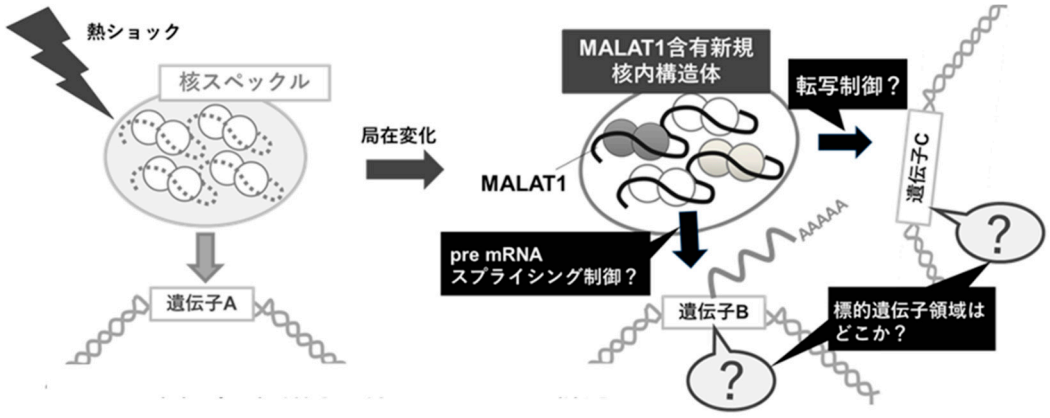
142　熱応答性非コードRNAによる新規ストレス応答機構の解明	小野口　玲菜

【目的】熱ストレスへ正常に応答することは生物の生存において重要であり、熱ストレスへの応答異常は神経変性疾患やがんなど様々な疾患の原因の一端となっている。我々はストレス応答を担う新たな因子として、長鎖非コード RNA に着目した解析を行ってきた。その過程で、以下の新規事象を発見した。すなわち、通常は核スペックルという核内構造体に局在する MALAT1 長鎖非コード RNA が、熱ストレスに応答して核スペックルから離脱し新規核内構造体（MALAT1 含有新規核内構造体と命名）を形成することを見出した。この新規構造体を介した新規の熱ストレス応答機構の存在が期待される。そこで本研究では MALAT1 含有新規核内構造体を介した遺伝子発現の制御機構を解明し、熱ストレス応答におけるこの構造体の生理的意義を明らかにすることを目的とする。最終的には長鎖非コード RNA を含有する新規核内構造体を基盤とした、新しい熱ストレス応答機構の提唱を目指す。

【方法・結果】任意の RNA と相互作用する因子（RNA 結合タンパク質やゲノム DNA）の画期的な解析手法である ChIRP 法を用いて、MALAT1 含有核内構造体の構成因子の候補タンパク質ならびに MALAT1 含有核内構造体と相互作用するゲノム DNA 領域の同定を試みた。質量分析による解析の結果、MALAT1 含有核内構造体の構成因子の候補タンパク質として 73 種の RNA 結合タンパク質が同定された。さらに、得られた MALAT1 含有新規核内構造体の構成タンパク質候補が、熱ストレス時の MALAT1 の局在変化に寄与しているか否かの検証実験を行った。候補タンパク質に対する siRNA を細胞にトランスフェクションし、熱ストレス（42℃×1 時間）を与えた細胞における MALAT1 の局在を RNA-FISH 法により観察した。その結果、特定のタンパク質候補をノックダウンすると熱ストレス条件下での MALAT1 の局在変化が観察されなかった。このことから、MALAT1 が特定の RNA 結合タンパク質との相互作用を介して熱ストレスに応じた局在変化を引き起こしている可能性が考えられる。また、MALAT1 含有核内構造体と相互作用するゲノム DNA 領域の解析の結果、熱ストレス細胞で MALAT1 特異的に結合するゲノム DNA 領域が同定された。この結果より、熱ストレスに応答して MALAT1 が局在変化するのに伴い、ストレス非負荷時とは異なるゲノム DNA 領域を標的とすることが示唆された。

