

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15988

研究課題名(和文)熱ストレス下における非コードRNA, MALAT1の生理的意義と機能ドメインの解明

研究課題名(英文) Identification of functional domain of MALAT1 lncRNA in heat shock response

研究代表者

小野口 玲菜 (Onoguchi, Rena)

東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号：30780697

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)：申請者はこれまでにMALAT1の機能解析を行う過程で通常は核スペckルと呼ばれる核内構造体に局在するMALAT1が、熱ストレスに反応して新規核内構造体(HiNoCo-bodyと命名)を形成することを発見した。しかしながら、MALAT1がどのようにHiNoCo bodyを形成するか、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、熱ストレス条件下のMALAT1の機能ドメインを明らかにすることを目的とした。様々な長さの変異型MALAT1を発現する細胞株を樹立し、熱ストレス時の細胞内局在の観察を行った。これらの実験を通じて、熱ストレス時の局在変化に必要なMALAT1の部分配列を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能ドメインの情報不足している非コードRNAは、タンパク質と異なり一次配列から機能を推定することが困難である。先行研究により、一部の非コードRNAについてはドメイン解析が行われている。MALAT1に関しても核スペckル局在に必要な最小配列は同定されているが、他の領域の機能は不明であった。本研究によって同定された、熱ストレスに反応したMALAT1の局在変化に重要なドメインの情報はこれまでの概念とは異なる非コードRNAによる熱ストレス反応の分子基盤の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：MALAT1, one of the most abundant and highly conserved long noncoding RNAs, is thought to be critical regulator of cancer progression. In our recent study, we found that heat shock stress induced translocation of MALAT1 from nuclear speckle, one of nuclear bodies, to a distinct nuclear body named HiNoCo body. However, specific RNA domains dictating HiNoCo body formation in heat shock response remain unknown. In this study, we established the cell lines which express the several kinds of deletion mutants of MALAT1 and investigated their localization under heat shock condition. We identified the RNA domain of MALAT1 that is required for localization during heat shock stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：長鎖非コードRNA 核内構造体

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析技術の発展により、ヒトゲノムから多種多様の非コード RNA が転写されていることが明らかとなった。非コード RNA とはタンパク質をコードしない機能性 RNA 群の総称である。これまでに一部の非コード RNA が特定の RNA 結合タンパク質と相互作用し、遺伝子発現制御において重要な役割を果たすこと、組織特異的・疾患特異的に発現し重要な機能を担う非コード RNA が多数存在することが示されてきた。さらに高等動物細胞ほど多種類の非コード RNA を発現することから、進化の過程で獲得した複雑な生理機能を理解する上で、非コード RNA の機能解明は必須であると考えられている。一方で、数千を超える非コード RNA の大部分の機能や性質は全く分かっていないのが現状であり、非コード RNA の機能を体系的に理解することが世界的に重要な課題となっている。

疾患と関連する代表的な非コード RNA として MALAT1 が挙げられる。MALAT1 は高転移性の肺がん患者の組織で高発現する非コード RNA として同定され、MALAT1 の高発現とがん患者の予後の悪化に相関が見られることが報告されている。また MALAT1 は核スペckルと呼ばれる核内構造体に安定的に局在すると考えられている。核内構造体とは脂質二重膜を持たない RNA:タンパク質複合体であり、核スペckルには転写因子やスプライシング因子などが集積し、スプライシングや転写制御などを担うと推測されている。実際に MALAT1 が癌の転移を促進する運動性遺伝子群の転写を活性化することが報告されており (Tano K et al FEBS Lett. (2012))、申請者も、MALAT1 が主要ながん抑制遺伝子である p53 遺伝子の転写を抑制することを明らかにしてきた (Tano K. and Onoguchi-Mizutani R. et al, Front. Genet. (2018))。これらの結果は、MALAT1 ががんの悪性化と密接に関係することを示唆しており、がんの進行メカニズムを理解する上でも、MALAT1 の機能解明は重要視されている。MALAT1 の生理機能を解明するために、MALAT1 ノックアウトマウスが作出され解析されている (Nakagawa et al, RNA (2012))。しかし、MALAT1 ノックアウトマウスは通常の飼育条件下では明瞭な表現型を示さず、MALAT1 による遺伝子発現制御機構の全貌や生理的意義については未だ不明な点が多く、学術的な課題となっている。

申請者は MALAT1 ノックアウトマウスが通常の飼育条件下で明瞭な表現型を示さないことから、MALAT1 がストレス条件下で機能を発揮する非コード RNA なのではないかと考え、ストレス条件下での MALAT1 の機能解析を試みた。その過程で「MALAT1 が熱ストレスに应答して核スペckルから離脱し、新規核内構造体 (HiNoCo-body と命名) を形成する」ことを発見した。また、HiNoCo-body の形成は可逆的であり、HiNoCo-body が熱ストレス時の細胞生存に重要であることを明らかにした (Onoguchi-Mizutani R., et al., J Cell Sci., 2021)。これらの実験結果から、熱に应答して MALAT1 が形成する構造体 HiNoCo-body が熱ストレス应答において重要であることが示唆された。しかしながら、MALAT1 のどの配列が遺伝子発現や局在の決定に重要なのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では MALAT1 の機能配列を同定し、熱ストレス条件下の MALAT1 の機能ドメインを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

piggyBac トランスポゼースシステムを用いて、MALAT1 ノックアウト細胞のゲノム DNA に色々な長さの変異型 MALAT1 遺伝子を導入した細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いて、非ストレス条件、熱ストレス条件の変異型 MALAT1 の細胞内局在の観察を行った。

