

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06058

研究課題名（和文）新規RNA免疫沈降法（tRIP法）によるRNA-タンパク相互作用解析の新展開

研究課題名（英文）Identification of the role of transcription termination and polyadenylation in ALS using multiple high-throughput sequencing analysis

研究代表者

増田 章男（Masuda, Akio）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10343203

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体におけるRNA結合タンパクの機能同定には、細胞内のいつ、どこで、どの遺伝子RNAの、どの塩基に結合しているか？といった時空間情報の取得が欠かせない。しかし、既存の大規模シーケン解析法は、大量のinput試料と難易度の極めて高い実験技術を必須とし、新たな解析法の開発が求められている。本研究課題では、現在標準的に利用されているCLIP法を大幅に改変し、100倍超の高感度化と実験難易度の簡素化に達成したtRIP法を実現した。tRIP法は、RNA-蛋白結合のみならず、RNA修飾部位の検出にも応用可能で、極めて高い汎用性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来困難であった微量検体からのRNA-蛋白結合やRNA修飾部位の解析手法の開発に成功した。従来法を大幅に上回る感度を有しながらも、手技は簡単になっており、今後、RNA-蛋白結合部位解析の標準手法となることが期待される。本手法を利用すれば、従来、少量しか入手できないために解析困難であった、初代継代培養細胞や患者検体内でのRNA代謝様式を解明できることとなり、RNA代謝の生理的意義解明や病態解明の大幅な進歩につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed the tRIP method (targeted RNA immunoprecipitation), which enables identification of the protein-RNA interaction sites to a similar level of accuracy as CLIP-seq, but requires only thousands of cells. tRIP requires only 2 days to generate a cDNA library with a single RNA purification step. tRIP adopts exonuclease treatment, and abrogates tedious SDS-PAGE and membrane transfer that are essential in CLIP methodology. High sensitivity of tRIP allows us to perform serial immunoprecipitation to identify the protein-protein-RNA interaction sites starting from a subnuclear fraction. tRIP provides new insights into the regulatory mechanism of co-transcriptional RNA processing by RNA processing factors.

研究分野：転写制御

キーワード：RNA結合タンパク RNA修飾 RNA代謝 CLIP tRIP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA - タンパク相互作用は、転写や翻訳をはじめ、スプライシング、RNA 輸送など、生命活動に必須な RNA 代謝現象の制御基盤であり、その相互作用部位を知ることは、RNA - タンパク相互作用の機能解明に必要不可欠である。タンパクの RNA 結合部位解析には、ChIP-seq の RNA 版である CLIP-seq 解析が現在の標準手法であるが、(1) 高度な技術を要するため成功率が低い (2) 多量の検体 (10^7 個以上の細胞) が必要、といった大きな欠点があり、より簡便かつ効率的な新手法の開発が待ち望まれていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、CLIP法で最も非効率かつ煩雑な SDS-PAGE/membrane transfer による RNA - タンパク複合体の精製ステップを単純な酵素処理に置き換えることで、CLIP法と同等の特異度を保持しながら、CLIP法の100倍以上の感度で RNA - タンパク複合体を検出する tRIP法 (targeted RNA ImmunoPrecipitation) の開発中である(図1)。本研究課題では、この飛躍的に効率化した tRIP法を駆使して、今まで解析困難であった、細胞内機能性分画をはじめとする少量検体を用いてグローバル RBP 結合部位検出を行い、その解析法の確立と、RNA-タンパク相互作用の細胞特異性や動態の解明を目的とする。