本研究で明らかにしたい課題



142. 熱応答性非コードRNAによる新規ストレス応答機構の解明

小野口　玲菜

東京大学 アイソトープ総合センター 研究開発部門

Key words：熱ストレス応答，長鎖非コードRNA，核内構造体

緒　言

地球上に生きる生物は熱や紫外線、低酸素などの様々な環境ストレスに晒されている。これらのストレスに応答して生体内の恒常性を保つことは生物にとって非常に重要である。ストレスに対する応答異常は、神経変性疾患やがんなどの様々な疾患の発症原因となる。従って、ストレスに対する応答機構を分子レベルで理解することは、生命の基本原理解明のみならず疾患の原因解明と画期的治療法の開発への貢献が期待される。

環境ストレスの中でも、熱ストレスによって引き起こされるタンパク質のミスフォールディング・異常凝集は様々ながんや神経変性疾患の一因となることが分かってきている。細胞には以下に述べるタンパク質恒常性維持機構が存在することが以前から示されていた。すなわち、熱ストレスに応答して転写因子 HSF1 により速やかにシャペロン分子の発現が誘導され、タンパク質の異常凝集を排除するという機構である。しかしながら、近年の研究では「HSF1-シャペロン遺伝子経路」は熱ストレス応答機構の一部にすぎず、他の転写因子の寄与や分子シャペロン遺伝子以外の熱ストレス応答遺伝子の存在が示唆されている［1］。これらの知見から、未知の熱ストレス応答遺伝子の発現制御機構が存在するはずであると考えられる。しかし、未知の熱ストレス応答機構を明らかにする手掛かりは得られていない。このような状況下において「新規の熱ショック応答遺伝子の発現制御機構を見出し、熱ストレス応答機構の全貌を解明すること」が重要な課題となっている。

新規のストレス応答機構を明らかにするためには、新規のストレス応答因子に着目し研究を進めていくことが有効であると考えられる。ストレス応答における重要な分子種として非コードRNAが挙げられる。非コードRNAとはタンパク質の一次配列をコードしないRNA群の総称である。近年の大規模トランスクリプトーム解析手法の飛躍的な発展により、ヒトを含めた真核細胞のゲノムから多種多様の非コードRNAが転写されていることが判明した。その中でも核局在長鎖非コードRNAが遺伝子発現制御に直接関与することが近年明らかになりつつある［2］。

核局在長鎖非コードRNAの中には特定のタンパク質と相互作用し、核内構造体と呼ばれる膜を持たない構造体を形成するものも存在する。核内構造体は、「転写やプロセシングに関与する複合体の生合成の場」あるいは、「染色体と相互作用することで効率的に遺伝子発現を制御する場」になると考えられている。また細胞周期や細胞ストレスなどの細胞状態の変化に伴って核内構造体は変化することが知られている。一例として、熱ショックに応答して転写因子HSF1とサテライトⅢ非コードRNAが核ストレスボディーと呼ばれる核内構造体を形成し、分子シャペロン遺伝子の転写誘導を引き起こすことが知られる。この他にも細胞ストレスに応答する非コードRNAと核内構造体が数多く存在すると予想される。しかしながら、その全貌は未だ明らかになっていない。

上記の背景に基づいて、核スペックルと呼ばれる核内構造体に局在するMALAT1長鎖非コードRNAに着目し、細胞ストレスとの関連について系統的に解析を行った結果、以下の新規現象を発見した。

1) 通常は核スペックルに局在する長鎖非コードRNAのMALAT1が、熱ショック条件下では核スペックルから離脱し、核スペックルとは異なる核内構造体へと局在変化した。
2) 免疫染色実験の結果、熱ショック時にMALAT1が局在する核内構造体は、既知の核内構造体のマーカータンパク質の局在とは一致しなかった。
3) 熱ショック後の細胞増殖を測定した結果、MALAT1ノックアウト細胞では細胞増殖の低下が見られた。

上記の発見は、MALAT1 非コード RNA が熱ショック時の細胞生存において重要な因子であること、熱ショックに応答して MALAT1 を含有する新規のストレス誘導性核内構造体が形成されることを示唆している。

