

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510247

研究課題名(和文)核内構造体パラスペックル形成の分子機構・核内分布様式と生理機能

研究課題名(英文)Physiological function of paraspeckles: molecular mechanism of assembly and their nuclear distribution

研究代表者

佐々木 保典(Sasaki, Yasunori)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門主任・研究員

研究者番号：30312242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：核内構造体パラスペックル(PS)はRNA-蛋白質複合体であり、その形成・維持には機能性RNA(NEAT1 RNA)が必須である。本研究では、PS特有の形成機構と核内存在様式に焦点をあて、遺伝子発現制御におけるPS機能を解析した。

マウス細胞でヒトNEAT1 RNAを発現すると、内在性マウスPSに加えヒトNEAT1 RNAを核とするPSが独立に形成された。プロテアソーム阻害剤を添加すると、マウスPSとヒトPSは個別に巨大化した。さらに通常核内で離れているマウスNeat1座位とヒトNEAT1座位とが、しばしば近接した。この結果はPSにより遺伝子座位同士が核内で近傍に集積する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Paraspeckle (PS) is a large RNA-protein complex, consists of several ten RNA binding proteins and NEAT1, a noncoding RNA indispensable for the nuclear body assembly. The current study focuses on the molecular mechanism and nuclear distribution of PS to elucidate paraspeckles' physiological function.

We established a mouse cell constitutively expressing human NEAT1 RNA so that exogenous 'human PS' can be formed in addition to endogenous 'mouse PS'. In this heterologous system, 'human PS', a chimeric structure of human RNA and mouse proteins was assembled independent of 'mouse PS'. Upon administration of a proteasome inhibitor, both humanPS and mouse PS enlarged independently. Furthermore, we observed that Neat1 loci (endogenous) and NEAT1 loci (exogenous), encoded separate chromosomes relocated vicinity, suggesting PS could be a driving force to recruit attached loci to close proximity.

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：システムゲノム科学

キーワード：核内構造体 パラスペックル ノンコーディングRNA ゲノム

1. 研究開始当初の背景

パラスペックル(PS)はヒトやマウス細胞に普遍的に存在する核内構造体である。PSは膜を持たない直径0.5µmほどの顆粒で、構成成分の自己集合により形成されることが考えられている。PSの構成成分として、NONO、SFPQ、PSPC1などのRNA結合蛋白質があり、これらは相互作用することが知られている。他方、PSはRNase A感受性であるため、構造の形成・維持にRNAが関与することが示唆されていた。

我々は核内構造体と同時に精製されるノンコーディングRNAの同定を行い、PSと共存する機能未知のノンコーディングRNA NEAT1を得た。次に、機能解析用に開発した「任意の核内RNAを選択的かつ高効率で破壊する方法」を用いてNEAT1のみを破壊すると、PS構造だけが崩壊した。さらに、NEAT1がPS蛋白質と特異的に結合し、RNA-蛋白質相互作用を担うことを明らかにした。

この、「ノンコーディングRNAが核内構造構築のコアになる」という知見は、我々を含む3グループ(Hirose, Spector, Lawrence)によりほぼ同時に発表され、PS機能解明の競争は一段と激化している。PS機能としては、CTN等のmRNAを核内に一時的に繫留する「場」を提供し、転写後制御に関与するという報告がある。

果たして構造体としてのPS機能はそれだけだろうか。我々は、34個の新規PS蛋白質を同定・解析中である。これらの多くはRNA代謝の重要な制御因子であり、癌や神経変性症など様々な疾患の原因蛋白質である。このことから、我々は、NEAT1がこれらの核内制御蛋白質を束ねて、蛋白質の核内分布と局所濃度を制御する「元締め」としてPSの形成を行い、PS制御蛋白質の標的RNA群の包括的制御ネットワークが機能する可能性を考えている。