4. 研究成果

まず初めに、MALAT1 がどのように HiNoCo body を形成していくのかを知るために、熱ストレス条件下の各 Time point における MALAT1 の細胞内局在を RNA-FISH (RNA fluorescence in situ hybridization) 法を用いて観察した (図 1)。初めは核スペckルに局在していた MALAT1 が、10 分間の熱ストレスにより核質へと拡散していることを発見した。30 分後には小さな MALAT1 の輝点が観察され、熱ストレス処理 1 時間後には大きな核内顆粒 (=HiNoCo body) を形成することを見出した。これらの結果より、HiNoCo body の形成過程には①核ス

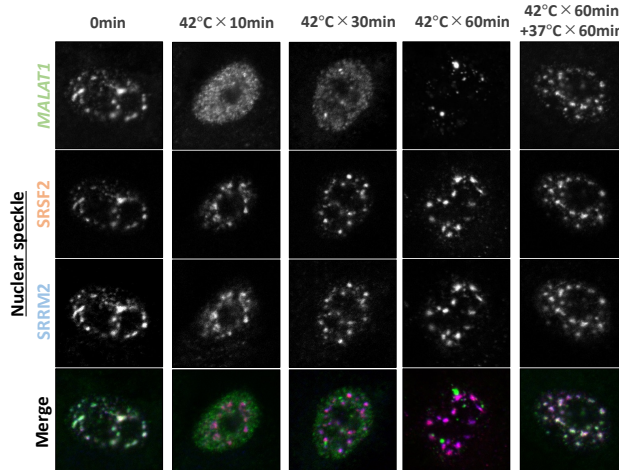


図1. 熱ストレスに应答したHiNoCo bodyの形成過程

ペックルからの MALAT1 の離脱および核内への分散、②MALAT1 の HiNoCo body への集積の 2つのステップから成ることが示唆された。

申請者は上記の①,②のステップに必要な MALAT1 の機能配列を知るために、色々な長さの変異型 MALAT1 を発現する細胞株を樹立し、RNA-FISH 法を用いて、それぞれの変異型 MALAT1 の非ストレス条件、熱ストレス条件における細胞内局在を確認した。

所属研究室の先行研究により、非ストレス条件下において、MALAT1 が核スペックルに局在するのに MALAT1 の 3'側に位置する部分配列(M 領域と命名)が必要であることを報告している (Miyagawa R., et al., RNA, 2012)。MALAT1 の 5'側の配列を欠損した Mutant1,2,3 は核スペックル局在に必要な M 領域を含むため、予想に合致して非ストレス条件ではいずれも核スペックルに局在していた(図 2A)。一方、熱ストレス条件において、Mutant1 は全長 MALAT1 と同様に HiNoCo body の形成が見られたが、Mutant2 に関しては核質に分散していた。Mutant3 は熱ストレス条件下に置いても核スペックルに局在化していた(図 2A)。これらの結果から、MALAT1 の 5'側の領域に核スペックルからの離脱に必要な領域と HiNoCo body への集積に必要な領域が含まれていることを発見した。一方で、MALAT1 の 5'側の部分配列のみを有する

Mutant4 は M 領域を欠損しているため、非ストレス条件下では核スペックルに局在せず、熱ストレス条件下でも核質に分散したままであった(図 2A)。この結果より、3'側の核スペックル局在に必要な配列は HiNoCo body 形成に置いても重要であることが示唆された。

