

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291001

研究課題名(和文)非コードRNAによる細胞内構造構築機序の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of lncRNA-mediated architecture of subnuclear structures

研究代表者

廣瀬 哲郎(Hirose, Tetsuro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30273220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：非コードRNAを骨格にして形成される核内構造体の構成タンパク質の役割を多面的に研究した。まず新たにSWI/SNF複合体が構造体形成に必須なこと、その際に既知のクロマチン再構築活性とは異なる新規複合体集合機能を果たしていることを見出した。次に構造体形成に必要なRNA結合タンパク質のプリオン様ドメイン(PLD)が、構造体会合に必要であることを見出した。このPLDは試験管内でヒドロゲル構造を形成する性質を持つことから、この性質が構造体構築を司る機構であることが示唆された。またPLDタンパク質との相互作用によって構造体骨格の非コードRNAが、難抽出性を示すことが明らかになり、その抽出法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The roles of the protein factors that compose lncRNA-dependent nuclear bodies were intensively and pleiotropically studied. First, the SWI/SNF complexes were identified as novel essential factors for nuclear body formation with their novel assembly activity distinct from the characterized chromatin remodeling activity. Second, the prion-like domain (PLD) of RNA binding proteins that are essential for nuclear body formation was shown to be required for nuclear body formation. It was also detected that the PLD can form the hydrogel structure in vitro, suggesting this feature to form hydrogel underlies the mechanism of the structural roles of these proteins in nuclear body assembly. Finally, we discovered unusual semi-extractable feature of the nuclear body forming lncRNAs. It was shown that the PLD of RNA-binding proteins are responsible for the semi-extractable feature of this class of lncRNAs. We also developed the new method to efficiently extract these RNAs from the cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA RNA結合タンパク質 核内構造体

1. 研究開始当初の背景

21世紀に入り、哺乳類ゲノムから多数の機能未知の lncRNA が産生されていることが明らかにされた。実施者は、核内構造体のパラスペックルに特異的に局在する NEAT1 lncRNA が、パラスペックル構造構築に直接関わる「アーキテクチャル RNA」として機能することを明らかにした。続いて実施者は、40種類ものパラスペックル構成蛋白質を同定し、網羅的な機能阻害実験によって、NEAT1\_2 lncRNA と7種類のパラスペックル蛋白質が、パラスペックル構造形成に必須なことを明らかにした。これらの必須因子の役割を詳しく調べると、NEAT1\_2 lncRNA をサブ RNP 複合体として安定に蓄積されるプロセスと、蓄積後に巨大パラスペックル構造を組み立てるプロセスが、独立に必要なことが明らかになった。一方で実施者は、パラスペックルの分子機能として、NEAT1 が蛋白質をパラスペックル内に係留することによって、その蛋白質の転写制御機能を不活性化させることを明らかにした。

2. 研究の目的

核内構造体パラスペックルは、長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)の NEAT1 を骨格として、40種類以上のタンパク質と共に構築される巨大ナリボ核タンパク質 (RNP) 複合体である。本申請では、リボソームの 1500 倍もの体積をもち、lncRNA を骨格としたユニークな構造体であるパラスペックル構造において、種々のタンパク質因子がどのような役割を果たしているかを中心に解析を行う。そのためにパラスペックルの形成過程におけるキーとなるパラスペックル構成因子の分子間相互作用を解析し、どのような機序で構造構築が進行していくのかを解明する。さらに、構築されたパラスペックルは、「分子スポンジ」として構成タンパク質の構造体内への係留を介して遺伝子発現を制御しているので、パラスペックルの構成因子の脱着機構も併せて解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞

パラスペックルとその構成因子に関する研究は、基本的に HeLa 細胞を用いた。一方 CRISPR-Cas9 による遺伝子改変実験には、ヒトハプロイド培養細胞の HAP1 を用いた。SWI/SNF 複合体の解析には、この複合体の発現が著しく低下している SW13 細胞株を用いた。

(2) 遺伝子機能の阻害実験

標的遺伝子の機能阻害には、siRNA による RNAi 法、アンチセンス核酸の核内導入による方法、さらには CRISPR-Cas9 によるゲノム編集法により行った。

(3) 分子間相互作用実験

タンパク質間相互作用は、特異的抗体を用いた免疫共沈降により複合体を回収し、ウェス

タンブロッティングによって、共沈降タンパク質を検出した。一方、RNA-タンパク質相互作用の検出は、UV 架橋後の免疫沈降によって RNA-タンパク質複合体を回収し、qRT-PCR によって共沈降 RNA を検出した。

