

平成19年12月

村上和弘 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三
副主査 畠 義 郎
同 押 村 光 雄

主論文

Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted
LIT1

(刷り込み遺伝子*LIT1*のnon-coding RNAが染色体上に局在する示唆的な証拠)

(著者：村上和弘、押村光雄、久郷裕之)

平成19年11月 Journal of Human Genetics 52巻 926頁～933頁

学 位 論 文 要 旨

Suggestive evidence for chromosomal localization of non-coding RNA from imprinted *LIT1*

(刷り込み遺伝子*LIT1*のnon-coding RNAが染色体上に局在する示唆的な証拠)

目 的

ゲノム刷り込みは、ほ乳類において単為生殖を阻害する機構の一つであると考えられており、細胞のがん化、先天性疾患、ほ乳類の個体発生や成長、行動等においても重要な役割を果たしていると考えられる。ゲノム刷り込みを制御する分子機構として、DNAのメチル化、ヒストンのリン酸化、アセチル化、メチル化やDNA複製のタイミングの違い、および染色体の対合現象など塩基配列の変化を伴わない後成的修飾(エピジェネティクス)が深く関与していることが示唆されている。しかし、刷り込みを受ける遺伝子の発現制御を司る詳細な分子メカニズムは、未だ明らかになっていない。そこで、本研究の目的として蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)法およびクロマチン免疫沈降 (ChIP)法を応用し、ヒト11p15.5領域の刷り込みクラスター内に存在する*LIT1*遺伝子の発現動態解析、周辺遺伝子の発現制御機構の解明を目指した。

方 法

non-coding RNA *LIT1*が関わる周辺遺伝子発現制御の解明のために、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 法およびクロマチン免疫沈降 (ChIP)法を用いて*LIT1* RNA分子を可視化し、さらに細胞内の発現動態を解析した。また、*LIT1* RNAが*Xist* RNAと同様の制御機構を有しているかを検証するために、Fiber RNA FISHによって得られたシグナルにDNA FISHを重ねることで、RNAと周囲のゲノムDNAを同時に描画し、RNA分子が集積しているクロマチン部位の同定を試みた。

結果と考察

まず、non-coding RNA *LIT1*が関わる周辺遺伝子発現制御機構を明らかにするために、FISH法を用いて*LIT1* RNA分子を可視化し、細胞内の発現動態を解析した。その結果、*LIT1* RNAはヒト正常リンパ球由来細胞株、ヒト正常線維芽細胞において各々96%、98%と高頻度に間期核内で検出され、*LIT1* RNA分子は*LIT1* DNA近傍に局在することが明らかとなった。さら

にFiber RNA FISH解析により、クロマチン上に集積する*LIT1* RNAが観察された。一方、E6-APユビキチンタンパク質リガーゼをコードしている*UBE3a*遺伝子は65%、59%で間期核内にRNAシグナルが検出され、クロマチンファイバーに沿ったシグナルも認められなかった。

現在、non-coding RNAとしてよく知られている分子の一つに*Xist* RNAがあげられる。*Xist* RNAは、ほ乳類における遺伝子量補正機構であるX染色体不活化に関わり、不活化されるX染色体から特異的に転写される。また、転写産物であるRNA分子がそのX染色体のほぼ全域にわたってシスに結合する結果、160 MbにわたるX染色体のほぼ全長にわたって遺伝子の不活化を引き起こす。Fiber RNA FISHの結果において*LIT1* RNAのシグナルはクロマチンファイバーに沿った状態で検出されたことから、*LIT1* RNAは*Xist* RNA同様の機能をもつRNAとして、クロマチンの構造変化に伴うヘテロクロマチン化などを通してドメインレベルの遺伝子発現制御に関わっている可能性が示唆された。

しかし、RNAの安定性が低い為か、残念ながら部位の同定には至らなかった。そこで、ISH法とChIP法を組み合わせた新たな手法 (Modified RNA TRAP method) を確立し、*LIT1*転写領域外で*LIT1* RNAにより制御を受ける遺伝子領域 (*IMPT1*、*CDKN1C*) において、*LIT1* RNAの集積を検出する事に成功した。

結 論

LIT1 RNAは、*Xist* RNAがX染色体上の遺伝子を不活化する機構と同様に、細胞周期を通して安定に*LIT1* DNA周辺領域に集積し、クロマチン構造の変化を通して周辺領域の遺伝子発現制御を行っている可能性が示唆された。この*LIT1* RNAの特徴的な振る舞いは、刷り込みドメイン内の親由来の発現制御を行う上で重要であると考えられる。