

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18474

研究課題名(和文) RNAの難容性を規定するRNAエレメントの同定

研究課題名(英文) Identification of the RNA elements that determine semi-extractability of RNAs

研究代表者

山崎 智弘 (Tomohiro, Yamazaki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：90732280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NEAT1 lncRNAは、パラスペックルと呼ばれる核内構造体の形成に必須の役割を持つ。このNEAT1はRNA抽出に一般的に汎用されるAGPC試薬に溶解しにくいことを見出していた。私たちはこの性質を難溶性と名付けた。この難溶性RNAは熱処理により可溶化することを見出した。また、このNEAT1の性質には、NEAT1の中央領域の配列及びそこに結合するFUSなどのRNA結合タンパク質が特異的に寄与していることが明らかとなった。さらに、RNA-seqを用いて、網羅的に難溶性RNAを探索したところ、パラスペックルのように核内構造体を形成するRNAを複数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：NEAT1 architectural RNA (arcRNA) is an essential core of the nuclear body called paraspeckle. We have recently found that a subset of RNAs are hard to be extracted by the AGPC reagent. We termed this feature "semi-extractable". Heating with shaking can make semi-extractable RNAs soluble. We investigated what RNA sequences and binding proteins generate this semi-extractable feature by using NEAT1 lncRNA as a model. Then we identified the middle domain of the NEAT1 is required for its semi-extractability and RNA binding proteins such as FUS, which binds to the middle domain of the NEAT1. By utilizing this semi-extractable feature in RNA-seq, we have identified the tens of semi-extractable RNAs in cell lines. Some of them form nuclear bodies like the paraspeckles, suggesting the utility of this method to identify new arcRNAs.

研究分野：分子生物学、生化学、細胞生物学

キーワード：RNA抽出 核内構造体 lncRNA NEAT1 RNAシーケンス CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

(1) 当研究室では、核内構造体パラスペックルの骨格として必須の役割を持つ NEAT1 long noncoding RNA (lncRNA) を集中的に解析している。本研究は、この NEAT1 lncRNA を解析する中で最近見出した、NEAT1 lncRNA を始めとする、ある一群の RNA が RNA 抽出に一般的に使用される AGPC (Acid Guanidinium thiocyanate Phenol Chloroform extraction) 試薬 (市販品としては TRIzol などが挙げられる) に対して溶解しにくいという発見を起点としている。このような性質を私たちは“難溶性”と呼び、このような性質を持つ RNA を“難溶性 RNA”と名付けた。しかし、この発見の端緒となった NEAT1 lncRNA は強い難溶性を示すものの、この性質を付与するメカニズムは不明であった。

(2) この溶解しにくい難溶性 RNA を可溶化する方法として、注射針に 100 回程度通すことで可溶化できることを見出している。しかし、この操作は非常に煩雑であり、多数のサンプルを同時に扱うことや少量のサンプルを扱うには不向きな方法であったことから、この抽出方法の改良が求められた。さらに、どのような RNA がこのような性質を保持するのか、共通した機能があるのかなどについては不明であった。

2. 研究の目的

(1) RNA の難溶性という性質がいかにして獲得されるのかについて、どのような RNA の配列・結合タンパク質によるものであるか、つまり、“難溶性を規定するエレメント”を明らかにすることを目指した。

(2) これまでの難溶性 RNA を抽出する方法は、注射針に 100 回も通すという非常に煩雑な方法であった。そのため、多検体の処理や微量のサンプルの処理などには不向きであった。そこで、この手法の簡便化及び汎用化を目指した。

(3) この難溶性 RNA の生理機能について明らかにするため、難溶性を持つ RNA の網羅的な探索とその RNA の共通性を探索した。また、この解析は、難溶性という指標のバイオマーカーとしての有用性についての可能性を調べることに繋がると考えた。さらに、難溶性の発見から、難溶性を持つ RNA の量がこれまで過小評価されてきた可能性も浮上してきたことから、この解析により、これまでの次世代 RNA シークエンスなどの解析において、難溶性はどれほどの RNA の発現量に影響があるかについて、一定の答えを得ることにもなると考えた。