本研究の目的は、我々の発見した MALAT1 含有新規核内構造体を介した熱ショック応答遺伝子の発現制御機構を明らかにし、その生理機能を解明することである。最終的に、長鎖非コード RNA を含有する核構造体形成を基盤とした新たな熱ショック応答機構の提唱を目指す。

方法および結果

1. ChIRP 法：MALAT1 含有新規核内構造体の構成タンパク質ならびに標的ゲノム DNA 領域の同定手法の確立

熱ストレス応答時の MALAT1 含有新規核内構造体を介した遺伝子発現制御機構を理解する上で、MALAT1 含有核内構造体の構成因子（タンパク質）を同定すること、そして MALAT1 含有核内構造体が標的とするゲノム DNA 領域を特定することは必要不可欠である。そこで、任意の RNA と相互作用する因子（RNA 結合タンパク質やゲノム DNA）の画期的な解析手法である ChIRP 法 [3, 4] を用いて、MALAT1 含有核内構造体の構成タンパク質ならびに MALAT1 含有核内構造体が標的とするゲノム DNA 領域の同定を試みた。

ChIRP 法は、目的の RNA に対する相補的なオリゴプローブを用いて特異的に沈降し、共沈されるタンパク質またはゲノム DNA を解析することで目的の RNA の *in vivo* での相互作用因子を網羅的に同定することを可能としている（図 1）。この手法に従い、初めに MALAT1 非コード RNA に対して相補的なオリゴプローブを設計し、MALAT1 RNA が回収されることを確認した（図 2A）。7SK のような発現量の高い核局在 RNA は回収されなかったことから、MALAT1 RNA が特異的に回収されており、ChIRP 法を用いて MALAT1 と相互作用する因子の解析ができると判断した。

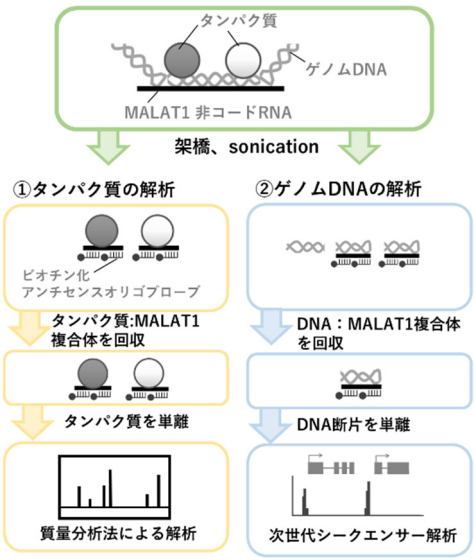


図 1. MALAT1 結合タンパク質群および結合 DNA 領域の同定方法（= ChIRP 法）

2. MALAT1 含有核内構造体の構成タンパク質の解析

ChIRP 法を用いて、未処理または熱ストレス処理した細胞から MALAT1：タンパク質複合体を回収し、単離したタンパク質を質量分析法で解析した。その結果、熱ストレス処理した細胞で MALAT1 と相互作用が見られた 73 種のタンパク質を MALAT1 含有新規核内構造体の構成タンパク質候補として同定した（図 2B）。

