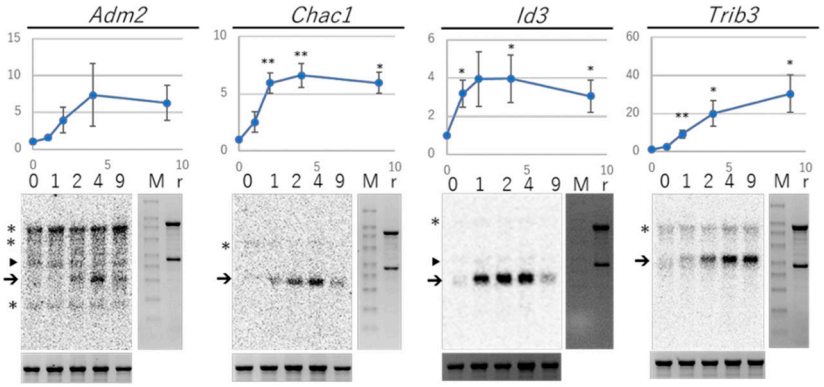
29　膵β細胞のグルコース依存的長鎖非コードRNAの解析	太田　邦史

【目的】ヒトゲノムの 98.5%は、タンパク質をコードしない領域である。この領域はこれまで大半が機能を持たない「ジャンク」と捉えられてきた。しかし、ENCODE プロジェクトの成果などから、多数の生物種でこの非コード領域から莫大な種数の「長鎖非コード RNA（lncRNA : long non-codingRNA）」が合成されていることがわかった。種々の細胞シグナルに応じて、lncRNA がエピゲノムや遺伝子発現制御に関わることが示されつつあるが、その役割は依然として不明な点が多い。我々は、分裂酵母においてグルコース飢餓時に発現誘導される *fbp1*$^{+}$遺伝子領域において、グルコース豊富時にはアンチセンス鎖 lncRNA（asRNA）が合成されていること、またグルコース飢餓に応答して早期に 5’上流域からセンス鎖 lncRNA がカスケード的に合成され、これと共役してクロマチン構造の段階的な再編成が生じ、最終的に大規模な mRNA の転写が起こることを示した（Hirota et al., *Nature* 2008）。この lncRNA は mlonRNA（metabolic stress-induced long ncRNA）と命名された。本研究では、同様の機構の普遍性を動物細胞で検証するため、膵β細胞における mlonRNA 様の lncRNA の探索と発現制御機能の解析を行った。

【方法】マウス膵β細胞株 MIN6 を、0～4 mM グルコースを含む DMEM で培養し、0、1、2、4、9 時間後に細胞を回収して全 RNA を回収した。この RNA を用いて、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により遺伝子発現を網羅的に解析した。次に、RNA-seq の時系列データを用いて、グルコース飢餓によって発現誘導を受ける遺伝子群を抽出した。さらに上流域に長鎖非コード RNA の発現が認められる染色体領域を、情報科学的手法により探索した。これらの遺伝子座については、qPCR、5’-RACE、ノザンハイブリダイゼーションでさらに定量的な解析を行った。

【結果および考察】RNA-seq データの解析から、マウス膵β細胞由来の MIN6 細胞をグルコース飢餓に暴露すると、数時間のうちに炎症応答やアポトーシス、小胞体ストレスに関係する転写因子など（*Trib3*、*Atf5*、*Atf4*、*Chac1* など）の発現が誘導されることが明らかになった。これらのうち、少なくとも 8 種の遺伝子に関しては、ノザンブロッティングを行い、連続的な長鎖 RNA の存在を確認した。また、5’RACE によって転写開始点の決定を行い、プロモーター領域からの転写開始を確認した。*Trib3* 転写物に関しては、上流域で RNAi を実施したところ、全領域の転写物の発現量の低下が生じることが明らかになった。これらの転写物には分裂酵母で見出された mlonRNA 様 lncRNA 候補が存在するものと思われる。グルコース飢餓に応じて発現誘導される一群の遺伝子の上流に、mlonRNA 様の転写物が共通に見出された。これらの遺伝子群を遺伝子オントロジー解析すると、細胞死、炎症応答、小胞体ストレスなどの経路が高い関連性を示した。2 型糖尿病の初期段階では、食後高血糖など部分的な血糖値の調節の不全が見られる。膵臓β細胞に対して、血糖値の激しい変動が炎症応答やアポトーシスなどの細胞疲弊を引き起こす可能性があることを、遺伝子レベルで示したことになる。その際に、代謝ストレス応答性の lncRNA が遺伝子発現制御に関わっている可能性があり、β細胞疲弊のメカニズム解明や、2 型糖尿病の進行との関係性について将来的な解析が必要になると思われる。