2. 研究の目的

(1)近年、多様な機能を持つ長鎖ノンコーディングRNAの発見と機能解析が相次いでいる。その中でもNEAT1は、「核内構造体パラスペックル(PS)の形成・維持に必須であるarchitectural RNA」という明確な機能を有する極めてユニークな存在である。PSがノンコーディングRNAを内包することの生物学的意義を知ることは、基礎・応用の両面においてノンコーディングRNA研究に資することが多い。なぜなら、PS機能解析から得られる知見は、核内構造体機能と核内プロセスの全体像解明に役立つだけでなく、RNA-蛋白質機能複合体形成の基盤原理構築とRNA二次構造予測法の精度向上に貢献し、人工的な機能複合体設計を可能とするからである。

(2)核一個あたりのPSの数が少数であることを勘案すると、核内におけるPSの相対的位置に高い再現性がある場合、相互作用する遺伝子座位の良いランドマークとなることが考えられる。つまり、PSの位置情報は細胞活動に依存した遺伝子座位の核内座標を決定する上で有用な基準として活用できるのではないだろうか。新規PS蛋白質の多くが疾患関連遺伝子産物であることから、PSの生理機能解明はそれら疾患の病態理解と治療とに向けて大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1)転写と共役したPS形成機構におけるRNAの生理的意義

予備実験では、Amasa社のnucleofectorを用いたエレクトロポレーションにより、マウスNIH3T3細胞にヒトNEAT1遺伝子座位全長を含むBAC(226kb)導入を試み、外来NEAT1RNAの発現とPS様構造体形成に成功した。海外の研究者の報告も加味し、NEAT1RNAだけでPS形成に十分であると考え、外来性RNAが内在性RNAとは別

個に PS を形成できるかに焦点を当てて形成機構を解析した。

PS 形成の確認は、RNA-FISH 法と蛍光抗体染色法とを組み合わせ(以下 FISH-IF 実験という)、NEAT1 RNA と PS 蛋白質の共局在をみた。

同調培養した HeLa 細胞、NIH3T3 細胞等に対しパルスチェイス実験を行った。Early G1 期の細胞を用い、RNA pol I 阻害下で、pol II 転写物のみをフロオロウリジン (FU) で標識し、抗 FU 抗体で標識 NEAT1 RNA が NEAT1 座位近傍の PS と共局在することを確認した後、経時変化を追った。

さらに、FU とエチニルウリジン (EU) との二重標識により、RNA 転写の時期を区別できるパルスチェイス実験を行い、PS 間における NEAT1 RNA の移動について検討した。

(2) PS の核内分布様式と標的の同定

PS が核内でどのような構造(体)と近接しているかという位置情報を取得する。

NEAT1 座位といくつかの候補クローンについて、PS がそれらのクロンの遺伝子座位近傍に位置するかを、当該クローンをプローブとした DNA-FISH で共局在を確認した。上記の方法で PS と遺伝子座位の共局在が低頻度であったので、PS が特定の遺伝子座位に占位しても一過性か、不特定の遺伝子座位と接触・離脱を繰り返している可能性が考える。そこで、細胞に飢餓ストレスなど NEAT1 RNA 量の変動する刺激を与え PS 形成を促進し、特殊な生理条件下で特異的な PS 核内分布様式を示すかどうかを調べた。