(4) 核内構造体の観察

パラスペックルをはじめとした核内構造体は、その構成因子の RNA-FISH や免疫染色によって検出することによって観察した。通常観察は、共焦点レーザー顕微鏡によって行なったが、微細構造の解析は、フランス CNRS の Pierron 博士との共同研究による電子顕微鏡観察、理研・中川博士との共同研究による超解像顕微鏡による観察を行なった。

(5) その他の基本的な分子生物学、生化学的手法は、一般的な手法を用いて行なった。

4. 研究成果

(1) パラスペックル構造体の形成に必須なタンパク質因子の中で、NEAT1 サブ RNP 複合体同士を複数集約してパラスペックルの巨大構造形成に導くアセンブリーステップに働くタンパク質 (カテゴリー1B タンパク質) について、それまでに同定していた RNA 結合タンパク質とは全く異なる因子として、SWI/SNF クロマチン再構築複合体がカテゴリー1B 機能を有することを明らかにした。SWI/SNF 複合体が含む2種類の活性サブユニット (BRG1 と BRM) は、機能的にリダグダグダントであるにも関わらず、この因子の ATPase 活性中心への変異導入実験によって、よく知られている ATP 依存的なクロマチンリモデリング活性は、パラスペックル形成には必須ではないことが明らかになった。そして SWI/SNF 複合体と既知のパラスペックル構成因子との分子間相互作用実験から、SWI/SNF 複合体は、むしろ NEAT1 サブ RNP 内の構成因子同士の相互作用を促進し、パラスペックル構造体を組み立てるハブとしての役割があることが示唆された。また興味深いことに、SWI/SNF 複合体は、パラスペックルと同様に lncRNA を骨格として形成される核内ストレス体の会合にも同様な機能を介して関与していることが明らかになった。この成果は、PNAS 誌の論文の一部として発表した。

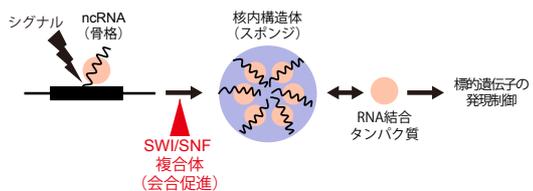


図1. SWI/SNF 複合体による lncRNA 依存的核内構造体会合機能

(2) パラスペックルを構成しているタンパク質のほとんどは、RNA 結合ドメインを有して

いるが、この他にアミノ酸組成が著しく偏った特徴的なドメイン (low complexity domain, またプリオン様ドメイン, PLD) を有しており、近年この PLD がタンパク質の水溶液中の相転移を誘発することが報告され、注目を集めている。パラスペックル形成に必須な7種類のタンパク質の中の6種類は、PLDを有するRNA結合タンパク質であった。そこでこれらのPLDがパラスペックル構造形成に必要であるかどうかを、ノックダウン細胞へのPLD欠失変異体へのレスキュー実験によって調べてみると、PLDを欠いた二つの必須パラスペックルタンパク質 (FUS、RBM14) は、パラスペックル形成活性を持たないことが明らかになった。これによって、PLDがパラスペックル形成に必須なタンパク質ドメインであることが明らかになった。これらのPLDドメインは、試験管内でのヒドロゲルを形成し、この過程は上述の液体相転移と関連があることが示されている。そこで西オーストラリア大との国際共同研究によって、FUS、

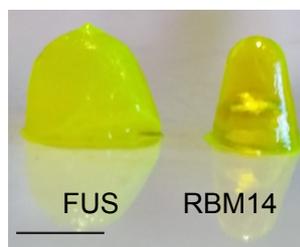


図 2. パラスペックルタンパク質のプリオン様ドメインによるヒドロゲル形成

RBM14 が試験管内でヒドロゲル状構造を形成することが明らかになった (図 2)。この成果は、J Cell Biol 誌の論文の一部として発表した。

(3) パラスペックルの構造骨格として機能する NEAT1 lncRNA が、通常の RNA 抽出操作に対して著しい難抽出性を示すことを明らかにし、この性質は注射針に抽出液を通すなどのシェアリング力を加えることによって抽出できることを発見した。さらに、この難抽出性を司る原因が、上記 PLD タンパク質と NEAT1 との複雑な相互作用ネットワークによることを明らかにするために、パラスペックルを構成する複数の PLD タンパク質の KO 細胞株を作製し、その中から FUS という RNA 結合性 PLD タンパク質が、NEAT1 の難溶性に関わることを見出した。さらに FUS KO 細胞へのレスキュー実験によって、PLD を欠いた FUS ではレスキューができないことが明らかになり、FUS の PLD が難溶性を決定することが明らかになった。さらに FUS の結合領域である NEAT1 領域を欠失させた変異 NEAT1 は難溶性が著しく弱まること明らかになった。これによって、FUS と NEAT1 の RNA-タンパク質相互作用の重要性が示された。また、この難溶性は、パラスペックル構造体の構造構築を支える性質であること