mlonRNA 様転写物（＊印）が確認できた遺伝子群の一部



29. 膵β細胞のグルコース依存的長鎖非コードRNAの解析

太田　邦史

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系

Key words：β細胞，lncRNA，糖尿病，アポトーシス，炎症応答

緒　言

ヒトゲノムの98.5%は、タンパク質をコードしない領域である。この領域はこれまで大半が機能を持たない「ジャンク」と捉えられてきた。しかし、ENCODEプロジェクトの成果などから、多数の生物種で非コード領域から莫大な種類の「長鎖非コードRNA（lncRNA : long non-codingRNA）」が合成されていることがわかった。種々の細胞シグナルに応じて、lncRNAがエピゲノムや遺伝子発現制御に関わることが示されつつあるが［1，2］、その役割に関しては依然として多くの謎が残されている。

我々は、糖代謝ストレス時のエピゲノム・遺伝子発現制御におけるlncRNAの役割を調べている。糖代謝ストレスは糖尿病などの発症や進行プロセスに関与すると考えられるが、lncRNAに関する知見は少ない。これまでに、動物細胞と共通の性質を多く有する分裂酵母を用いて、グルコースが枯渇した環境下（グルコース飢餓）でのみ顕著に転写される*fbp1*$^{+}$遺伝子（フルクトース-1,6-ビス脱リン酸酵素）などのストレス応答遺伝子の活性化機構を明らかにした。具体的には、グルコース飢餓時に*fbp1*$^{+}$の5’上流域からlncRNAがカスケード的に合成され、これと共役してクロマチン構造やエピゲノム就職の段階的な再編成が生じ、最終的に大規模なmRNAの転写が起こることを示した［3〜5］。我々は、このlncRNAをmlonRNA（metabolic stress-induced long ncRNA）と命名し、機能解析や普遍性の検証を行ってきた。これまでに、mlonRNAとほぼ同じ領域で転写されるアンチセンスRNA（asRNA）が栄養豊富時に恒常的に合成され、グルコース飢餓時にmlonRNAと相反する形で消失することも見出した［4］。

本研究では、哺乳類の糖代謝ストレス応答のモデルとして、マウス膵臓ランゲルハンス島β細胞株MIN6に着目し、グルコース飢餓時に発現するmlonRNA様の長鎖RNAを複数同定し、一部について機能の解析を試みた。その結果、膵β細胞株MIN6がグルコース飢餓に暴露された際に、炎症応答やアポトーシス、小胞体ストレスに関係する転写因子など（*Trib3*, *Atf5*, *Atf4*, *Chac1*など）の発現が顕著に誘導された。興味深いことに、これらの遺伝子発現をノザンブロットや5’-RACEなどで解析したところ、遺伝子上流域から転写されると思われるmlonRNA様の長鎖RNA分子を確認した。本研究では、これらの遺伝子群と2型糖尿病の発生機序との関わりについても考察を行う。

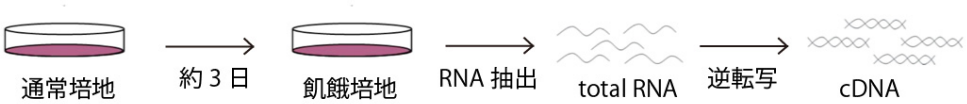


図1．MIN6のグルコース飢餓処理

方法および結果

1.　グルコース飢餓応答時の MIN6 トランスクリプトーム解析

25 mM（通常の血糖値の 5 倍程度）の高濃度グルコースを含む DMEM 培地中で、マウスインスリノーマ由来の膵臓β細胞株 MIN6 を培養した後、0～40 mM グルコースを含む DMEM に置換して培養を継続した（図 1）。0、1、2、4、9 時間後に細胞を回収して全 RNA を回収し、polyA$^+$RNA を調製した。これらを用いてイルミナ・シーケンサー用の鎖特異的 RNA-seq ライブラリーを構築し、イルミナ HiSeq4000 を用いて遺伝子発現を解析した（鎖長 150 bp、12 Gb）。2 レプリケートの実験を実施して再現性の確認を行い、発現が有意に変化する遺伝子を探索した。