3. 研究の方法

(1) 難溶性を解析するモデルとして、非常に

強い難溶性を示す NEAT1 lncRNA を選択し、その難溶性を生じるメカニズムの解明を進めた。特に、どのような RNA の配列が重要であるかに焦点を当てて解析を進めた。この際、実験系として、ヒト一倍体細胞株 HAP1 を使用して、CRISPR/Cas9 システムを用いることで、ゲノム上に 1 コピー存在する NEAT1 の欠失等を導入する系を使用した。NEAT1 は 23kb もある非常に長い lncRNA であるが、全長に渡り、様々な長さの欠失を導入することで、網羅的に難溶性に関わる領域の探索を行った。

(2) これまで、主に当研究室が同定してきたパラスペックルタンパク質のうち、どのタンパク質が NEAT1 の難溶性に影響を与えるかについて解析した。この際、上述のヒト一倍体細胞株 HAP1 を用いた CRISPR/Cas9 システムにより、ロックアウト細胞株を樹立し、解析を進めた。さらに、ここで同定されたタンパク質と難溶性に重要な RNA 領域との相互作用についても解析を行うことで、難溶性を規定するエレメントを同定した。

(3) 抽出方法の改良という点については、種々の方法(熱処理、震盪、超音波処理など)を試した。この際、バイオアナライザーを用いて、RNA が分解されていないことについても検討を行い、最適な方法を探索した。

(4) これまでに、次世代 RNA シークエンスを用いて、従来の抽出方法と難溶性 RNA の改善抽出方法で精製した RNA を比較し、網羅的に、HeLa 細胞株における難溶性 RNA を同定してきた。これにより、それはどういった RNA なのか、また、それらには何か共通性があるのかについても検討を行った。NEAT1 lncRNA が著しい難溶性を示すことから、一つの可能性として、難溶性 RNA は、細胞内構造体に含まれる RNA の可能性が考えられたため、その可能性について、RNA-FISH 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト一倍体細胞株 HAP1 を用いて、NEAT1 の解析を行うにあたり、まず HAP1 細胞における難溶性を確認した。qPCR 法を用いて確認を行ったところ、これまでの解析に使用していた HeLa 細胞で見られたのと同様に、約 10-20 倍程度の強い難溶性が観察できたことから、HAP1 細胞は NEAT1 の難溶性の解析に適していると判断した(図 1)。そこで、この HAP1 細胞株を用いて、NEAT1 の様々な領域を欠失させた変異体を CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した。重要な領域を網羅的に同定するために、これまでに、150 種類以上の変異細胞株を樹立した。その中で、特に NEAT1 の中央領域を大きく欠失した変異株 (Δ middle) では、パラスペックルの形成に異常を示し、パラスペックル

クルが会合できず、NEAT1 のシグナルが核質に散在した。この構造の異常は、超解像度顕微鏡や電子顕微鏡を用いた解析によっても観察され、パラスペックルの秩序を持った構造が壊れていることが明らかとなった。そこで、この変異株を使用し、NEAT1 の難溶性を確認したところ、難溶性が大きく低下していた (図 1)。

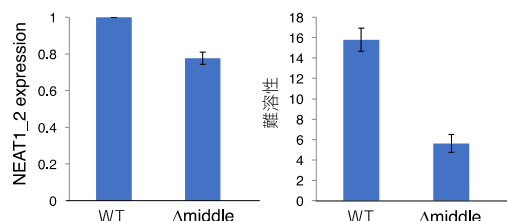


図 1 NEAT1 中央領域欠失株 (Δ middle) における難溶性の低下 (NEAT1 の可溶化)

また、比較として、NEAT1 の別の領域を大きく欠失した変異体 (パラスペックルの形成は正常) では、中央領域の欠失の場合に比べると、難溶性の低下は緩やかであった。中央の領域がより特異的に難溶性に影響を与えることが明らかとなった。

(2) 可溶化しない NEAT1 が抽出の過程でどこに存在しているかを探索した結果、中間層に存在していたことから、非常に強い変性状態にあるにもかかわらず、タンパク質と複合体を形成していることが強く示唆された。そこで、NEAT1 上のどこの RNA 領域が必要かという解析に加えて、パラスペックルタンパク質のうち、どのタンパク質が NEAT1 の難溶性に寄与するかを探索した。主要なパラスペックルタンパク質、約 20 種類について、HAP1 細胞株を用いて、ノックアウト細胞株を樹立し、それらの細胞株における NEAT1 の難溶性を測定した。すると、RNA 結合タンパク質 FUS のノックアウト細胞において、NEAT1 の難溶性が有意に低下することが明らかとなった。また、これまでの解析から、FUS は、パラスペックルの会合に必須の役割を持つことがわかっており、この機能において、プリオン様ドメインが必須であることも明らかとなっている (Hennig *et al.*, JCB 2015)。そこで、プリオン様ドメインを欠失した FUS を発現することで難溶性の変化を観察したが、プリオン様ドメインが難溶性を付与する上で重要であることが明らかとなった (Chujo *et al.*, EMBO J. 2017)。また、FUS に加えて、パラスペックルの形成に必須の役割を持つ NONO のノックアウト細胞においても NEAT1 は顕著に難溶性が低下することが明らかとなっていった。また、残りのノックアウト細胞株では、顕著な難溶性の低下は認められなかったことから、FUS 及び NONO が特異的に NEAT1 の難溶性に寄与していることが示唆された。また、FUS 及び NONO は数多くの RNA と結合することが知られているため、これらが単に結合している

