

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17H03604

研究課題名(和文) 逆遺伝学スクリーニングを用いた新規長鎖ノンコーディングRNAの生理機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of novel lncRNAs using reverse genetics

研究代表者

中川 真一 (Nakagawa, Shinichi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：50324679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトやマウスを含む高等生物のゲノムからはタンパク質をコードしないノンコーディングRNAが大量に転写されている。本研究では、膨大な数の未解析lncRNA群の中から生理機能を持つ候補遺伝子を体系的に選び出し、その機能解析を効率良く進める手法を確立することを目指した。その結果、UV照射後のRNAの回収量を指標に、タンパク質と強固な複合体を形成している機能性lncRNAを予測することができることが明らかとなった。また、簡易ゲノム編集法であるiGONAD法を用いて、lncRNAの機能を欠失するゲノム編集マウスを効率よく作製する手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膨大な数のlncRNAが重要な機能を持っているのか。あるいはそれらは単なる転写のノイズであり機能的な役割を果たしていないのか。この問題に関してはlncRNAの発見以来20年以上に渡って議論が続いており、変異体を作製してその表現型解析を行うことの重要性が指摘されている。本研究の成果によって効率よく機能性のlncRNAを予測することが可能となり、機能未知のlncRNAの役割について、実験的な検証が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Large numbers of non-protein-coding RNAs are transcribed from the genomes of higher organisms including human and mouse. In this study, we aimed to systematically select functional lncRNA candidate genes and to establish an efficient method for functional analyses. We found that functional lncRNAs that form tight complexes with proteins can be predicted based on the amount of RNAs recovered from the aqueous phase after UV irradiation. We also established a method to efficiently generate mutant mice lacking lncRNA function using the iGONAD method, a recently developed method that enables a low-cost, high-efficient genome editing.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノンコーディングRNA 核内構造体 iGONAD ゲノム編集 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

FANTOM や ENCODE などの国際コンソーシアムによる大規模なトランスクリプトーム解析によって、高等真核生物のゲノムからは、タンパク質をコードする mRNA の種類と匹敵する数の、大量の「ノンコーディング RNA」が転写されていることが明らかとなっている。ノンコーディング RNA の中でも特に詳細な機能解析が進められているのがマイクロ RNA を始めとする「小さな RNA」であり、RNA サイレンシングと総称される機構を通じて細胞の分化や増殖、生殖細胞の維持など、重要な生命現象を制御している。しかしながら、小さな RNA の遺伝子数はノンコーディング RNA 全体の半分以下であり、残りの大半は長さが 200 塩基以上の、「長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA: long noncoding RNA)」と呼ばれる分子群で占められている。従って、ゲノムから ncRNA が大量に転写されていることの意義を明らかにするためには、これら lncRNA の生理機能や分子機能の全体像を明らかにしなくてはならないことは明白である。

2. 研究の目的

現在までに明らかとなっている lncRNA の機能として、エピジェネティックな遺伝子発現の制御が挙げられる。例えば、X 染色体の不活性化を制御する Xist は核マトリクスタンパク質との相互作用を利用して将来不活性化される X 染色体全体を覆い尽くし、ヒストン修飾酵素や DNA メチル化酵素などの各種クロマチン制御因子を呼び込むことで、染色体レベルでの遺伝子発現抑制を制御している。同様のメカニズムで機能している lncRNA として Hotair や Kenq1ot1、Airn などが知られているほか、ごく最近になって、染色体のトポロジーを制御する Firre、ゲノム安定性を制御する Norad なども報告されており、DNA との直接・間接の相互作用を通してゲノムの機能を制御することが、lncRNA の主要な役割の一つなのではないかと考えられている。

lncRNA のもう一つの主要な機能は、核内構造体の機能制御である。高等真核生物の核内は様々な核内構造体で満たされており、それぞれの核内構造体は特定の核内プロセスに関わるタンパク質や核酸を集積し、反応を区画化することで、複雑な制御を可能にしている。代表的な核内構造体の例として、リボゾームの合成工場である核小体、snRNA-タンパク質複合体の集合に関わるカハール体、ポリコーム複合体が集積するポリコーム体、スプライシング因子の貯蔵庫と考えられている核スペckル、Fus や Tardbp など遺伝性の神経変性疾患の原因となる RNA 結合蛋白質が集積するパラスペckルなどがある。興味深いことに、それぞれの核内構造体には特定の lncRNA が局在しており、Neat1 はパラスペckルの構造を保つ骨格因子として働いているほか、核スペckルに局在する Malat1 はスプライシング因子の機能制御、ポリコーム体に局在する Tug1 は転写制御に関わっていると考えられている。