2.　グルコース飢餓応答時に見られる上流転写物の探索

上記 RNA-seq データを分析し、上流から RNA が転写され、下流の遺伝子の発現がグルコース飢餓で上昇する転写物を抽出した。この際、本研究の探索対象である lncRNA が遺伝子のアイソフォームとして見出される可能性を考慮し、RNA-seq 解析時に「遺伝子発現解析」と「アイソフォーム発現解析」という 2 種類の解析方法を併用して対象を絞り込んだ。その結果、遺伝子発現レベルとアイソフォームタイプの変化が連動してみられる遺伝子が 161 個見出された。これらのうち、分裂酵母の mlonRNA と同様な変化、すなわち「アイソフォームタイプの変化が先行し、続いて遺伝子発現が上昇する」というパターンを示す遺伝子が 57 個見出された。これらの遺伝子リストから重複している遺伝子を除去した結果、グルコース飢餓後 1、2、4 時間で発現が変化する 15 個の遺伝子、4 時間でアイソフォームの発現が変化し 9 時間で遺伝子発現が変化する代謝関連遺伝子 2 個を特定することに成功した。一例として *Bambi* の RNA-seq マッピングデータを以下に示す（図 2）。

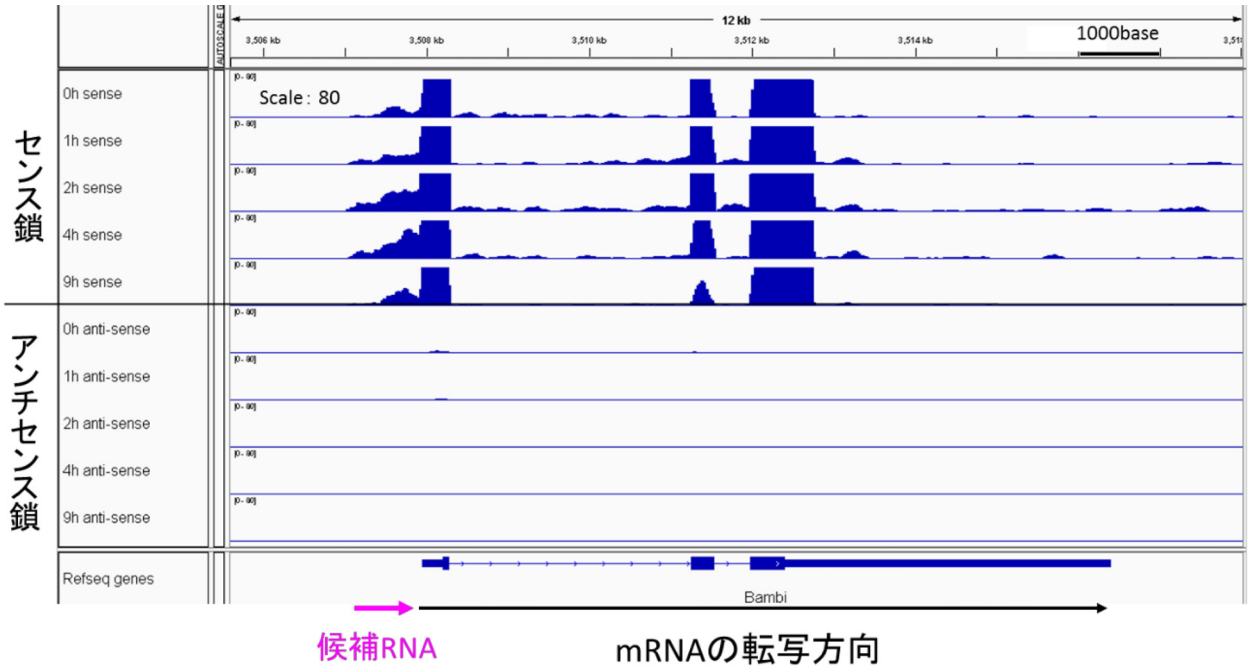


図 2.　*Bambi* 遺伝子領域にみられる転写物の RNA-seq マッピングデータ
センス鎖において、プロモーター上流領域から合成される転写物（「候補 RNA」）がみられる。