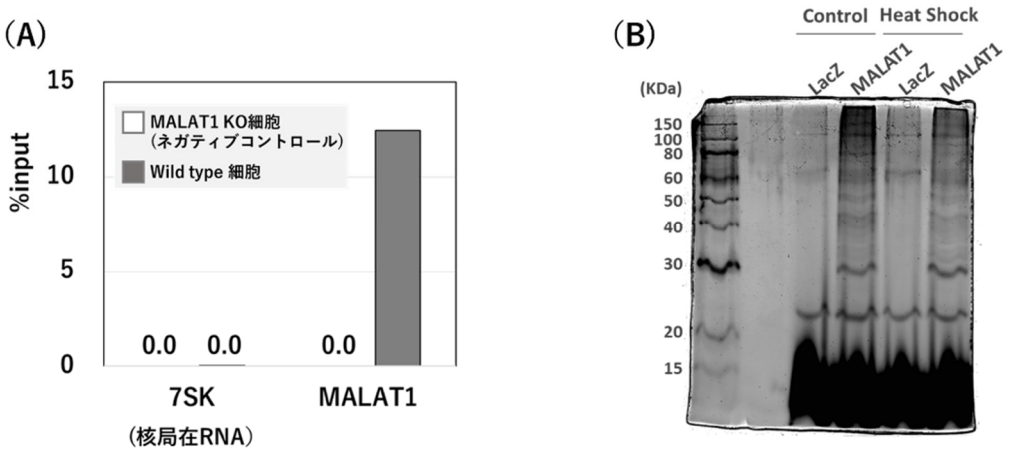


図 2. ChIRP 法を用いた MALAT1 結合タンパク質の解析

A) RNA の回収率を RT-qPCR により評価した。

B) MALAT1 と共沈したタンパク質を SDS-PAGE に供し、Sypro Ruby により染色した。

さらに、得られた MALAT1 含有新規核内構造体の構成タンパク質候補が、熱ストレス時の MALAT1 の局在変化に寄与しているか否かの検証実験を行った。候補タンパク質に対する siRNA を細胞にトランスフェクションし、熱ストレス（42℃×1 時間）を与えた細胞における MALAT1 および核スペックル（MALAT1 がストレス非負荷時に局在化する構造体）のマーカータンパク質の局在を RNA-FISH 法と免疫蛍光染色法を用いて観察した。その結果、特定のタンパク質候補をノックダウンすると熱ストレス条件下での MALAT1 の局在変化が観察されなかった（図 3）。このことから、MALAT1 含有構成タンパク質候補の中に MALAT1 の局在変化に寄与する因子が含まれていることが明らかとなった。現在までに 73 種中 42 種のタンパク質について上記スクリーニングを行っており、その中で 3 種のタンパク質が MALAT1 の局在変化に重要であることが分かっている。

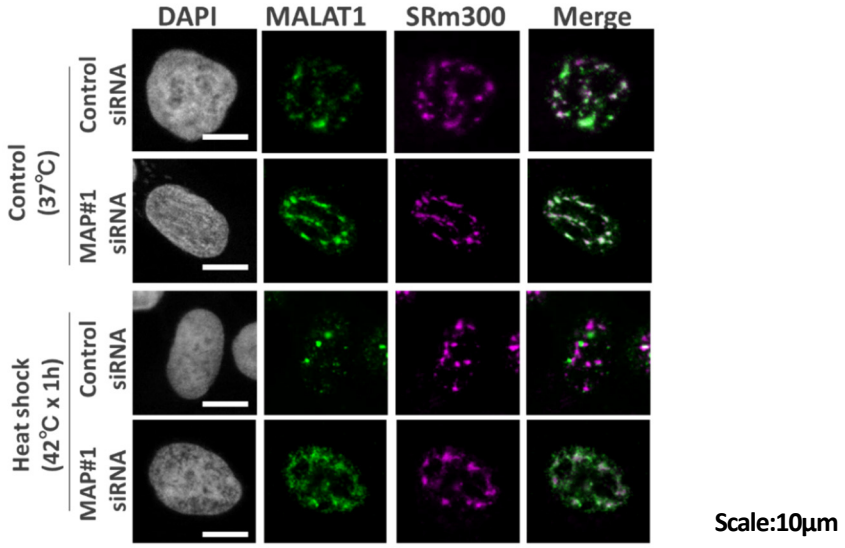


図 3. MALAT1 結合タンパク質に対する siRNA スクリーニングの結果

コントロール siRNA および MALAT1 結合タンパク質（MAP : MALAT1 Associated protein）に対する siRNA をトランスフェクションした細胞に置ける MALAT1 と核スペックルタンパク質の局在を RNA-FISH 法と免疫傾向染色法により観察した。MALAT1 は緑、核スペックルタンパク質はマゼンタで示している。熱処理した際に、コントロール siRNA 細胞では MALAT1 の局在変化は見られたが（3 段目）、MAP1#1 siRNA トランスフェクション細胞では MALAT1 の局在変化は見られなかった。