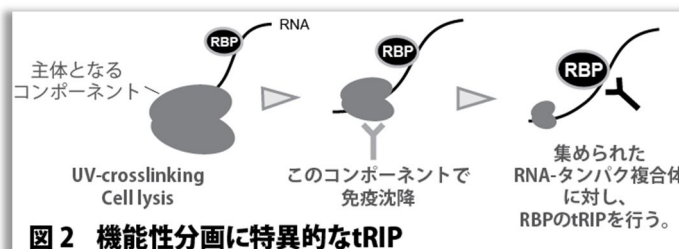
3. 研究の方法

(1) 少量検体からの RNA - タンパク相互作用検出

今まで解析困難であった低発現 RNA 結合タンパク (RNA binding protein, RBP) や少量細胞量の tRIP 解析法の確立を行う。

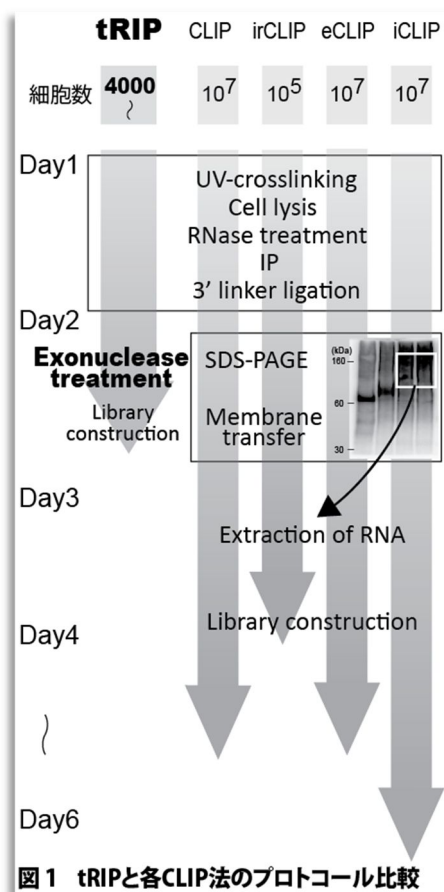
(2) 機能性分画からの RNA - タンパク相互作用検出法の確立

多くの RBP が、複数の機能性複合体中で働いているが、それぞれの複合体特異的な RNA - タンパク相互作用の詳細は、解明されていない。図2に示すように、連続免疫沈降を用いた tRIP 解析により、機能性分画特異的な RBP 標的 RNA 部位の検出法を確立する。



(3) 複数サンプルからの同時 RNA - タンパク相互作用検出、およびその比較解析法の確立

tRIP法の高効率性を利用し、ノックダウン群と control 群など、従来困難であった複数条件細胞の同時比較解析法を確立する。



4. 研究成果

(1) 微量試料を用いた tRIP-seq 解析法の確立。m6A RNA 修飾部位の検出への応用

本研究課題の推進中に、tRIP 法は、UV-crosslink した RNA - タンパク複合体解析に加え、m6A などの RNA 修飾の検出に応用できることを見出した。RNA 修飾特異抗体を用いた RIP-seq にビーズ上でのエクソヌクレアーゼ処理を加えただけの、シンプルなプロトコルで実行可能である。この m6A-tRIP で、どれほどの微量試料からどの程度の解析が行えるのか、検討を行った。80 万個の C2C12 細胞を使用した RIP-seq と tRIP-seq の比較 (図 3a) したところ、グローバルに同様なリード分布が得られることが明らかとなった。1 塩基レベルに拡大して見ていくと (図 3b) tRIP-seq ではリードが m6A モチーフ GCA/GGCA 上に集積するのに対し、RIP-seq では広くなだらかに分布していた。これは、tRIP 法の要である酵素処理の効果であり、大幅なバックグラウンド低減と高解像度化を達成した。

