間をつなぐ仲介役であると認識されてきたが、近年のトランスクリプトーム解析の発展により、哺乳類においてはタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が従来の想像を上回って大量に存在していることが明らかになった。なかでも 200 塩基以上の ncRNA を長鎖 ncRNA と呼ぶ。長鎖 ncRNA の機能として、周辺遺伝子の転写抑制を引き起こす例が知られており、ncRNA とエピジェネティクスとの関連性が示唆されている。しかし、長鎖 ncRNA がどのような仕組みを伴ってその機能を発揮するのかに関しては不明な点が多い。本研究は哺乳類雌における X 染色体不活性化を解析対象に据え、長鎖 ncRNA の一種である Xist (X inactive-specific transcripts) RNA 制御機構の解明を目指した。

【研究の背景】

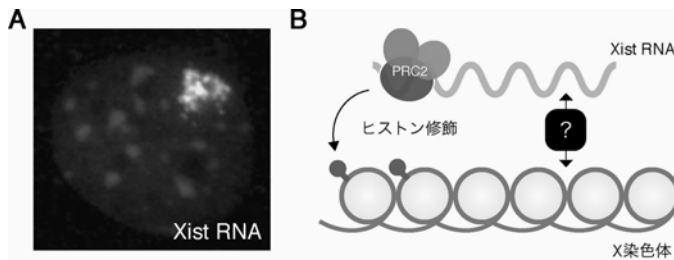


Figure 1

- (A) 長鎖 ncRNA である Xist RNA は X 染色体に局在化する
(B) Xist RNA を X 染色体へ局在化させる機構は明らかになっていない

哺乳類の雌は X 染色体を雄の二倍持っており、X 染色体関連遺伝子量の補正を行うために片側の X 染色体を不活性化する。この現象において重要な役割を担うのが Xist RNA である。Xist RNA は不活性化される側の X 染色体からのみ発現し、X 染色体全体を覆うような特徴的な局在を示す (Figure 1A)。Xist RNA は X 染色体不活

性化の必須因子であり、ヒストン修飾因子である PRC2 (polycomb repressive complex 2) が Xist RNA 依存的に標的である X 染色体へとリクルートされることから、これら転写抑制を担う因子を集積させる足場として機能しているのではないかと考えられている (Figure 1B)。しかしながら、Xist RNA の機能を支える分子機構については不明な点が多く、特にその特徴的な局在に関してはどのように制御されるのか長年の謎であった。そこで本研究では Xist RNA の局在制御を担うタンパク質因子の探索を行い、長鎖 ncRNA 機能制御機構の解明を試みた。

【結果と考察】

1. RNA 結合タンパク質 hnRNP U は Xist RNA の局在制御に必要である

細胞内で局在化する RNA の制御には RNA 結合タンパク質が関与している例が数多く知られる。そこで、Xist RNA の局在制御も RNA 結合タンパク質によってなされているという仮説のもとに、mini siRNA ライブラリを用いた制御因子の探索を行った。その結果、劇的な変化を

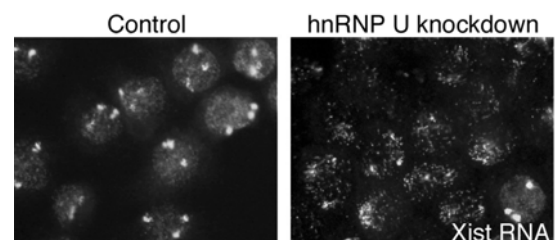


Figure 2

hnRNP U ノックダウンは Xist RNA の局在化を妨げる

生じた因子として hnRNP U (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U)を見出した。hnRNP U をノックダウンすると Xist RNA は正しい局在を示さず、核内全体に散らばっている様子が観察された (Figure 2)。hnRNP U は、核内に豊富に存在する RNA 結合タンパク質である hnRNP 群に属するが、hnRNP U 以外の hnRNP 因子のノックダウンは Xist RNA の局在に影響を示さなかった。したがって、この機能は hnRNP U に特異的であることが示唆された。

