

論文の内容の要旨

Stability control of antisense long non-coding RNA and its role in gene regulation

(アンチセンス長鎖非コード RNA の安定性制御と遺伝子発現における役割)

氏名 三木 敦子

【背景と概略】 近年、RNA-seq などの発達によりタンパク質をコードしていないノンコーディング RNA が多数転写されていることが明らかになった。ノンコーディング RNA のうち、タンパク質をコードする遺伝子領域の逆鎖から転写されているものをアンチセンス RNA と呼ぶ。アンチセンス RNA の中にはセンス鎖 RNA の発現を制御する働きのあるものが報告されている。モデル生物である分裂酵母においてもアンチセンス RNA が転写されていることが報告されている (Bitton *et al.*, 2011)。グルコース飢餓によって転写が活性化される糖新生に必要な酵素 *fbp1* 領域では、mRNA が転写される前に 3 種類の長いノンコーディング RNA (mlonRNA, metabolic stress-induced long non-coding RNA) が転写される (Hirota *et al.*, 2008)。また、それと相反するように飢餓前に発現されていたアンチセンス RNA (*fbp1-as*) が減弱する様子が観察されていた (Oda *et al.*, 2015)。

本研究では、ストレス応答時の遺伝子発現におけるアンチセンスの役割を調べるために、グルコース飢餓関連遺伝子から転写されるアンチセンス RNA の動態を解析することを目的とした。具体的には、まずモデル領域として *fbp1-as* について解析を行った。*fbp1-as* の細胞内の局在および分解制御を検証したところ、核内および細胞質の存在が認められ、両部位の RNA 品質保証系によって分解制御を受け、

細胞質においてはリボソームに結合することも示された。さらにゲノム全体で同様なダイナミクスを示すアンチセンス RNA を新たに同定し、その一般性を検証した。

【実験方法及び結果】

1) *fbp1-as* の安定性と一分子 FISH (smFISH, single molecule fluorescence *in situ* hybridization)による局在の同定

fbp1-as の 5' キャップ構造に対する免疫沈降と、ポリ A 鎖に結合するオリゴ dT 結合ビーズを用いた精製を行ったのち、逆転写-定量 PCR (RT-qPCR) により *fbp1-as* を定量した。その結果、*fbp1-as* も通常の mRNA と同様、5' キャップ構造とポリ A 鎖を持っていることが明らかになった。さらに 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行ったところ、*fbp1* 遺伝子全長をカバーする長鎖の RNA に加え、*fbp1-as* 転写開始後およそ 400 塩基ほどで転写終結が生じている分子も同定できた。

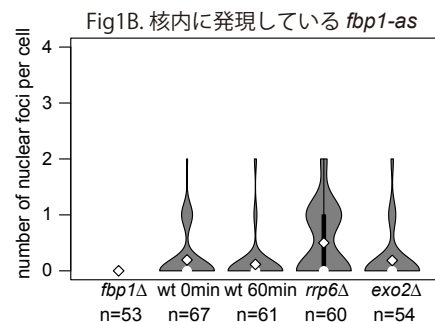
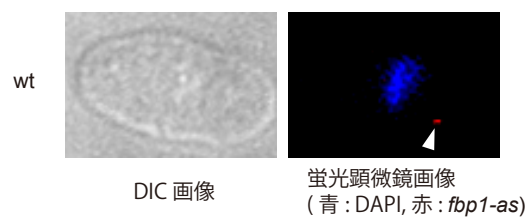
一般にノンコーディング RNA はタンパク質をコードしていないため、細胞内の RNA 品質保証系によって、「異常な転写物」とであると認識され、迅速に分解される。そこで、*fbp1-as* の半減期を測定したところ、実際に不安定な転写物であることが分かった。

さらに、*fbp1-as* の細胞内の局在を一分子 RNA FISH (smFISH) によって解析したところ、微量が核内に検出されたほか、細胞質における *fbp1-as* の存在も確認された (Fig. 1A)。

2) *fbp1-as* の安定性の制御機構

次に *fbp1-as* を不安定化している因子を同定するため、種々の RNA 品質保証系因子の破壊株を作成し、*fbp1-as* の半減期を測定した。その結果、*fbp1-as* は核内の RNA 分解に働く Rrp6 によってだけでなく、細胞質内で RNA を分解する Exo2 による分解も受けていることが明らかになった。この結果と smFISH によって得られた結果から、転写された *fbp1-as* の一部は核内エキソソームによる分解を免れ、細胞質内に