も明らかになった。次に、NEAT1 の難溶性を考慮して、パラスペックル構成因子の定量解析を実施し、1つのパラスペックルには約 50 分子の NEAT1 が含まれることが明らかになった。また 1 分子の NEAT1 に結合する各プリオン様タンパク質の定量解析を行うための CLIP-se データを収集した。また共同研究によって電子顕微鏡と超解像顕微鏡を用いて、各構成因子のパラスペックル内のおおまかな存在領域を明らかにした。この成果は、EMBO Journal 誌、J Cell Biol 誌の一部として発表した。

arcRNA-PLDタンパク質の相互作用

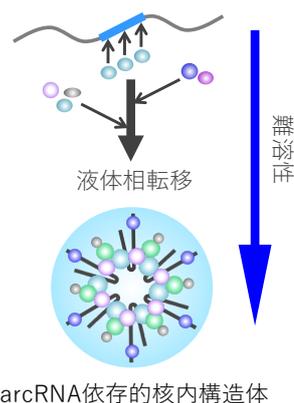


図 3. NEAT1 arcRNA の難溶性の発見

(4) 転写阻害剤 DRB を添加した際に、パラスペックルタンパク質が速やかにパラスペックルから解離する過程を詳細なタイムコースをとって追跡した。また CLIP 解析によって、実際に NEAT1 lncRNA-タンパク質相互作用が薬剤添加後速やかに解消されていることを確認した。また上記薬剤を培地中から除くと、NEAT1 の転写の再開に伴って、パラスペックル構造が再構築される過程をタイムコースによって追跡した。さらに NEAT1 からのタンパク質の着脱が、NEAT1 の難溶性と強く相関していることが明らかになった。この成果は、EMBO Journal 誌の一部として発表した。

#### 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 16 件)

1. Anantharaman A, Jadhavi M, Tripathi V, Nakagawa S, Hirose T, Jantsch MF, Prasanth SG, Prasanth KV. Paraspeckles modulate the intranuclear distribution of paraspeckle-associated Ctn RNA. Sci Rep. 2016 Sep 26; 6:34043. 査読有り DOI:10.1038/srep34043.
2. West JA, Mito M, Kurosaka S, Takumi T, Tanegashima C, Chujo T, Yanaka K, Kingston RE, Hirose T, Bond C, Fox A, Nakagawa S. Structural, super-resolution microscopy anal

