

氏 名 千葉 磨玲

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1620 号

学位授与の日付 平成25年3月22日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Dynamics of RNA molecules during mitosis in cultured cell lines

論文審査委員 主 査 教授 颯田 葉子
准教授 田辺 秀之
准教授 大田 竜也
教授 前島 一博

論文内容の要旨

Mitosis is characterized by the segregation not only of genomic component but also of cellular component into two newly formed daughter cells. This biological event consists of 1) hypercondensation of chromosomes, 2) alignment and segregation of homologous chromosomes, and 3) re-distribution of nuclear and cellular proteins to synthesize cellular structures in daughter cells. These processes are highly organized and require orchestrated movement of thousands of biological molecules in a short period of time. Proteins, among many biological molecules, have been considered as primary molecules with significant roles in maintaining cellular functions during mitosis. Numerous studies have been conducted to identify and characterize proteins which facilitate the cellular processes but there still remain many questions regarding to the cell division process and daughter cell formation. Recently RNA molecules, both protein-coding and non-coding, have been paid attention to their functional role in mitosis. During mitosis, the RNA molecules may facilitate cellular mechanisms of chromosome segregation and daughter cell formation. However, few studies to reveal the function of RNA molecules during mitosis. In order to comprehend the roles of RNA during mitosis, the types of RNA molecules and the localizations of RNA molecules would be the keys for understanding the roles of RNA molecules during mitosis. In accordance with previous studies, the goal of my doctoral research is outlined as follows: 1) the types of RNA molecules during mitosis, and 2) the localization patterns of RNA molecules during mitosis.

First, I characterized the types of the RNA molecules in mitosis by using microarray analysis. It revealed that there were wide varieties of the RNA molecule presence in mitotic cells. The abundance of mRNA of 1656 genes in HeLa cells and of 1543 genes in TIG-1-20 cells. The genes are involved in the cellular processes such as translation, RNA splicing, transport, transcription, cell motility, cytoskeleton organization and biogenesis, regulation of progression through cell cycle, regulation of apoptosis, fructose metabolism were categorized. Those functions were observed among 1300 genes that were relatively abundant i.e., showing signal intensities more than 1000, in both HeLa cells and TIG-1-20 cells. Especially, those involved in translation, transcription, and cytoskeleton organization and biogenesis were relatively higher signal intensities in mitosis than those in interphase cell origins. That finding elucidated that RNA molecules not only deposited during mitosis but also may be continued to exist in G1 phase were observed from that microarray analysis. Other RNAs detected with higher signal intensities in microarray analysis are those coding CCNB1, mitotic-specific cyclin-B1, CDC20, cell division cycle protein 20, ANAPC11 and PRC1, the component of the anaphase promoting complex that controls progression through mitosis and the G1 phase of the cell cycle. In addition, RNAs coding for 1) the cytoskeleton proteins such as keratin cytoskeletal genes, tubulin alpha-1 chain, actin cytoplasmic 2, and actin cytoplasmic 1, and 2) those for histone modification proteins, such as histone H3.3 and histone H2AZ, were detected.

In second, I showed the distribution of total RNA during mitosis and identified the presence of specific structure surrounding the mitotic chromosome named mitotic chromosome coating spheres (MiCCS) with using an in-cell RNase sensitivity assay as well as an in-cell deproteinization assay. The presence of MiCCS was also detected not only in human tumor cell lines but also in mammalian tissue culture cells derived from several species, indicating the formation of MiCCS would be in common among mammalian cell division processes. In addition, by applying metaphase chromosome spreads with DNA/RNA dual staining, I have discovered the presence of RNA in the specific chromosomal regions; subtelomeric regions, subtelomeric, centromeric, and interstitial regions in both Vero cells and Indian Muntjac cells. Dual color staining of RNA and DNA showed remarkable banding patterns on the mitotic chromosomes, but the patterns were distinct from those of other chromosome banding patterns. Furthermore the results of 3D-RNA-FISH showed that different types of RNA molecules distributed in each specific in the cytoplasm of mitotic cells.

Overall, the presence and distribution of RNA molecules revealed here would cast the new light on understanding the complex mechanisms of cell division process and daughter cell formation process in cultured cell lines. The localization of RNA molecules in cytoplasm and mitotic chromosomes during mitosis may be functioning as for the regulations of gene expression to be required till newly daughter cell formation.