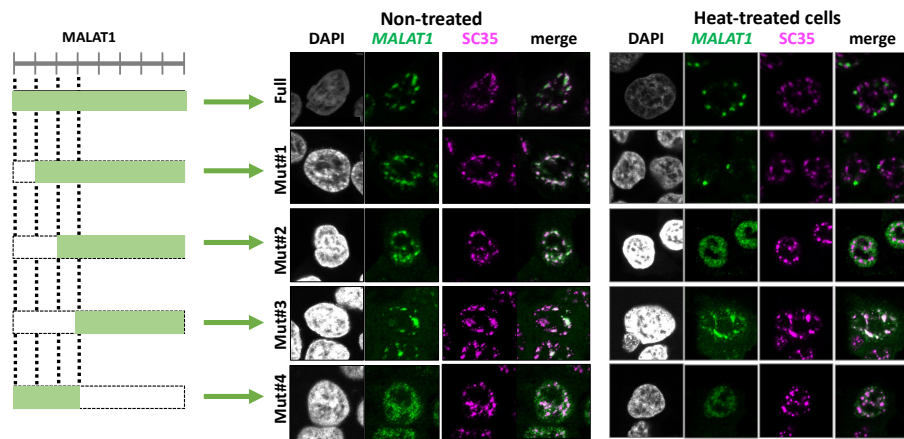


図2. HiNoCo bodyの形成に重要なMALAT1のRNA配列の探索

次に、同定された MALAT1 の部分配列の必要十分性があるかを検証するために、同定された機能配列のみを持つ変異型 MALAT1 (=mini-MALAT1 と命名)を発現する細胞株を樹立し、非ストレス条件(control)および熱ストレス条件での mini-MALAT1 の細胞内局在の観察を行った。樹立した mini-MALAT1 発現細胞株を用いて、細胞内局在を RNA-FISH 法で観察した。野生型 MALAT1 は control で核スペックルタンパク質である SON と共局在していたが、熱ストレス条件では核スペックルとは異なる場所に顆粒状の局在を示した(HiNoCo-body に局在と判断した)。mini-MALAT1 も同様に control で核スペックルに局在しているが、熱ストレス条件では核スペックルタンパク質と共局在せず、核スペックルとは異なる場所に顆粒状の局在を示した(図 3)。

以上の結果から、MALAT1 は同定されたドメインを介して HiNoCo body の形成を行っている

と判断した。本研究によって同定された、熱ストレスに 応答した MALAT1 の局在 変化に重要なドメインの情報はこれまでの概念とは異なる非コード RNA による熱ストレス 応答の分子基盤の解明につながる ことが期待される。

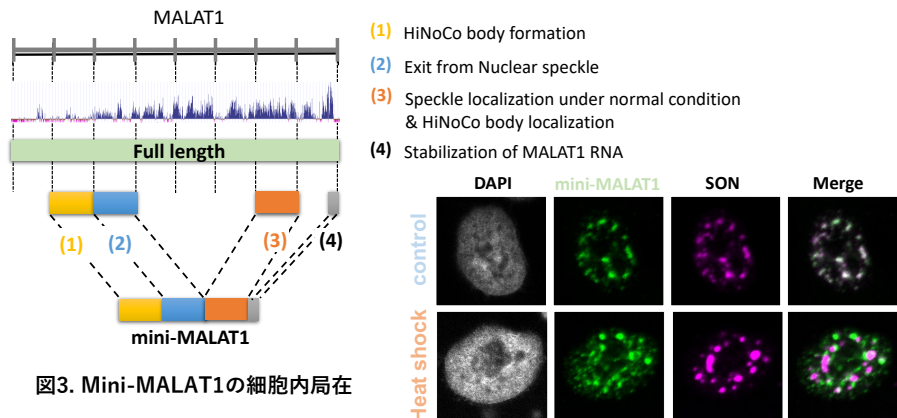


図3. Mini-MALAT1の細胞内局在

- (1) HiNoCo body formation
- (2) Exit from Nuclear speckle
- (3) Speckle localization under normal condition & HiNoCo body localization
- (4) Stabilization of MALAT1 RNA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onoguchi-Mizutani Rena, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 171
2. 論文標題 Long noncoding RNA and phase separation in cellular stress response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 269 ~ 276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab156	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 Tanu Tanzina, Taniue Kenzui, Imamura Katsutoshi, Onoguchi-Mizutani Rena, Han Han, Jensen Torben Heick, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 hnRNP1-MTR4 complex-mediated regulation of <i>NEAT1v2</i> stability is critical for <i>IL8</i> expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 537 ~ 547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2021.1971439	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 Yamamoto Keita, Goyama Susumu, Asada Shuhei, Fujino Takeshi, Yonezawa Taishi, Sato Naru, Takeda Reina, Tsuchiya Akiho, Fukuyama Tomofusa, Tanaka Yosuke, Yokoyama Akihiko, Toya Hikaru, Kon Ayana, Nannya Yasuhito, Onoguchi-Mizutani Rena, Nakagawa Shinichi, Hirose Tetsuro, Ogawa Seishi, Akimitsu Nobuyoshi, Kitamura Toshio	4. 巻 36
2. 論文標題 A histone modifier, ASXL1, interacts with NONO and is involved in paraspeckle formation in hematopoietic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109576 ~ 109576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109576	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 Onoguchi-Mizutani Rena, Kishi Yoshihiro, Ogura Yoko, Nishimura Yuuki, Imamachi Naoto, Suzuki Yutaka, Miyazaki Satoru, Akimitsu Nobuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of novel heat shock-induced long non-coding RNA in human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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） 10.1093/jb/mvaa126	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 Rena Onoguchi-Mizutani , Yoshitaka Kirikae , Yoko Ogura , Tony Gutschner , Sven Diederichs , Nobuyoshi Akimitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of heat-inducible long noncoding RNA MALAT1-containing novel nuclear (HiNoCo) body	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The journal of Cell Science	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) なし	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小野口玲菜、秋光信佳
2. 発表標題 非コードRNAを含有する熱ストレス応答性の新規核内構造体, HiNoCo-bodyの同定
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (広島)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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