

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19356

研究課題名（和文）新規マルチオミクス解析による液滴構成因子の網羅的同定とALS発症機構の解明

研究課題名（英文）Comprehensive identification of liquid droplet constituents and elucidation of ALS onset mechanism by novel multi-omics analysis

研究代表者

高橋 秀尚（TAKAHASHI, Hidehisa）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30423544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：核内には膜構造がないにも関わらず、ユークロマチン、ヘテロクロマチン、核小体、Cajal body、specklesといった領域で核内は区画化されている。最近、これらの非膜構造体が液-液相分離による“液滴”によって形成されることが明らかとなってきた。本研究では、抗体を用いたIn situビオチン化法によるマルチオミクス解析によって、非膜核内構造体の1つCajal bodyの構成因子を網羅的に同定する。そして、Cajal bodyの形成機構とその破綻がAmyotrophic lateral sclerosis (ALS) などを含む神経変性疾患の発症機構にどのように関わるのについて明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってCajal bodyの形成機構とその破綻によるALSなどの神経変性疾患の発症機構との関連が明らかになれば、難治性の神経変性疾患の発症機構の解明に繋がることが期待できる。さらに、Cajal bodyの機能を正常化させることが、神経変性疾患の治療のポイントとなる可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：Despite the absence of membrane structures in the nucleus, the nucleus is compartmentalized into the regions such as euchromatin, heterochromatin, nucleoli, Cajal bodies, and speckles. Recently, it has been clear that these membraneless structures are formed by "liquid droplets" through liquid-liquid phase separation. In this study, we comprehensively identified the components of Cajal bodies by multi-omics analysis using an antibody-based in situ biotinylation method. We attempted to clarify the mechanism of Cajal body formation and how its disruption is involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases including amyotrophic lateral sclerosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内凝集体 液-液相分離 液滴 Cajal body 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内には膜構造がないにも関わらず、ユークロマチン、ヘテロクロマチン、核小体、Cajal body、speckles といった領域で核内は区画化されている。最近、これらの非膜構造体が液-液相分離による“液滴”によって形成されることが明らかとなっている。特に、遺伝子発現制御においては、転写制御因子や non-coding RNA などが遺伝子領域と共に、疎水性相互作用やファン・デル・ワールス相互作用などを介して液滴を形成し、複数の遺伝子発現を統合的に制御することがわかってきた。また、液滴を形成するタンパク質は、天然変性領域 (IDR: Intrinsic Disordered Region) を多く含むことが知られている。

私は、これまでに遺伝子発現やスプライシングで重要な役割を果たす非膜構造体 Cajal body の機能解析を行ってきた。Cajal body においては、転写制御因子の MED26 を含むメディエーター複合体が Little elongation complex (LEC) を遺伝子領域にリクルートし、mRNA にポリ A を含まない遺伝子群 (small nuclear RNA 遺伝子、複製依存性ヒストン遺伝子) の転写開始から伸長、終結まで統合的に制御することを明らかとした【Takahashi H, et al. Cell, 146(1), 92-104, 2011】【Takahashi H, et al. Nat Commun 6, 5941, 2015】【Takahashi H, et al. Nat Commun, 11(1), 1063, 2020】。

2. 研究の目的

非膜核内構造体 Cajal body がどのような因子によって構成されるのかについて、その詳細は明らかとなっていない。そこで、私は Cajal body を構成する全ての因子 (タンパク質、ゲノム DNA、non-coding RNA) を網羅的に同定する手法として、抗体を用いた in situ ビオチン化法によるマルチオミクス解析法を確立した。

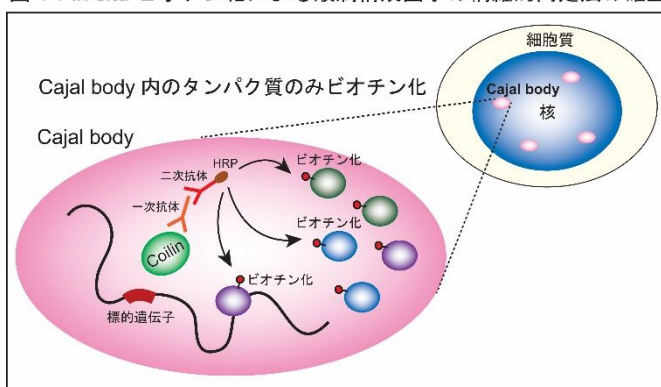
興味深いことに、Cajal body には多くの RNA 結合タンパク質に加えて、TAF15 や TDP-43 などの筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 関連因子が含まれることが明らかとなった。ALS においては、TDP-43 の変異型タンパク質が凝集体 (ストレスボディー) を形成することが神経細胞死を引き起こす要因となる。そこで本研究では、Cajal body 構成因子をさらに網羅的に解明し、ALS 関連因子を含む Cajal body 構成因子の Cajal body の形成や機能における役割を明らかにすることで、ALS 発症メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in situ ビオチン化法によって、Cajal body の全ての構成因子 (タンパク質、ゲノム DNA、non-coding RNA) を網羅的に同定する。