3.　上流転写物の発現解析とエピゲノム解析

上記方法で抽出した 17 個の遺伝子（*Adm2*, *Adora2b*, *Bambi*, *Bbc3*, *Chac1*, *Ddit4*, *Egr1*, *Eif4ebp1*, *Fbxo32*, *Hist1h1c*, *Hist1h1d*, *Id3*, *Klhl24*, *Sesn2*, *Slc7a11*, *Smad6*, *Trib3*）について、RNA 発現レベルの時系列変化を RT-qPCR で定量的に解析した。その結果、いずれの遺伝子もグルコース飢餓で顕著な発現上昇が確認された（図 3）。

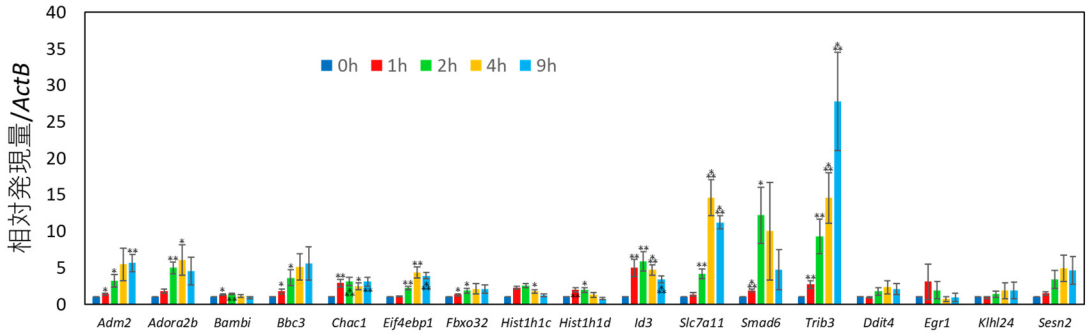


図 3.　17 遺伝子発現レベルの RT-qPCR による解析

N = 3、*t*-検定、* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001

（※本図で *Ddit4* 以降の 4 つの遺伝子は発現活性化レベルのばらつきが非常に大きく、グルコース飢餓後に明確な差異は認められたものの、正規分布に基づく *t*-検定では有意差が認められなかった。）

上記の遺伝子群について、全長をノザンブロットで確認し、11 遺伝子について mRNA や pre-mRNA とは異なる長鎖の RNA 分子種が存在することを明らかにした（図 4）。

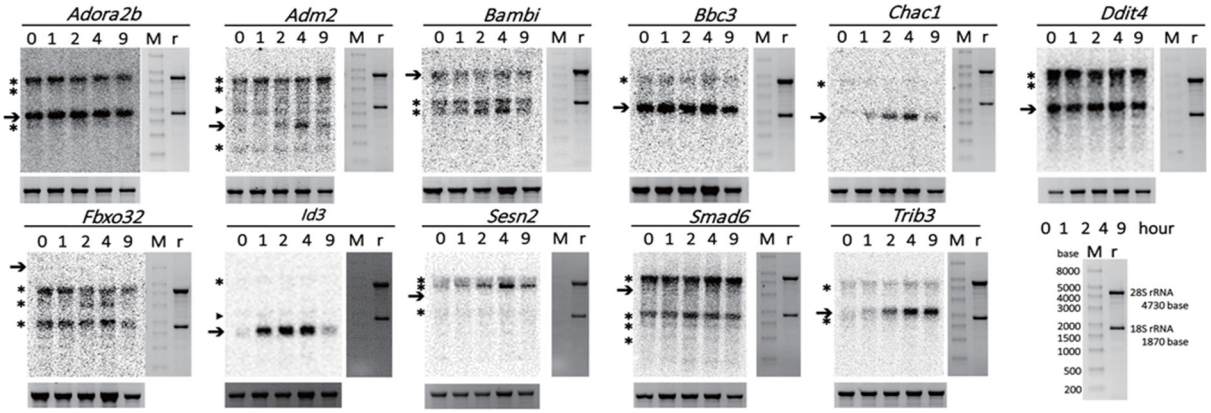


図 4.　ノザンブロットによる長鎖 RNA の検出

11 の遺伝子で mRNA（→）や pre-mRNA（▲）以外の長鎖 RNA（*）を検出した。これらの RNA は、分裂酵母の mlonRNA によく似た様相を示していたので、その転写開始点を 5'-RACE で解析し、遺伝子上領域からの転写開始を確認した（図 5）。