2. hnRNP U は X 染色体不活性化の必須因子である

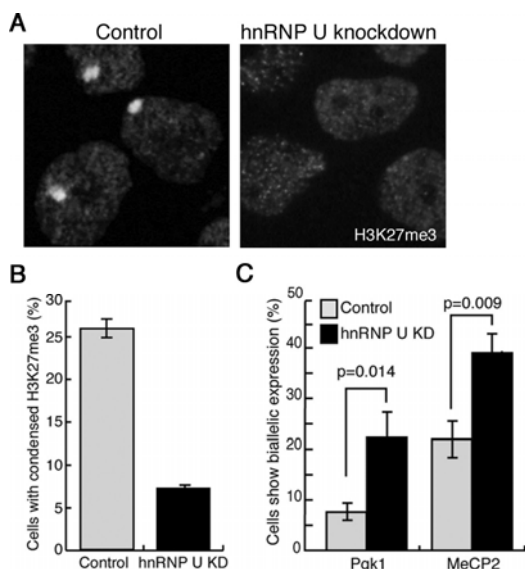


Figure 3

(A)(B) hnRNP U ノックダウンは H3K27me3

(不活性化 X 染色体マーカー)の蓄積を妨げる

(C) hnRNP U ノックダウンにより X 関連遺伝子が

両方の X 染色体から発現する

結果と異なり、MEF においては hnRNP U ノックダウンによる不活性化 X 染色体の転写抑制解除は起こらなかった。以上の結果より、hnRNP U は不活性化 X 染色体の確立においてのみ機能を担っていることが分かった。Xist RNA も hnRNP U と同様に X 染色体不活性化の確立にのみ関与していることが知られており、これら二つの因子の関連性が強く示唆された。

3. hnRNP U は RNA 結合ドメインを介して Xist RNA と相互作用する

hnRNP U による Xist RNA 制御機構の詳細を明らかにするため、ドメイン解析を行なうことにした。hnRNP U のドメイン構造を Figure 4A に示す。DNA 結合ドメインは SAF または SAP ドメインと呼ばれ、染色体上の MAR (matrix attachment region) に結合することが知られている。一方、RGG ドメインは RNA 結合ドメインであることが分かっている。SPRY は機能未知なドメインである。このことから、RNA 結合ドメイン

次に、hnRNP U ノックダウンによる Xist RNA 局在化の障害に付随して X 染色体不活性化に影響が出るか検討した。X 染色体の不活性化には細胞が分化するにしたがって起こる「確立」と、分化した細胞で見られる「維持」という二つの局面が存在する。まず、ES 細胞を用いて不活性化 X 染色体の確立に対する hnRNP U の必要性を調べた。不活性化が進行すると H3K27me3 が不活性化 X 染色体に集積するが、hnRNP U ノックダウン細胞ではこれが阻害されていた (Figure 3A)。またこの細胞で、X 関連遺伝子の一次転写産物の検出を指標にして不活性化 X 染色体の転写状態を調べたところ、どちらの X 染色体からも一次転写産物が検出された (Figure 3C)。このことから、転写抑制という視点からも不活性化 X 染色体の確立が正常に成されていないことが分かった。一方、不活性化 X 染色体の維持に対する影響の評価は、分化した細胞である MEF (mouse primary fibroblast) を用いて行った。先の結果

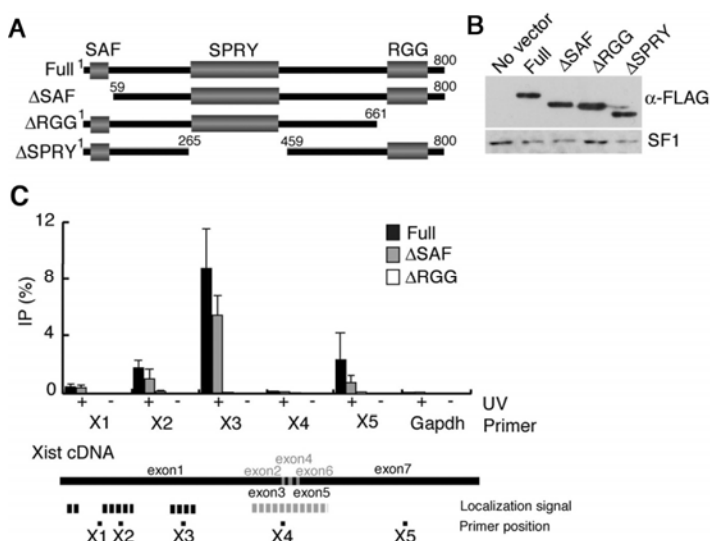


Figure 4

(A)(B) 各ドメイン欠損型 hnRNP U

(C) CLIP 法による hnRNP U と Xist RNA の相互作用の確認
hnRNP U は RNA 結合ドメインを介して Xist RNA の局在化シグナル付近に結合している