Coilin (Cajal body のマーカー) の抗体を用いて、周辺の (半径 20 nm 以内) タンパク質を in situ でビオチン化する (図 1 参照)。細胞をホルムアルデヒドで固定する。1 次抗体、さらに、それを認識する 2 次抗体 (HRP: Horse Radish Peroxidase 付き) を用いて、細胞の免疫染色を行う。過酸化水素と Biotin-tyramide を添加することによって、2 次抗体存在下に周辺タンパク質をビオチン化する。その後、細胞を溶解し、アビジンビーズを用いてビオチン化タンパク質のみを精製する。質量分析計を用いてビオチン化タンパク質を網羅的に同定する。さらに、ビオチン化タンパク質と共精製される non-coding RNA やゲノム DNA もシーケンス解析によって網羅的に同定する。

図 1: in situ ビオチン化による液滴構成因子の網羅的同定法の確立



さらに、ビオチン化タンパク質と共精製される non-coding RNA やゲノム DNA もシーケンス解析によって網羅的に同定する。

(2) Cajal body 構成因子の Cajal body の形成や機能における役割を解明する。

Cajal body 構成因子として同定された ALS 関連タンパク質やその他の因子、non-coding RNA を神経細胞でノックダウンし、Cajal body 形成への影響、Cajal body で転写制御される遺伝子群の発現への影響、ゲノムワイドなスプライシングへの影響を解明する。

4. 研究成果

本研究によって、Cajal body の構成タンパク質として、多くの RNA 結合タンパク質に加えて、ALS 関連タンパク質も同定された。さらに、Cajal body に含まれるゲノム DNA 領域や non-coding RNA も網羅的に同定され、Cajal body の形成機構の一端が明らかとなってきた。興味深いことに、Cajal body 構成タンパク質として神経変性疾患に関与するタンパク質群が多数同定

された。これらの研究成果に関して、現在、論文投稿中である。今後、Cajal body の機能破綻とその神経変性疾患発症メカニズムとの関連を解明することが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Cheng D, Semmens K, McManus E, Chen Q, Meerzaman D, Wang X, Hafner M, Lewis A.B, Takahashi H, Devaiah N.B, Gekonno A, Singer S.D.	4. 巻 7(50)
2. 論文標題 The nuclear transcription factor, TAF7, is a cytoplasmic regulator of protein synthesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci adv.	6. 最初と最後の頁 eabi5751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abi5751.	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 Sakamoto M, Sasaki K, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Cinleti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N, Matsumoto N.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 De novo ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet	6. 最初と最後の頁 69-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab224.	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 Miyatake S, Kato M, Kumamoto T, Hirose T, Takahashi H, Tanaka F, Ogata K, Ohtaka-Maruyama C, Matsumoto N.	4. 巻 93(6)
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci adv.	6. 最初と最後の頁 810-814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2368.	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 鈴木秀文, 高橋秀尚	4. 巻 93(6)
2. 論文標題 メディエーター複合体のコンポーネントMED26による新たな転写制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seikagaku	6. 最初と最後の頁 810-814
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 Suzuki H, Abe R, Shimada M, Hirose T, Hirose H, Noguchi K, Ike Y, Yasui N, Furugori K, Yamaguchi Y, Toyoda A, Suzuki Y, Yamamoto T, Saitoh N, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C.R, Conaway W.J, Takahashi H	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 The 3' Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30632-w	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 Kitamura K, Suzuki H, Abe R, Inohara H, Kaneda Y, Takahashi H, and Nimura K	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Dual function of SF3B2 on chromatin and RNA to regulate transcription in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biosci	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13578-022-00812-8	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 Hirose T, Sugitani Y, Kurihara H, Kazama H, Kusaka C, Noda T, Takahashi H, and Ohno S	4. 巻 149(21)
2. 論文標題 PAR3 Restricts the Expansion of Neural Precursor Cells by Regulating Hedgehog Signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199931	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 Abe E, Yamashita A, Hirota K, Yamaji T, Azushima K, Urate S, Suzuki T, Tanaka S, Taguchi S, Tsukamoto S, Uehara T, Wakui H, Tamura K, Takahashi H	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22343-5	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 Nakai Y, Miyakawa K, Yamaoka Y, Hatayama Y, Nishi M, Suzuki H, Kimura H, Takahashi H, Kimura Y, Ryo A	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Generation and Utilization of a Monoclonal Antibody against Hepatitis B Virus Core Protein for a Comprehensive Interactome Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10122381	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2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木秀文, 阿部竜太, 嶋田美穂, 廣瀬智威, 廣瀬博子, 野口慶介, 古郡華月, 池 陽子, 安井七海, 山口雄輝, 豊田 敦, 鈴木 穰, 山本達郎, 斉藤典子, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による新規の転写スピード調節機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会, 千葉(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口慶介, 鈴木秀文, 阿部竜太, 堀内恵子, 秋山智彦, 池 陽子, 井野陽子, 木村弥生, 梁 明秀, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 新規のin situピオチン標識法を用いたCajal body構成因子のマルチオミクス解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会, 神奈川(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ https://ycu-molecularbiology.jp/

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			
米国	ストワーズ医学研究所			