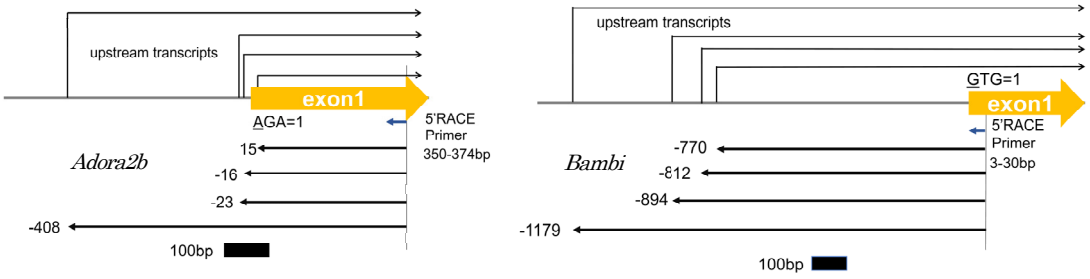


図 5.　5'-RACE による長鎖 RNA 転写開始点の同定

例として、*Adra2b* と *Bambi* の上流域から合成される複数の RNA の転写開始点を示す。

4. 上流転写物の機能解析

上流転写物のうち、アポトーシス関連遺伝子である *Trib3* については、タンパク質をコードしていない Exon1 から Exon2 までの領域を含む上流領域を標的とした RNAi を実施した。その結果、*Trib3* の mRNA の発現が 30%程度抑制され、グルコース飢餓 9 時間後アポトーシスが対照に比べて 2 倍程度促進された。

考　察

マウス膵β細胞由来のMIN6細胞をグルコース飢餓に暴露すると、数時間のうちに炎症応答やアポトーシス、小胞体ストレスに関係する転写因子などの発現が誘導されることが明らかになった。これらのうち、少なくとも8種の遺伝子に関しては分裂酵母でみられたmlonRNAに類似したプロモーター転写物の存在を確認した。*Trib3*転写物に関して上流域でRNAiを実施したところ、全領域の転写物の発現量の低下が生じることが明らかになった。これらの転写物の中には、分裂酵母で見出されたmlonRNA様lncRNA候補が存在するものと考えられる。

mlonRNA様の転写物が共通に見出された膵β細胞のグルコース飢餓応答遺伝子群について、遺伝子オントロジー解析を行ったところ、「細胞死」、「炎症応答」、「小胞体ストレス」などの経路が高度に濃縮されていた。これらの経路は2型糖尿病の発症との関連が示唆されている。2型糖尿病の初期段階では、食後高血糖などにより血中グルコース濃度の大きな変動がみられる。このような環境下においては、膵臓β細胞において上記のような遺伝子群の発現誘導が起こる可能性があり、炎症応答やアポトーシスなど、β細胞の疲弊を引き起こす可能性がある。β細胞の疲弊過程に、代謝ストレス応答性のlncRNAが遺伝子発現制御に関わっている可能性がある。mlonRNA様の転写物の遺伝子制御機構を明らかにすることで、β細胞疲弊のメカニズム解明や、2型糖尿病の進行機構の一端が明らかになる可能性が示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院総合文化研究科太田研究室の荒木海人、土屋一郎、吉田菜摘、石井智子、小田有沙である。

文　献

1） Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA, Wysocka J, Lei M, Dekker J, Helms JA, Chang HY. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature.* 2011 Apr 7;472(7341):120-124. PMID: 21423168, doi: 10.1038/nature09819. Epub 2011 Mar 20.

2） Lai F, Orom UA, Cesaroni M, Beringer M, Taatjes DJ, Blobel GA, Shiekhattar R. Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature.* 2013 Feb 28;494(7438):497-501. PMID: 23417068, doi: 10.1038/nature11884. Epub 2013 Feb 17.

3） Hirota K., Miyoshi T., Kugou K., Hoffman C.S., Shibata T., and Ohta K. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):130-134. PMID: 18820678, doi: 10.1038/nature07348. Epub 2008 Sep 28.

4） Oda A, Takemata N, Hirata Y, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Ohta K. Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation. *Genes Cells.* 2015 May;20(5):392-407. PMID: 25728061, doi: 10.1111/gtc.12229. Epub 2015 Mar 2.

5） Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jun 20;44(11):5174-5189. PMID: 26945040, doi: 10.1093/nar/gkw142. Epub 2016 Mar 3.