Fig1A. 細胞質内で観察される *fbp1-as* シグナル



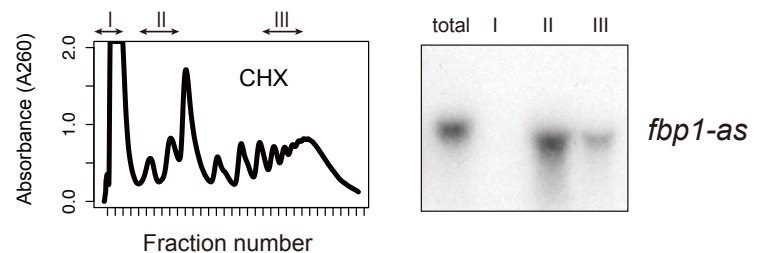
輸送されている可能性が示唆された。

そこで、破壊株を用いた smFISH を行い *fbp1-as* の局在変化を詳細に調べたところ、核内分解系の Rrp6 破壊株 (*rrp6*Δ) では核内の *fbp1-as* シグナルが増加した (Fig. 1B)。以上の結果から、核内の分解を免れた *fbp1-as* が細胞質内に輸送されることが確認された。

3) *fbp1-as* はノンコーディング RNA であるにも関わらずリボソームに結合し、翻訳に共役した RNA 分解を受ける

興味深いことに *fbp1-as* は多数の短い読み枠を持っている。また、ノンコーディング RNA がリボソームに結合している例も多数報告されている (Guttman *et al.*,

Fig2 *fbp1-as* はポリソームに結合している



2013, Aspden *et al.*, 2014)。そこで、mRNA 様の特徴を持った *fbp1-as* も細胞質でポリソームに結合しているのではないかと考え、ポリソーム分画法 (Fig. 2) による解析を実施したほか、既存のグルコースが豊富な培地で行われたリボソームプロファイリング (Ribo-seq, Subtelny *et al.*, 2014) のデータを参照したところ、実際に *fbp1-as* がポリソームと結合していることが明らかになった。

fbp1-as は不安定な転写物であるので、翻訳に共役した RNA 分解経路によって分解制御されている可能性が示唆された。そこで、翻訳に共役した RNA 分解に関与する nonsense mediated decay (NMD) 経路に働く因子、Upf1 を破壊した株 (*upf1*Δ株) を使って *fbp1-as* の半減期を測定したところ、*fbp1-as* の安定化が観察された。以上のことから、*fbp1-as* は mRNA 様の特徴を持ち、ポリソームと結合し、翻訳に共役した RNA 分解経路によって迅速に分解されていることが分かった。

4) ゲノムワイドでのストレス応答におけるリボソーム停留位置の同定と翻訳制御

先行研究では、グルコース飢餓時において *fbp1* 領域同様に、センス鎖 RNA の転写とそれと相反するパターンで減衰するアンチセンス RNA を転写している領域が複数同定されていた (Oda *et al.*, 2015)。そこで、これらの領域を中心に、先述の Ribo-seq (Subtelny *et al.*, 2014) データを解析したところ、*fbp1*

領域と同様の挙動を示す *per1* 遺伝子領域を見出した。この領域から転写されるアンチセンス RNA (*per1-as*) も *fbp1-as* と同様、ポリソームと結合していることがわかった。また NMD に働く *upf1* Δ 株において *per1-as* が安定化されたことから、*per1-as* も *fbp1-as* と同様、翻訳と共役した RNA 分解経路による分解制御を受けていることが確かめられた。

5) グルコース飢餓時の *fbp1-as* の制御

次にグルコース飢餓時に迅速に *fbp1-as* の発現量が減っていくメカニズムについて調べた。この減少にはグルコース飢餓誘導時に転写が抑制される、あるいはグルコース飢餓条件下で *fbp1-as* の分解が促進される、という 2 つのメカニズムの関与の可能性が考えられた。それを検証するために、グルコース飢餓時の *fbp1-as* の半減期を調べたところ、グルコースが豊富な時の半減期と比べて有意な差はなかった。

【考察と展望】

遺伝子発現制御は転写と分解のバランスによって制御される。本研究では、アンチセンス RNA が定常的に迅速に分解されていることに加え、アンチセンス RNA のストレスに応答した転写抑制が加わることで、アンチセンス RNA からセンス鎖 RNA の合成に急速に転換することが示唆された。ストレス応答時の遺伝子発現制御機構に、RNA 分解系が重要な役割を果たしている可能性が高い。

Fig3. モデル図