3. MALAT1 含有核内構造体の標的ゲノム DNA 領域の同定

ChIRP 法を用いて、未処理または熱ストレス処理した細胞から MALAT1：ゲノム DNA 複合体を回収し、単離したゲノム DNA を次世代シーケンサーに供した。得られたシーケンスリードをリファレンスゲノムにマッピングし、ピークの検出を行った。その結果、熱ストレス条件下で特異的に MALAT1 と相互作用するゲノム DNA 領域が同定された（図 4）。

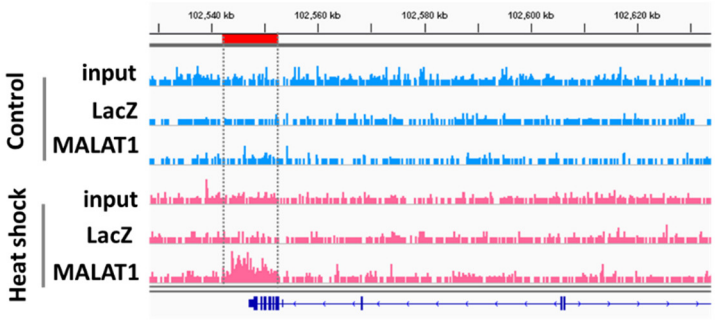


図 4. MALAT1 と相互作用するゲノム DNA 領域の同定

MALAT1 オリゴおよび LacZ オリゴを用いて ChIRP 法を行い、共沈した DNA を次世代シーケンサーにより解析した。得られたシーケンスリードをリファレンスゲノムにマッピングし、可視化した。

考　察

上記の解析により、MALAT1 含有結合タンパク質の候補として 73 種のタンパク質を同定することができた。siRNA スクリーニングにより、MALAT1 結合タンパク質の中に MALAT1 の熱ストレス時の局在変化に寄与するものが含まれていることがわかった。これらの結果から、MALAT1 が特定の RNA 結合タンパク質との相互作用を介して熱ストレスに応じた局在変化を引き起こしている可能性が考えられる。また、gene オントロジー解析の結果、スプライシング関連タンパク質が有意に濃縮されていたことから、スプライシング制御を介して熱ストレス応答に関与する可能性が高い。また、ChIRP 法により、熱ストレス細胞で MALAT1 特異的に結合するゲノム DNA 領域が同定された。このことから、熱ストレスに応答して MALAT1 が局在変化するのに伴い、ストレス非負荷時とは異なるゲノム DNA 領域を標的とすることが示唆された。これまでの研究結果より、MALAT1 含有新規核内構造体は既知の熱ストレス応答性核内構造体である核ストレスボディーと一致しなかったことから、MALAT1 を介した応答は新規の熱ストレス応答機構である可能性が高い。今後は、今回同定した構成タンパク質がどのようにして遺伝子発現制御に寄与するをさらに詳細に解析していきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

質量分析解析では東京大学アイソトープ総合センター・川村猛准教授に、次世代シーケンサー解析では東京大学新領域創成科学研究科・鈴木穣教授にご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

文　献

1) Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG, Lis JT. Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. Mol Cell. 2016 Apr 7;62(1):63-78. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.025.

2) Mizutani R, Wakamatsu A, Tanaka N, Yoshida H, Tochigi N, Suzuki Y, Oonishi T, Tani H, Tano K, Ijiri K, Isogai T, Akimitsu N. Identification and characterization of novel genotoxic stress-inducible nuclear long noncoding RNAs in mammalian cells. PLoS One. 2012;7(4):e34949. doi: 10.1371/journal.pone.0034949.

3) Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. Mol Cell. 2011 Nov 18;44(4):667-7. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.027.

4) Chu C, Zhang QC, da Rocha ST, Flynn RA, Bharadwaj M, Calabrese JM, Magnuson T, Heard E, Chang HY. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. Cell. 2015 Apr 9;161(2):404-16. doi:10.1016/j.cell.2015.03.025.