が Xist RNA との相互作用を仲介しているのではないかと考え、これを検討した。FLAG タグを付加した全長および各ドメイン欠損型の hnRNP U を Neuro2A に発現させ (Figure 4B)、CLIP (Cross-Linking and Immuno-Precipitation)法を用いて、Xist RNA が共沈してくるか調べた。まず全長の hnRNP U は Xist RNA と相互作用していることが明らかになった (Figure 4C)。さらに、DNA 結合ドメイン欠損型 hnRNP U と Xist RNA は相互作用を示したのに対し、RNA 結合ドメイン欠損型 hnRNP U は Xist RNA との相互作用を示さなかったため、予想通り RNA 結合ドメインが Xist RNA との相互作用を担っていることが示された (Figure 4C)。また Xist RNA 側の hnRNP U との相互作用領域は、先行研究によって明らかにされていた Xist RNA 自身の局在化に必要である「局在化シグナル」を含む領域である可能性も示唆された。

II. hnRNP U は DNA, RNA 結合ドメインを介して Xist RNA の局在制御を行う

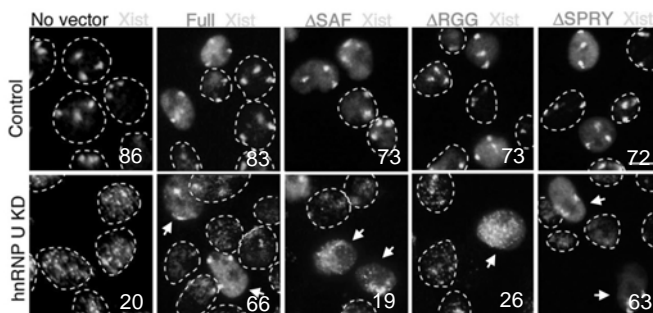


Figure 5

各ドメイン欠損型 hnRNP U による相補実験。
各コンストラクトを発現している細胞を矢印で示した。
数字は Xist RNA が正しく局在化している細胞の割合を示す

次に、hnRNP U と Xist RNA の相互作用と局在制御との関連を検討するため、前述のドメイン欠損型 hnRNP U を用いた相補実験を行った。まず Neuro2A に siRNA 耐性変異を導入した各ドメイン欠損型 hnRNP U を発現させ、その後 siRNA を用いて内在の hnRNP U のノックダウンを行い、Xist RNA の局在を観察した。その結果、内在の hnRNP U ノックダウンに伴う Xist RNA の局在変化を相補することが出来たのは全長の hnRNP U と、DNA, RNA 結合ドメイン両者を保持

するコンストラクトのみであった (Figure 5A, B)。したがって、Xist RNA 局在制御には hnRNP U の RNA 結合ドメインだけでは十分でなく、DNA 結合ドメインも必要であることが分かった。また、SPRY ドメインは Xist RNA の局在制御には関与しないことも判明した。