- ysis of paraspeckle nuclear body organization. *J Cell Biol.* 2016 Sep 26; 214(7):817-30. 査読有り DOI: 10.1083/jcb.201601071.
3. Mannen T, Yamashita S, Tomita K, Goshima N, Hirose T. The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL. *J Cell Biol.* 2016 Jul 4;214(1):45-59. 査読有り DOI: 10.1083/jcb.201601024.
4. Adriaens C, Standaert L, Barra J, Latil M, Verfaillie A, Kalev P, Boeckx B, Wijnhoven PWG, Radaelli E, Vermi W, Leucci E, Lapouge G, Beck B, van den Oord J, Nakagawa S, Hirose T, Sablina AA, Lambrechts D, Aerts S, Blanpain C, Marine JC. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat. Med.* 2016 Jul 4. 22(8):861-8 査読有り DOI: 10.1038/nm.4135.
5. Mito M, Kawaguchi T, Hirose T, Nakagawa S. Simultaneous multicolor detection of RNA and proteins using super-resolution microscopy. *Methods.* 2016 Apr 1; 98:158-65. 査読有り DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.11.007.
6. Chujo T, Yamazaki T, Hirose T. Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jan; 1859(1): 139-46. 査読有り DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.05.007.
7. Kawaguchi T, Hirose T. Chromatin remodeling complexes in the assembly of long noncoding RNA-dependent nuclear bodies. *Nucleus.* 2015 Nov 2; 6(6):462-7. 査読有り DOI: 10.1080/19491034.2015.1119353.
8. Hennig S, Kong G, Mannen T, Sadowska A, Kobelke S, Blythe A, Knott GJ, Iyer KS, Ho D, Newcombe EA, Hosoki K, Goshima N, Kawaguchi T, Hatters D, Trinkle-Mulcahy L, Hirose T\*, Bond CS\*, Fox AH\*. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J Cell Biol.* 2015 Aug 17; 210(4):529-39. 査読有り DOI: 10.1083/jcb.201504117. (\* equally contributed)
9. Kawaguchi T, Tanigawa A, Naganuma T, Ohkawa Y, Souquere S, Pierron G, Hirose T. SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015 Apr 7; 112(14):4304-9. 査読有り DOI: 10.1073/pnas.1423819112.
10. Yamazaki T, Hirose T. The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs. *Front Biosci (Elite Ed).* 2015 Jan 1; 7:1-41. 査読有り PMID: 25553361
11. Hirose T, Goshima N. Genome-wide co-localization screening of nuclear body components using a fluorescently tagged FLJ cDNA clone library. *Methods Mol Biol.* 2015; 1262: 155-63. 査読有り DOI: 10.1007/978-1-4939-2253-6\_9.
12. Hirose T, Mannen T. Rapid and efficient elimination of specific nuclear noncoding RNAs in mammalian cells with antisense oligonucleotides. *Methods Mol Biol.* 2015; 1206:149-56. 査読有り DOI: 10.1007/978-1-4939-1369-5\_13.
13. Nakagawa S, Shimada M, Yanaka K, Mito M, Arai T, Takahashi E, Fujita Y, Fujimori T, Standaert L, Marine JC, Hirose T. The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development.* 2014 Dec; 141(23):4618-27. 査読有り DOI: 10.1242/dev.110544.
14. Standaert L, Adriaens C, Radaelli E, Van Keymeulen A, Blanpain C, Hirose T, Nakagawa S, Marine JC. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. *RNA.* 2014 Dec; 20(12):1844-9. 査読有り DOI: 10.1261/rna.047332.114.
15. Chakravarty D, Sboner A, Nair SS, Gianpoulou E, Li R, Hennig S, Mosquera JM, Pauwels J, Park K, Kossai M, MacDonald T Y, Fontugne J, Erho N, Vergara IA, Ghadessi M, Davicioni E, Jenkins RB, Palanisamy N, Chen Z, Nakagawa S, Hirose T, Bander NH, Beltran H, Fox AH, Elemento O, Rubin MA. The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat. Commun.* 2014 Nov 21; 5:5383. 査読有り DOI: 10.1038/ncomms6383.
16. Hirose T, Mishima Y, Tomari Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep.* 2014 May; 15(5):489-507. 査読有り DOI: 10.1002/embr.201338390.

[学会発表] (計 23 件)

1. 廣瀬哲郎、Architectural lncRNA の機能解明、第三回バイオシグナル研究会、2017.3.8. 神戸大学 (兵庫県神戸市)