これらの研究を通して lncRNA 分子群が偶発的な転写副産物ではなく、実際に生体制御に関わる重要な分子であることが広く受け入れられるようになってきたが、文献上機能が報告されている lncRNA は全体の 1.6% にすぎず、98.4%、すなわち 1 万種を優に越すものが、全く解析が手つかずのまま放置されている。lncRNA の多くは神経系で特異的に発現しており、ヒトやマウスで見られる複雑な神経系の機能制御に寄与している可能性も指摘されている。本研究では、これらの仮説を検証するために、膨大な数の未解析 lncRNA 群の中から生理機能を持つ候補遺伝子を体系的に選び出し、その機能解析を効率良く進める手法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

これまでに知られている機能性の lncRNA はいずれもタンパク質と強固な複合体を形成していることが知られている。一方、偶発的な転写産物や非機能性の lncRNA は一過的にしかタンパク質と相互作用しないのではないかと考えられる。そこで、これらの lncRNA を区別するために、UV 照射への感受性の違いを利用することにした。UV 照射は、RNA に直接結合しているタンパク質と RNA との間に共有結合形成を誘導することが知られているが、その効率は低く、100 mJ/cm² 程度のエネルギーでは、1% 以下の効率でしか共有結合は形成されない。従って、細胞に弱い UV を照射した後に定法のフェノール・グアニジン法で RNA の抽出を行った場合、タンパク質と強固な複合体を形成していない RNA は、UV を照射しない条件と遜色のない効率で水層

から回収されるはずである。一方、多数のタンパク質と巨大複合体を形成している RNA の場合、高確率で少なくともどれか一つのタンパク質と共有結合が形成されるので、UV 照射後にフェノール・グアニジン処理を行うと、変性タンパク質とともに中間層に分画され、水層からの回収率が著しく低下するはずである。この違いを利用し、回収された RNA を次世代シーケンサーで解析することで、特にタンパク質と強固な複合体を形成している、すなわち生理機能を持っている可能性が高い lncRNA をリスト化することができる。

得られた候補遺伝子の生理機能を解析するために最も強力な手段となるのが、変異体の作製とその表現型解析である。lncRNA の多くは種特異的、あるいは哺乳類特異的な遺伝子であり、それらの機能を解析するためには変異マウスの作製が必須となる。従来、変異マウスの作製は組み換え ES 細胞の作製や胚盤胞への ES 細胞のインジェクションによるキメラマウスの作製など高度な技術を必要とし、体系的な変異体の作製には莫大な経費が必要であった。より簡便に lncRNA の変異体を作製するために近年著しく進歩したゲノム編集技術を取り入れ、上記の手法で得られた候補遺伝子について解析を行った。

4. 研究成果

タンパク質と強固な複合体を形成している lncRNA を同定するために、ヒト培養細胞株である HEK293 と HepG2、マウス培養細胞株である Neuro2A、および、マウスの海馬神経細胞の初代培養に UV を照射し、フェノール・グアニジン法で RNA を回収した後に RNA-Seq 解析を行った。その結果、*Xist*、*Neat1*、*Gomafu*、*Malat1*、*Norad* など、ゲノム制御や核内構造体の制御に関わる機能性 lncRNA は著しく回収量が減少することが明らかとなった。一方、*Uph* や *Blustr* など、その領域が転写されることは重要であるが転写された lncRNA そのものには機能が無いような lncRNA は、UV 照射後も水層から効率よく回収されることがわかった。これらの結果から、予定通り、本法によって機能性の lncRNA を予測できることが明らかとなった。我々はこの手法を、UPA-Seq (UV-phenol aqueous phase RNA sequencing) と呼ぶことにした。続いて、UPA-Seq で UV 照射後の回収率の大きい新規機能性 lncRNA の候補遺伝子のリストを作製し、その細胞内局在を蛍光 in situ hybridization (FISH) で調べた。その結果、少なくとも 10 種類の lncRNA が核内に局在し、何らかの構造体を形成していることが明らかとなった。また、miRlet7b の前駆体をはじめとして、miRNA の前駆体の中には UPA-Seq で回収量が著しく減少し、しかも核内で大きな foci を作るものがあることが明らかとなった。これらの結果を原著論文として報告した (Komatsu et al. (2018) *RNA* 24, 1785-1802)。