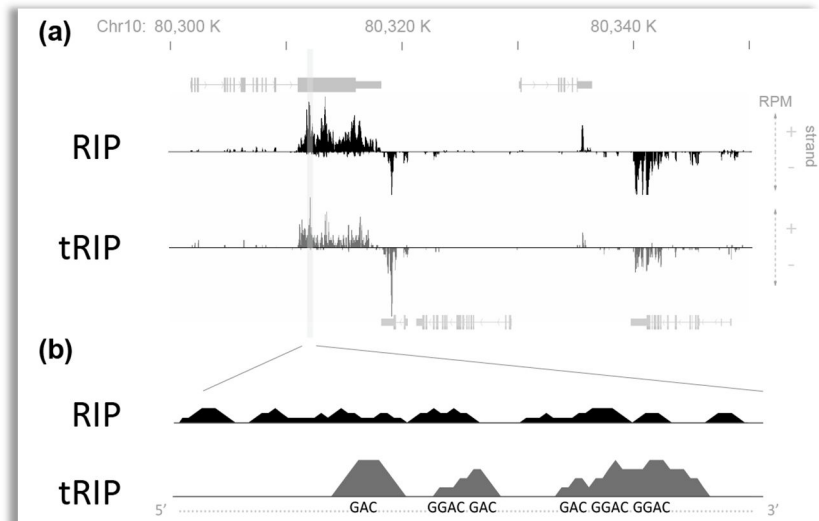


図3 m6A-tRIPとRIPのリード分布比較。(a)遠景、(b)1塩基解像度の近景

次に、細胞数を減らして m6A-tRIP 施行をした。リード数は使用細胞数に応じて減少してしまうが、メタ解析を行うと、4 千細胞でも既報の通り m6A 修飾が転写終結点と転写開始点付近に集積するなど、リード分布パターンが保持されていた (図 4a)。また、m6A モチーフも 4 千細胞から著明に検出され (図 4b)、微量検体から RNA 修飾を実用的に検出できることを確認した。total RNA なら 10 ng の order から解析可能であり、現存手技の中で最高レベルの高感度となる。本成果の詳細を、科学雑誌 "EMBO reports" および "細胞" に発表した。

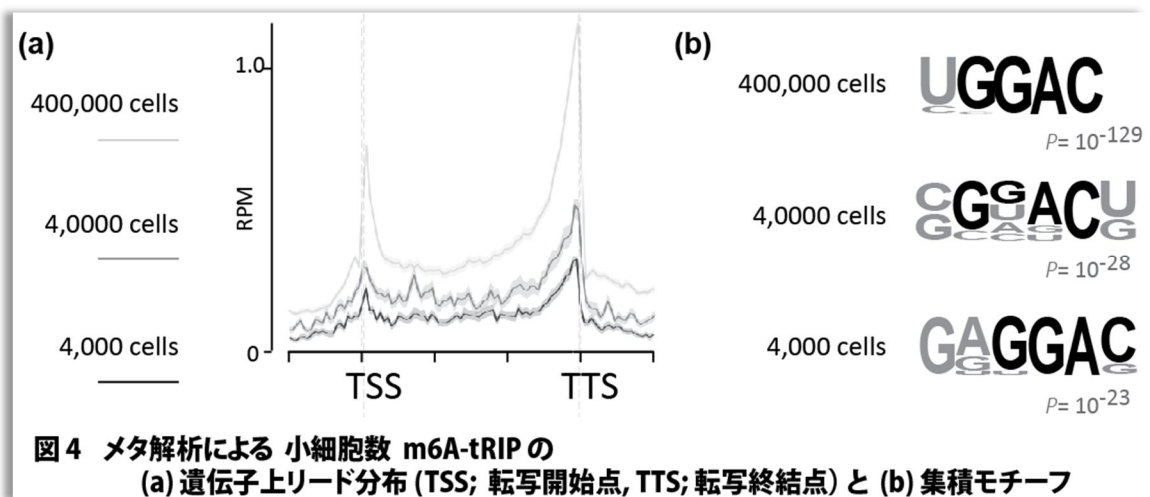
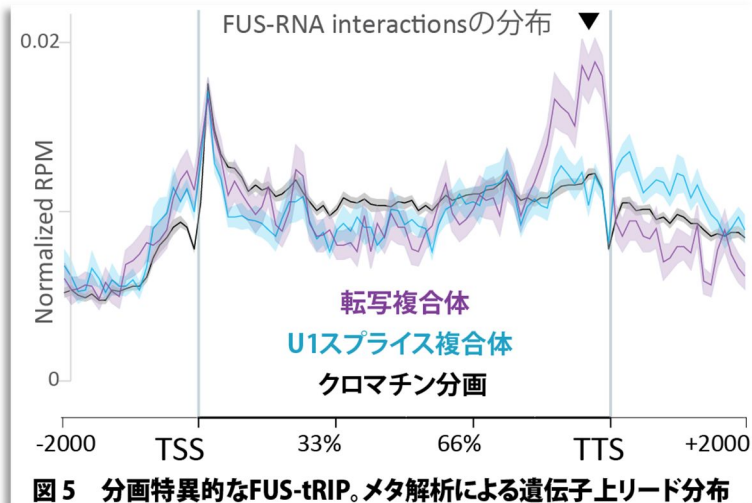


図4 メタ解析による小細胞数 m6A-tRIP の (a) 遺伝子上リード分布 (TSS; 転写開始点, TTS; 転写終結点) と (b) 集積モチーフ

(2) 機能性分画からの RNA - タンパク相互作用検出法の確立

ALS 原因 RBP である FUS は、pol2 転写複合体、スプライソソームなど様々な機能性分画に局在するが、局所での FUS 機能の詳細は不明である。連続免疫沈降を用いた tRIP 法により、その