4. hnRNP U はその他の長鎖 ncRNA 制御にも関与する

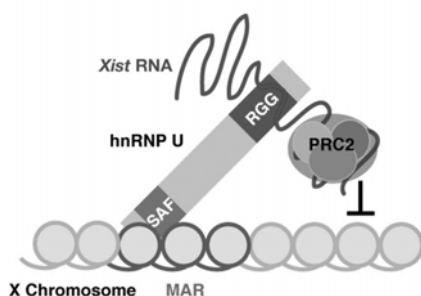
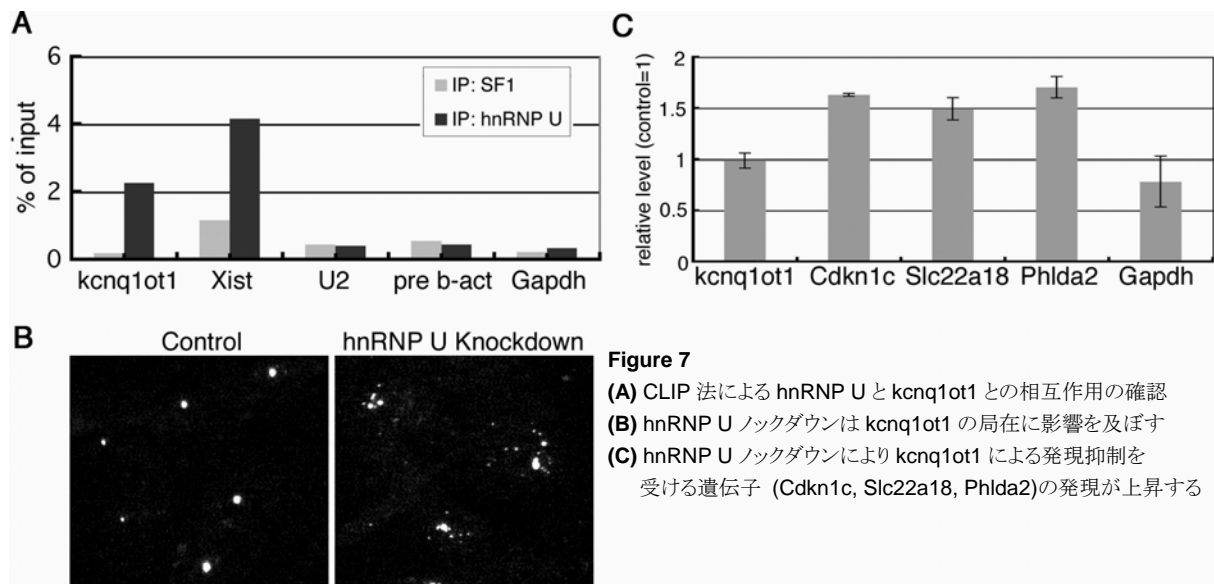


Figure 6

hnRNP U による Xist RNA 制御のモデル

上記の結果を踏まえ、hnRNP U による Xist RNA 制御機構のモデルを考えた (Figure 6)。近年、Xist RNA に類似した性質や機能を持つ長鎖 ncRNA が数例報告されていることから、hnRNP U がこれらの長鎖 ncRNA 制御にも関与している可能性を考え、代表例として知られる *kcnq1ot1* に着目することにした。*kcnq1ot1* は父親由来の染色体からのみ発現して転写部位近傍に留まり、周辺遺伝子の発現抑制を担う。まず、hnRNP U と *kcnq1ot1* の相互作用を確認した (Figure 7A)。次に *kcnq1ot1* の局在を観察したところ、コントロールでは報告通り転写部位近傍に留まっている様子が確認されたが、hnRNP U ノックダウン細胞ではこれが拡散するように変化していた (Figure 7B)。さらに未分化 ES 細胞を用いて *kcnq1ot1* による転写制御を受けている遺伝子の発現量を調べたところ、hnRNP U ノックダウンによって本来抑制されるべき父方由来の染色体からの発現が上昇することが分かった (Figure 7C)。以上から、hnRNP U は Xist RNA のみならず、その他の長鎖 ncRNA である *kcnq1ot1* の局在制御にも関わっていることが示唆された。



【結語】

本研究は X 染色体不活性化の必須因子である Xist RNA の局在制御に hnRNP U が重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、hnRNP U がその他の長鎖 ncRNA の局在化にも関与していることを示した。この結果は長鎖 ncRNA を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御を支える共通の分子機構を暗示するものである。特定の遺伝子の発現抑制に RNA が必要とされる理由は、長鎖 ncRNA に依存した遺伝子発現抑制機構と非依存的な抑制機構との差異がまだ十分に理解されていないためにきちんとした答えが出ていないのが現状ではあるが、hnRNP U がこの疑問に対する答えを見つけるための鍵因子となるかもしれない。