だけで、難溶性が生まれるのであれば、非常に多くの RNA が難溶性になるはずである。しかし、私たちの RNA シークエンス解析から、それほど多くの RNA が難溶性ではないことを考えると、複数の因子が関わることで難溶性を生んでいることが考えられる。一つの可能性として、FUS と NONO が協働することで、難溶性を生んでいる可能性が考えられる。また、これら二つの因子以外も関与することで難溶性を生んでいる可能性が考えられた。

また、 Δ middle 株においては、FUS 及び NONO の局在が低下していた。これと合致するように、この RNA 結合タンパク質と RNA との結合部位を同定する CLIP 法を用いた解析結果から、これら二つのタンパク質が強くこの中央の領域に結合することも明らかとなった。これらの結果から、 Δ middle 株での NEAT1 の難溶性が低下には、FUS 及び NONO が寄与していることが示唆された。

FUS はプリオン様ドメインを介して、難溶性を生んでいることが明らかとなったが、もう一つの難溶性因子である NONO は X 線結晶構造解析から、Coiled coil ドメインを介して、ポリマーを形成すること、加えてプリオン様ドメインを有することが明らかになっていることから、今後、これらのドメインの重要性を明らかにすることで、難溶性の実態がさらに理解できるようになるものと期待できる。

(3) 抽出方法の改良という点については、種々の方法を試みた結果、55 で 10~20 分程度保温しつつ、震盪する方法 (Thermo mixer [Thermo Scientific], 1000 rpm) が RNA の分解を最小限に抑えつつ、NEAT1 を従来の注射針を通す方法と同程度の効率で可溶化できることが明らかとなった (Chujo *et al.*, EMBO J. 2017)。この方法であれば、多検体のサンプルや微量のサンプルでも簡単に抽出を行うことが可能である。

(4) NEAT1 以外にも、A-body と呼ばれる核内構造体の骨格として機能する IGS lncRNA も難溶性を示すことがわかってきたことから、構造体を形成する RNA が溶解しにくいのではないかとこの可能性が浮上した。そこで、次世代 RNA シークエンスによる網羅的な探索で見出した難溶性 RNA のうちの発現量の高いものの局在を解析したところ、核内で顆粒状の構造として観察された。また複数の細胞株で、網羅的な難溶性 RNA の探索を行った結果、細胞によって異なる RNA が難溶性を示すことも明らかとなった。これらの結果から、構造体を形成するという特性を持つ RNA を探索する手段としての難溶性の有用性が強く示唆された (Chujo *et al.*, EMBO J. 2017)。

次世代 RNA シークエンス解析では、数倍程度の影響を認めるものは多数あったもの

の、NEAT1 以外に 10 倍を超えるような、大きな影響を受けるものは見つからなかったが、特定の細胞や条件、さらにはヒト以外の別の生物種においては、大きな影響を認めるものも存在する可能性もあることから、その際には、改善された抽出方法は有効であると考えられる。

さらに、現在 HAP1 細胞株などの種々の細胞株や条件における難溶性 RNA の探索も進行・計画しており、この中から共通性や探索することで、さらなる構造体の骨格として機能する arcRNA の同定につながることを期待できる。また、RNA 配列とそのパートナータンパク質の同定により、arcRNA により誘導される構造体の形成機構について詳細な分子機構の理解につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuya Kawaguchi, Satoshi Kurosaka, Toru Takumi, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose, "Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs", *The EMBO Journal*, 査読あり, in press, 2017