解明を図った。具体的には、神経芽細胞株 N2A を UV-crosslink 後、まず、各分画の主体となるコンポーネント (RNAP II, U1 snRNP) に対する抗体で免疫沈降を行った。続いて、共沈された RNA-タンパク複合体に対して、さらに抗 FUS 抗体による tRIP 解析を行い、pol2 転写複合体に、U1 スプライス複合



体それぞれに特異的な FUS 標的 RNA 部位の検出を行った。図 5 に示すように、pol2 転写複体内では、FUS が転写終結点周囲に集中結合する (図、黒三角) が、U1 複合体では、この集中が無かった。その詳細を "EMBO reports" 誌 に報告した。

(3) 複数サンプルからの同時 RNA - タンパク相互作用検出法の確立

上述の FUS 機能解析で、FUS ノックダウン細胞やアンチセンスオリゴを使用した U1 depletion 細胞を用いて、tRIP 解析を行った。control 細胞との比較により、FUS-U1 snRNP からなる複合体が、転写終結制御の本体であることを見出し、明らかとなった FUS-U1 による転写制御様式を "EMBO reports" 誌 で発表した。

さらに、tRIP 法の駆使により、従来の CLIP 法では解析困難であった RNA 結合蛋白 SRSF3 の新規機能を発見し、その成果を "EMBO journal" 誌に発表した。SRSF3 のスプライシング標的エクソンは、大半が転写関連遺伝子の構成的エクソンであり (選択的でない)、エクソン長が長く (数百塩基程度、通常 120 塩基)、アミノ酸 P,S に富んだ天然変性領域 (IDR) をコードするという他に類を見ない特徴を持っていた。これらのアミノ酸の偏りは、その塩基配列の偏りにつながり、これらエクソンは C 塩基に富んでいる。SRSF3 は C-rich 配列が標的配列であるため、これらエクソンに強く結合することが出来、その結果、これらエクソンのスプライシングを保証する作用を持つに至った。進化学的解析で、こうした長いエクソン (C 塩基に富み、PS に富んだ IDR をコードする) が、脊椎動物以降に出現し、ヒトでは長いエクソンの大半が、この特徴を持っていることを明らかにした。SRSF3 は、脊椎動物の高度な転写制御機構の獲得源となったゲノム機構の発展に必須の分子と考えられた。

< 引用文献 >

Akio Masuda, Toshihiko Kawachi, et al., tRIP-seq reveals repression of premature polyadenylation by co-transcriptional FUS-U1 snRNP assembly, EMBO Reports, 21, 2020, e49890

増田章男、河地利彦、大野欽司、tRIP-seq 法を用いた微量検体からの RNA 修飾部位検出、細胞、53 巻、2021、50-52

Toshihiko Kawachi, Akio Masuda, et al., Regulated splicing of large exons is linked to phase-separation of vertebrate transcription factors, The EMBO Journal, 40, 2021, e107485