次に、UPA-Seq で得られた機能性 lncRNA の候補遺伝子について、変異マウスの作製を試みた。本課題を遂行している過程で、CRISPR-Cas9 の複合体を交尾後 0.5 日目の卵管膨大部に注入してエレクトロポレーションをすることで簡便に変異マウスを作製することができる iGONAD 法が、東海大学の塚博士によって報告された。そこでこの手法を導入し、lncRNA の機能喪失個体の作製を試みた。それに先立ち、複数の RNA 転写終結シグナルと RNA 切断シグナルを *NEAT1* 遺伝子の転写開始直後にノックインし、lncRNA の転写産物を減少させる効果を比較した。HDV、Hammerhead ribozyme、Twister、CPB3、Masc、SV40-polyA についてそれぞれ HAP1 細胞のノックイン細胞を作製したところ、SV40 が最も効果が高く、しかもノックイン効率も高いことが明らかとなった。そこで、候補遺伝子の一つ、Rab30AS について poly-A 挿入ゲノム編集マウスを作製した。Rab30AS の転写開始直後を切断する crRNA と Cas9 の複合体、及び poly-A 配列の両側に 150 塩基のアームを付けた合成一本鎖オリゴヌクレオチド DNA (ssODN) を用いて iGONAD を行ったところ、約 10% の効率でノックイン個体を得ることができた。Rab30AS ノックアウトマウスは外見上異常を示さず、マウスの発生には必須では無いことが分かった。

次に、複数の転写開始点を持つ遺伝子について機能喪失個体を確実に作製するために、遺伝子領域を大きく欠損するマウスの作製を試みた。miRlet7b の宿主遺伝子は複数の転写開始点を持ち、一番長いアイソフォームは全長 55 kb もの長さを持つ。この領域を欠損させるために転写開始部位および転写終結部位に crRNA を設計し、欠失後に末端がジョイントした配列を持つ 150 塩基の ssODN とともに iGONAD を行ったところ、デザイン通りのゲノム編集マウスのヘテロ個体を得ることができた。

iGONAD 法を実施する過程で、卵管膨大部に溶液をインジェクションした後にピンセットで膨大部を軽くもんでやるとゲノム編集の効率が向上することが明らかとなった。この結果を原著論文の共著者として発表した (Gurumurthy et al. (2019) *Nature Protocol* 14, 2452-

2482)