DOI: 10.15252/embj.201695848

Sayaka Saitoh, Takeshi Maruyama, Yuta Yako, Mihoko Kajita, Yoichiro Fujioka, Yusuke Ohba, Nobuhiro Kasai, Natsu Sugama, Shunsuke Kon, Susumu Ishikawa, Takashi Hayashi, Tomohiro Yamazaki, Masazumi Tada, Yasuyuki Fujita, "Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読あり, Vol.114, 2017, E2327-E2336

DOI: 10.1073/pnas.1602349114

Yukina Nishito, Natsuko Tsuji, Hitomi Fujishiro, Taka-aki Takeda, Tomohiro Yamazaki, Fumie Teranishi, Fumiko Okazaki, Ayu Matsunaga, Karin Tuschl, Rajini Rao, Satoshi Kono, Hiroaki Miyajima, Hiroshi Narita, Seiichiro Himeno, Taiho Kambe, "Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 Protein as a Manganese Transporter", *The Journal of Biological Chemistry*, 査読あり, Vol.291, 2016, 14773-14787

DOI: 10.1074/jbc.M116.728014

Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose, "Architectural RNAs

(arcRNA): A class of long noncoding RNAs that functions as the scaffold of nuclear bodies", *Biochim Biophys Acta*, 査読あり, Vol.1859, 2016, 139-146

DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.05.007

[学会発表](計10件)

山崎智弘, Sylvie Souquere, 木立尚孝, Archa H. Fox, 中川真一, Gerard Pierron, 廣瀬哲郎, "NEAT1 lncRNA に潜むパラスペックル構築を司る RNA エlement", 第2回北大・部局横断シンポジウム「免疫・癌・感染」, 2017年3月14日, 北海道大学工学部鈴木章記念ホール(北海道・札幌市)

Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Archa H. Fox, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, Tetsuro Hirose, "Liquid-liquid phase separation induced by NEAT1 lncRNA that builds paraspeckle nuclear body", *Phase Separation and RNA Processing as Drivers of Cancer and Neurodegenerative Disease*, 2017. 2. 24-2017. 2. 26. San Diego (USA)

Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Hisanori Kiryu, Yuki Baba, Kazuki Mugikura, Archa H. Fox, Charles S. Bond, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, Tetsuro Hirose, "NEAT1 lncRNA に潜むパラスペックル構築を司る RNA エlement", 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~2016年12月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Archa H. Fox, Gerard Pierron, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose, "Decoding "architectural" RNA elements in NEAT1 lncRNA", *RNA2016*, 2016年6月28日~2016年7月2日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

山崎智弘, Decoding "architectural" RNA elements in NEAT1 lncRNA, 2016年日本生物物理学会北海道支部・日本生化学会北海道支部合同シンポジウム, 2016年3月14日, 北海道大学大学院薬学研究院(北海道・札幌市)

山崎智弘, Sylvie Souquere, Gerard Pierron, 中川真一, 廣瀬哲郎, "CRISPR/Cas9-mediated dissection of NEAT1 lncRNA to identify "architectural" RNA elements", 第1回北大・部局横断シンポジウム「生体防御システムとその破綻」, 2016年3月7日, 北海道大学医学部フラテホール(北海道・札幌市)

Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose, "CRISPR/Cas9-mediated dissection of NEAT1 lncRNA to identify "architectural" RNA elements", *Keystone Symposium: Noncoding RNAs in*

Health and Disease, 2016年2月21日
～2016年2月24日, Santa Fe (USA)
山崎智弘、廣瀬哲郎、「CRISPR/Cas9 シス
テムを用いた NEAT1 lncRNA に潜む構造構
築エレメントの探索」、RNA フロンティア
ミーティング 2015、2015年12月8日～
2015年12月10日、タカミヤヴィレッジ
ホテル樹林(山形県・山形市)
Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose,
“CRISPR/Cas9-mediated dissection of
NEAT1 lncRNA to identify architectural
RNA elements”, 第38回日本分子生物学
学会年会(BMB2015), 2015年12月1日～
2015年12月4日, 神戸ポートアイラン
ド(兵庫県・神戸市)
山崎智弘、「RNA 研究を続けて: 生命科学
研究科から研究キャリアをスタートし
て」、平成27年度京大生命科学研究
科ロトリート、2015年10月29日～2015
年10月30日、同志社大学びわこトリ
ートセンター(滋賀県・大津市)

- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
なし

〔図書〕(計1件)

山崎智弘、廣瀬哲郎、羊土社、ノンコー
ディング RNA テキストブック、2015、251
(96-97)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/rna/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 智弘(YAMAZAKI, Tomohiro)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教
研究者番号: 90732280