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Kawachi Toshihiko, Masuda Akio, Yamashita Yoshihiro, Takeda Jun ichi, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 40
2. 論文標題 Regulated splicing of large exons is linked to phase separation of vertebrate transcription factors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e107485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020107485	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 Masuda Akio, Kawachi Toshihiko, Ohno Kinji	4. 巻 22
2. 論文標題 Rapidly Growing Protein-Centric Technologies to Extensively Identify Protein?RNA Interactions: Application to the Analysis of Co-Transcriptional RNA Processing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5312 ~ 5312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22105312	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 Kawamura Yusuke, Hida Tetsuro, Ohkawara Bisei, Matsushita Masaki, Kobayashi Takeshi, Ishizuka Shinya, Hiraiwa Hideki, Tanaka Satoshi, Tsushima Mikito, Nakashima Hiroaki, Ito Kenyu, Imagama Shiro, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 592
2. 論文標題 Meclozine ameliorates skeletal muscle pathology and increases muscle forces in mdx mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 87 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.01.003	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 Inoue Taro, Ohkawara Bisei, Bushra Samira, Kanbara Shunsuke, Nakashima Hiroaki, Koshimizu Hiroyuki, Tomita Hiroyuki, Ito Mikako, Masuda Akio, Ishiguro Naoki, Imagama Shiro, Ohno Kinji	4. 巻 195
2. 論文標題 Zonisamide upregulates neuregulin-1 expression and enhances acetylcholine receptor clustering at the in vitro neuromuscular junction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108637 ~ 108637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2021.108637	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 増田章男、河地利彦、大野欽司	4. 巻 53
2. 論文標題 tRIP-seq法を用いた微量検体からのRNA修飾部位検出	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 50-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Masuda Akio, Kawachi Toshihiko, Takeda Jun ichi, Ohkawara Bisei, Ito Mikako, Ohno Kinji	4. 巻 21
2. 論文標題 tRIP seq reveals repression of premature polyadenylation by co transcriptional FUS U1 snRNP assembly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e49890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201949890	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 Huang Kun, Li Jin, Ito Mikako, Takeda Jun-Ichi, Ohkawara Bisei, Ogi Tomoo, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 13
2. 論文標題 Gene Expression Profile at the Motor Endplate of the Neuromuscular Junction of Fast-Twitch Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.00154	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 Ohkawara Bisei, Kobayakawa Akinori, Kanbara Shunsuke, Hattori Takako, Kubota Satoshi, Ito Mikako, Masuda Akio, Takigawa Masaharu, Lyons Karen M, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 21
2. 論文標題 CTGF/CCN2 facilitates LRP4 mediated formation of the embryonic neuromuscular junction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948462	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 Nakazawa Y, Hara Y, Oka Y, Komine O, van den Heuvel D, Guo C, Daigaku Y, Isono M, He Y, Shimada M, Kato K, Jia N, Hashimoto S, Kotani Y, Miyoshi Y, Tanaka M, Sobue A, Mitsutake N, Suganami T, Masuda A, Ohno K, Nakada S, Mashimo T, Yamanaka K, Luijsterburg MS, Ogi T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228-1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.02.010	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 Huang K, Masuda A, Chen G, Bushra S, Kamon M, Araki T, Kinoshita M, Ohkawara B, Ito M, Ohno K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates MeR2 enhancer and promotes Mbn11 transcription in myogenic cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59517-y	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 Li Jin, Ito Mikako, Ohkawara Bisei, Masuda Akio, Ohno Kinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Differential effects of spinal motor neuron-derived and skeletal muscle-derived Rspo2 on acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31949-7	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 Okura Toshiaki, Ohkawara Bisei, Takegami Yasuhiko, Ito Mikako, Masuda Akio, Seki Taisuke, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 9
2. 論文標題 Mianserin suppresses R-spondin 2-induced activation of Wnt/ -catenin signaling in chondrocytes and prevents cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39393-x	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 Ito Kenyu, Ohkawara Bisei, Yagi Hideki, Nakashima Hiroaki, Tsushima Mikito, Ota Kyotaro, Konishi Hiroyuki, Masuda Akio, Imagama Shiro, Kiyama Hiroshi, Ishiguro Naoki, Ohno Kinji	4. 巻 8
2. 論文標題 Lack of Fgf18 causes abnormal clustering of motor nerve terminals at the neuromuscular junction with reduced acetylcholine receptor clusters	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18753-5	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 Kurahashi Hirokazu, Azuma Yoshiteru, Masuda Akio, Okuno Tatsuya, Nakahara Eri, Imamura Takuji, Saitoh Makiko, Mizuguchi Masashi, Shimizu Toshiaki, Ohno Kinji, Okumura Akihisa	4. 巻 83
2. 論文標題 MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25125	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増田章男 河地利彦 大野欽司
2. 発表標題 長いエクソンは天然変性領域をコードしており、SRSF3により安定的にスプライスされる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshihiko Kawachi, Akio Masuda, Jun-ichi Takeda, Mikako Ito, Tomonari Hamaguchi, Kinji Ohno
2. 発表標題 The splicing mechanism that secures large exons encoding intrinsic disordered regions of transcription factors
3. 学会等名 Experimental Biology 2020 Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akio Masuda, Toshihiko Kawachi, Junichi Takeda, Kinji Ohno
2. 発表標題 tRIP法による、RNA polymerase IIによる転写中pre-mRNA上での、RNA-protein相互作用部位の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akio Masuda, Toshihiko Kawachi, Junichi Takeda, Kinji Ohno
2. 発表標題 新規RNA免疫沈降法(tRIP法)による、FUS - U1 snRNP依存性 転写終結制御の解明
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報HP https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/ 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報公式HP https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/neurological-diseases-cancer/dept-neuroscience/neurogenetics/
--

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

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
---------	---------