その他、パラスペックルの骨格因子として働く *Neat1* について、短いアイソフォームを欠損する変異マウスを作製し、このアイソフォームがマウスの発生や生存には必要ないことを明らかにした (Isobe et al., *RNA* (2020) 26, 251-264)。また、ノンコーディング RNA としてアノテーションされていた UGS148 が細胞タイプ特異的な小胞体タンパク質をコードしていること、その変異マウスが外見上大きな異常を示さないことも明らかにした (Takahashi et al. (2022) *Genes Cells* 27, 43-60)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kukharsky Michail S., Ninkina Natalia N., An Haiyan, Telezhkin Vsevolod, Wei Wenbin, Meritens Camille Rabesahala de, Cooper-Knock Johnathan, Nakagawa Shinichi, Hirose Tetsuro, Buchman Vladimir L., Shelkownikova Tatyana A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-0854-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yokoi S, Naruse K, Kamei Y, Ansai S, Kinoshita M, Mito M, Iwasaki S, Inoue S, Okuyama T, Nakagawa S, Young LJ, Takeuchi H.	4. 巻 117
2. 論文標題 Sexually dimorphic role of oxytocin in medaka mate choice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 4802-4808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1921446117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Isobe M, Toya H, Mito M, Chiba T, Asahara H, Hirose T, Nakagawa S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Forced isoform switching of Neat1_1 to Neat1_2 leads to the loss of Neat1_1 and the hyperformation of paraspeckles but does not affect the development and growth of mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 251-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.072587.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Adriaens C, Rambow F, Bervoets G, Silla T, Mito M, Chiba T, Asahara H, Hirose T, Nakagawa S, Jensen TH, Marine JC.	4. 巻 25
2. 論文標題 The long noncoding RNA NEAT1_1 is seemingly dispensable for normal tissue homeostasis and cancer cell growth.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1681-1695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.071456.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Komatsu, T., Yokoi, S., Fujii, K., Mito, M., Kimura, Y., Iwasaki, S. & Nakagawa, S.	4. 巻 24
2. 論文標題 UPA-seq: prediction of functional lncRNAs using differential sensitivity to UV crosslinking.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1785-1802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.067611.118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakagawa S, Yamazaki T, Hirose T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular dissection of nuclear paraspeckles: towards understanding the emerging world of the RNP milieu.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Open Biol.	6. 最初と最後の頁 180150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.180150.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Chujo T, Yamazaki T, Kawaguchi T, Kurosaka S, Takumi T, Nakagawa S, Hirose T.	4. 巻 36
2. 論文標題 Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 1447-1462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.201695848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mello SS, Sinow C, Raj N, Mazur PK, Biegging-Rolett K, Broz DK, Imam JFC, Vogel H, Wood LD, Sage J, Hirose T, Nakagawa S, Rinn J, Attardi LD.	4. 巻 31
2. 論文標題 Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 1095-1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.284661.116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fox AH, Nakagawa S, Hirose T, Bond CS.	4. 巻 43
2. 論文標題 Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Trends Biochem Sci	6. 最初と最後の頁 124-135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tibs.2017.12.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mito M, Kadota M, Tanaka K, Furuta Y, Abe K, Iwasaki S, Nakagawa S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell Type-Specific Survey of Epigenetic Modifications by Tandem Chromatin Immunoprecipitation Sequencing.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19494-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gurumurthy Channabasavaiah B., Sato Masahiro, Nakamura Ayaka, Inui Masafumi, Kawano Natsuko, Islam Md Atiqul, Ogiwara Sanae, Takabayashi Shuji, Matsuyama Makoto, Nakagawa Shinichi, Miura Hiromi, Ohtsuka Masato	4. 巻 14
2. 論文標題 Creation of CRISPR-based germline-genome-engineered mice without ex vivo handling of zygotes by i-GONAD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 2452 ~ 2482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-019-0187-x	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Ikuko Yamamoto, Michiko Sugimoto, Kimi Araki, Yu Suzuki, Takehiko Kobayashi, Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Rodent specific 4.5SH RNA is essential for the early development in mouse
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本育子、杉本道彦、荒木喜美、鈴木雄、小林武彦、中川真一
2. 発表標題 Myodontia属特異的4.5SHクラスタはマウスの発生に必須である
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本育子、杉本道彦、荒木喜美、鈴木雄、小林武彦、中川真一
2. 発表標題 小型齧歯類特異的4.5SHクラスタの欠損マウスは胎生致死となる
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川真一、小松太和、水戸麻理、竹本愛菜、藤居光一、岩崎信太郎
2. 発表標題 UPA Seq:UVへの感受性を利用した機能性lncRNAの同定
3. 学会等名 第20回日本RNA学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Towards Identification of Novel Functional Long noncoding RNAs
3. 学会等名 Kumamoto Key Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Identification of novel functional lncRNA candidates using differential sensitivities to UV-irradiation
3. 学会等名 ConBio 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川 真一
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAの個体レベルでの機能解析
3. 学会等名 第6回生命医薬情報学連合大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川 真一
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAにできること
3. 学会等名 千里ライフサイエンスセミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Observation of sub-micron size nuclear bodies using super-resolution microscopy
3. 学会等名 The 43th Naito Conference 「Noncoding RNA: Biology, Chemistry, & Diseases」 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinichi Nakagawa
2. 発表標題 Fine structural analyses of nuclear body paraspeckle using SIM
3. 学会等名 50th JSDB meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RNA Biology Laboratory https://sites.google.com/rnabiol.com/home

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	横井 佐織 (Yokoi Saori) (10772048)	北海道大学・薬学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------