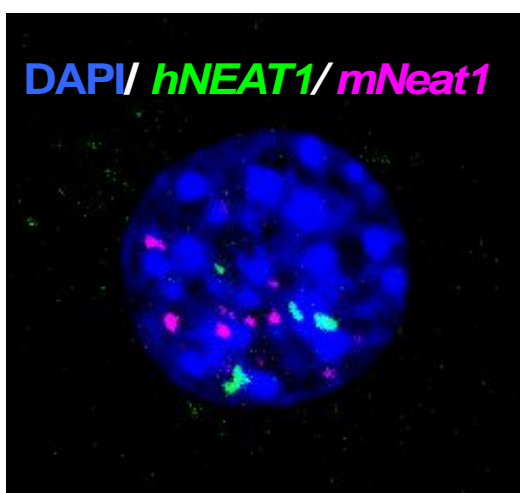
4. 研究成果

(1) 転写と共役した PS 形成機構における RNA の生理的意義

マウス NIH3T3 細胞にヒト NEAT1 遺伝子座位全長を含む BAC 導入することにより、マ

ウス細胞中でヒト NEAT1 RNA を異所発現し、内在性マウス PS に加えて、外来性 PS を形成するヘテロな系を構築した。この外来性 PS はヒト NEAT1 RNA を核として、マウス PS 蛋白質が集合したキメラ PS である。

外来性ヒト PS も内在性マウス PS 同様に転写阻害剤を添加すると消失した。阻害剤を除くと、外来性ヒト PS は内在性マウス PS より若干早く回復して PS 形成を開始した。



興味深いことに、内在性マウス PS と外来性ヒト PS は常に独立して存在し、マウス RNA とヒト RNA とは、PS 間でシャトルしないことが明らかになった。そこで、この細胞を FU と EU とで二重標識する新しい RNA パルスラベル法を開発して、PS 間の RNA の移動を観察したところ、内在性マウス PS 同士においてさえ RNA のやり取りがみられず、単一のパラスペククル顆粒内が FU ラベルされた区画と EU ラベルされた区画に分かれていた。一方、FU と EU 同時ラベルの場合を除き、二重標識された PS は観察されなかった。このことは転写と共役した PS 形成モデルを強く支持すると共に、新たに転写された RNA が既存の PS に供給されないこと意味する。よって、この核内構造体の寿命が NEAT1 RNA で規定されているといえる。

(2) PSの核内分布様式と標的の同定
HeLa細胞やLNCap細胞を用い、PS蛋白質遺伝子座位(NONO、SFPQ、PSPC1等)のDNA-FISHとPS蛋白質の同時染色を行い、一定の頻度でPS蛋白質遺伝子座位がPSと共局在することを見出した。また、男性ホルモン依存的に誘導されるTMPRSS2遺伝子座位は、LNCap細胞において高頻度でPSと共局在するが、HeLa細胞では極めて低頻度であった。さらに-actinやGAPDHのようなハウスキーピング遺伝子もPSと共局在することから、発現が活性化された遺伝子座位がPSに集約するか、そのような転写活性部位にPSが移動する可能性が浮上してきた。現在これらの点についてさらに検証中である。

マウスPSがNEAT1座位上で形成されることを踏まえ、PSと相互作用する遺伝子座位の核内分布様式を検討した。マウスNIH3T3細胞内でヒトBAC由来PSを形成するヘテロな系では、マウスNeat1座位は19番染色体上にあり、ヒトNEAT1は非19番染色体上にある。プロテアソーム阻害剤MG132添加によりPSを巨大化した際の、PS形成および核内分布様式を調べると、マウスPSとヒトPSが独自に巨大化していた。さらに、添加前には核内で離れていたマウスNeat1座位とヒトNEAT1座位とが、しばしば近接した。この現象はPS巨大化を介したものと考えられる。現在、PSに近接する他の遺伝子座位同士がPSの仲立ちにより核内で近傍に集積する可能性を検証中である。

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 1 件)
Naganuma T, Nakagawa S, Tanigawa A, Sasaki YF, Goshima N, Hirose T. , Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of

nuclear paraspeckles. EMBO J., 査読有、31巻、2012、4020-4034

〔学会発表〕(計 2 件)
佐々木保典、小川朝子、谷川明恵、小沼泰子、伊藤弓弦、廣瀬哲郎、ノンコーディングRNA NEAT1のXenopusオーソログ、日本RNA学会、2012年7月、仙台

佐々木保典、他9名、ノンコーディングRNA NEAT1のXenopusオーソログ、XCIJ首都圏支部会、2014年3月、横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
佐々木 保典 (SASAKI, Yasunori)

研究者番号：30312242

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：