博士論文の審査結果の要旨

これまでヒトや様々な生物種由来の培養細胞を用いた研究から、細胞周期の中で RNA が転写されるのは間期であり、分裂期には転写が抑制されるという現象、すなわち「分裂期転写抑制」と呼ばれる機構が働いていると考えられている。しかし、「転写抑制」は必ずしも、RNA 分子が存在しないことを意味しているのではない。実際に、これまで分裂期にも RNA 分子の存在は知られている。しかし、その種類や量、局在、動態、機能の詳細についてはほとんど明らかにされてこなかった。本博士論文では、「Dynamics of RNA molecules during mitosis in cultured cell lines (培養細胞分裂期における RNA 分子のダイナミクス)」と題して、分裂期細胞における RNA 分子の種類と量の同定を行い、さらに RNA 分子の細胞内局在、動態、細胞内空間配置に関する解析を行った。その目的に沿って行った以下の解析を論文の各章にまとめている。

1) 分裂期細胞における RNA 分子の種類と量の同定：ヒト子宮頸部由来上皮腫瘍細胞 (HeLa) 及びヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (TIG-1-20) を用いて、それぞれ間期細胞と分裂期細胞から total RNA を精製し、DNA マイクロアレイ解析で発現遺伝子の種類の同定を行った。マイクロアレイ解析の DNA チップには東レ 3D-Gene を用いた。チップはそれぞれ、mRNA (Human Oligo chip 25K)、miRNA (Human miRNA Oligo chip 1.7 K) を含んでおり、これらの遺伝子を解析の対象とした。また各遺伝子の発現量は、蛍光強度により判定した。解析の結果、mRNA 分子では、分裂期細胞において HeLa と TIG-1-20 で共通して蛍光強度 1000 以上のものが 1300 種類、間期細胞に比べて分裂期細胞で蛍光強度比が 2 倍以上のものが 101 種類同定された。これらの遺伝子機能は翻訳・転写関連因子、細胞骨格、細胞周期調節因子などであることが見出された。一方、miRNA 分子では、蛍光強度 100 以上のものが HeLa では 25 種類、TIG-1-20 では 29 種類同定され (共通 20 種類)。また、間期細胞に比べて分裂期細胞で蛍光強度比が 2 倍以上のものが、HeLa では 28 種類、TIG-1-20 では 51 種類 (共通 4 種類; miR-513a-5p など) が同定された。

2) RNA 分子の細胞内局在解析：RNA 特異的染色試薬 (sytoRNA select) を用いて、間期細胞および分裂期細胞 (前期、中期、後期、終期) における細胞内の全 RNA の局在を明らかにした。分裂期においては、RNA が染色体上に多く存在することを確認するとともに、段階的な細胞内脱タンパク質処理を行うことで RNA とタンパク質の複合的高次構造物の細胞内の局在を明らかにした。特に、分裂期中期には、染色体領域を大きく取り囲むように RNA に富む空間領域が存在することを初めて見出し、これを「分裂期染色体包括領域: mitotic chromosome coating sphere (MiCCS)」と命名した。MiCCS はヒトを含む哺乳類由来の各種細胞株においても共通して観察され、細胞分裂において重要な働きを担っている可能性が示された。

3) 分裂中期染色体上の RNA 分子の局在解析：染色体展開法により固定した分裂中期染色体を対象とし、sytoRNA select により染色体上の RNA 分子の局在を明らかにした。

染色体上の局在する部位を調べるために、ヒト培養細胞よりも染色体の数が少なくまた各染色体が比較的大きな Indian Muntjak 細胞を用いた。この観察像より、RNA 分子の局在による染色は従来の R-/G-banding パターンとは異なるユニークな分布パターンを示し、サブテロメリック領域、セントロメア領域に RNA 分子の強いシグナルが見出されることを明らかにした。

4) 3D-RNA-FISH 法による分裂期細胞における rRNA、mRNA、miRNA の空間配置解析：cDNA および LNA を用いたプローブを作成し、共焦点レーザー顕微鏡を用いた 3D-RNA-FISH 法により、それぞれの RNA 分子の局在パターンの細胞内空間における特徴を明らかにした。

本博士論文では分裂期細胞における RNA 分子の種類と量の同定、細胞内局在、動態、細胞内空間配置に関する解析を通じて、細胞分裂時における RNA 分子の振る舞いの一端が明らかにされている。上記 2) 3) 4) に関する部分は、国際学術誌である Chromosome Science 誌に掲載済みである。RNA 分子が、染色体、MiCCS、細胞質、細胞膜周辺部に適切に細胞内に配置され、染色体分配・細胞質分配に伴ってほぼ均等に分配されながら、娘細胞の形成にも寄与している可能性がある等、新たな知見が盛り込まれており、本論文は博士（理学）に十分値するものであると判断した。