2. Hirose T, Dissection of architectural noncoding RNA elements and machinery, Simon Fraser Univ MBB seminar, 2017.2.10.(Vancouver, Canada)
3. Hirose T, Liquid-liquid phase separation and paraspeckle formation induced by the specific region of NEAT1 lncRNA, Keystone Symposium, 2017.2.7. (Banff, Canada)
4. Hirose T, Characterization of architectural lncRNA elements using genome-editing technology, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.12.1 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
5. Hirose T, Dissection of architectural noncoding RNA elements and machinery. Cold Spring Harbor Asia meeting 2016.11.17. World Hotel Grand Dushulake Suzhou (中国 蘇州)
6. Hirose T, Elements and machinery of architectural long noncoding RNAs. Shanghai Institutes for Biological Sciences Seminar series 2016.11.14. Shanghai Institute for Biological Science (中国 上海)
7. Hirose T, Architectural noncoding RNAs controlling subnuclear organization and gene expression. Mini-symposium on ncRNA, 2016.9.29 Academia Sinica (台湾台北市)
8. Hirose T, Functional characterization of architectural RNA species toward noncoding RNA taxonomy. RNA2016 Symposium 2016.9.27 国立成功大学 (台湾台南市)
9. 廣瀬哲郎, 核内構造体の機能構築に必要な lncRNA 機能ドメインの解析 第 89 回日本生化学会大会シンポジウム 2016.9.25 東北大学 (宮城県仙台市)
10. 廣瀬哲郎, 非コード RNA の配列と機能の関連 日本進化学会第 18 回大会 2016.8.25 東京工業大学 (東京都目黒区)
11. Hirose T, Semi-extractable feature as the hallmark of nuclear body-associated architectural long ncRNAs. 国際シンポジウム「Clues to Non-coding RNA Taxonomy」2016.6.27 東京大学 (東京都文京区)
12. 廣瀬哲郎, Long noncoding RNA による核内構造の動態制御 第 10 回臨床ストレス応答学会大会 2015.11.7 東京農工大学 (東京都小金井市)
13. Hirose T, Exploration of the functional code for architectural noncoding RNAs 東北大学シンポジウム「RNA regulation and Neuroscience」 2015.10.29 東北大学 (宮城県仙台市)
14. 廣瀬哲郎, ノンコーディング RNA による核内アーキテクチャ Aging, Bone and Cancer Frontline Forum 2015.5.25. 庭のホテル (東京都千代田区)
15. 廣瀬哲郎, RNA 機能と神経変性 日本神経学会北海道地区生涯教育講演会 2015.3.8 北海道大学 (北海道札幌市)
16. Hirose T, Search for RNA-dependent subnuclear structures in mammalian cells. Tokyo RNA Club 2014.11.28 東京大学 (東京都文京区)
17. Hirose T, The possible common mechanism underlying assembly of the nuclear bodies on architectural long noncoding RNAs Joint Australia and Japan RNA meeting 2014 2014.11.3-5 University of Technology (Sydney, Australia)
18. 廣瀬哲郎, Architectural noncoding RNA による細胞内構造構築 北大生化学特別講義シンポジウム 2014.10.21-22 北海道大学 (北海道札幌市)
19. Hirose T, The common mechanism underlying assembly of the nuclear granules on the architectural noncoding RNAs ESF/EMBO Conference 2014.9.13-18 (Polonia Castl, Poland)
20. 廣瀬哲郎, 細胞内構造構築を担う lncRNA の作用機序と関連疾患 第 157 回日本獣医学学会学術集会 (シンポジウム) 2014.9.9-12 北海道大学 (北海道札幌市)
21. 廣瀬哲郎, Architectural noncoding RNA による細胞内構造構築の分子機構とその意義 第 51 回日本生化学会北海道支部例会 2014.7.18 北大百年記念会館 (北海道札幌市)
22. Hirose T, Architectural noncoding RNAs controlling subnuclear organization and gene expression 第 9 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 2014.6.20 大阪大学 (大阪府吹田市)
23. 廣瀬哲郎, ノンコーディング RNA による核内構造体形成機構 第 66 回日本細胞生物学会 (シンポジウム) 2014.6.11-13 奈良公会堂 (奈良県奈良市)
- [図書] (計 7 件)
1. 中條岳志, 廣瀬哲郎 核内ボディの骨格として働く構造構築 RNA(arcRNA) ノンコーディング RNA~RNA 分子の全体像を俯瞰する~ 廣瀬哲郎・泊幸秀編 化学同人 259-270,

2016

2. \*Mannen T, \*Chujo T, Hirose T. Longnon coding RNAs as structural and functional components of nuclear bodies. Long Noncoding RNAs: Structures and Functions. ed. Kurokawa. R. Springer.111-132, 2015. (\* equally contributed)

3. 二宮賢介、廣瀬哲郎 ヒートショック誘導性 lncRNA と核内構造体、実験医学 33: 3290-3291, 2015

4. 山崎智弘、廣瀬哲郎 パラスペックル-NEAT1 lncRNA をコアとする核内構造体、実験医学 33: 3292-3293, 2015

5. 川口哲哉、廣瀬哲郎、中川真一 簡単 RNA 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション実験、実験医学 33: 2283-2288, 2015

6. 廣瀬哲郎 長鎖ノンコーディング RNA と疾患、北海道医学誌 89: 163-164, 2014

7. 廣瀬哲郎、谷川明恵 NEAT1 長鎖ノンコーディング RNA は、タンパク質の核内構造体への係留を介して転写を制御する、実験医学 32: 1249-1252, 2014

[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

[http://www.hokudai.ac.jp/news/170413\\_pr.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/170413_pr.pdf)

[http://www.hokudai.ac.jp/news/160705\\_igm\\_pr.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/160705_igm_pr.pdf)

<http://www.hokudai.ac.jp/news/2015/03/rna-pdf-1.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

廣瀬 哲郎 (HIROSE Tetsuro)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号：30273220

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし