

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650001

研究課題名(和文) ノンコーディングRNA機能による種特異性獲得の分子基盤解明

研究課題名(英文) Molecular basis of the noncoding RNA function that underlies species specificity

## 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト特異的NBPF ncRNAは核内構造体に局在し、ヒト特異的リピートクラスターのイントロン領域に由来する。まずスプライシング阻害剤を用いて、NBPF ncRNAが前駆体RNAからスプライシングで切り出されたイントロンに由来することが明らかにした。次にNBPF ncRNAを核内RNAノックダウン法で機能阻害し、次世代シーケンサーのRNA-seq解析を実施したところ、近傍のNOTCH2NLの発現を活性化していることが明らかになった。またNBPF ncRNAがRNA抽出過程で、著しい難溶性を示すことを発見し、それが核内構造体RNAであるNEAT1と共通の性質であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The human-specific NBPF ncRNA, which is localized in nuclear bodies, is derived from the intronic regions of the human specific NBPF repeat cluster. By the experiment using a splicing inhibitor, we showed that NBPF ncRNAs are the excised introns which were created upon splicing of the precursor transcripts. Next generation RNA sequencing of the RNAs prepared from the cells in which NBPF ncRNA was specifically knocked down revealed that the expression of NOTCH2NL gene which is located adjacent to the NBPF cluster is activated by NBPF ncRNA. We also discovered that NBPF ncRNA exhibits semi-extractable feature in the process of the standard RNA preparation method, which is common to that of NEAT1 ncRNA localized in another nuclear body.

研究分野：分子生物学

キーワード：核酸 細胞・組織 発現制御 遺伝子 蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 21世紀に入って、その存在が明らかにされた新しい制御因子である長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) は、近縁種間でさえ、しばしば保存されていないことから、種特異的な形質発現を司る可能性がある。特にゲノム上のシンテニー領域に対応する転写物が存在していないこともしばしばである。こうした種特異的な lncRNA が、クロマチン上での遺伝子発現に影響を与え、その結果遺伝子発現ネットワークの種間の差異を作り出す原動力になっている可能性がある。

(2) 哺乳類細胞の核内には、さまざまな顆粒状の核内構造体が存在し、様々なクロマチン座位と相互作用することによって、特異的な遺伝子群の発現制御の足場として機能していることが示されている。近年実施者らのグループによって、核内構造体には lncRNA が骨格となって形成されるものがあることが明らかになった。lncRNA が骨格になってどのように巨大な構造体が形成されるのかについては、限られた lncRNA の研究に留まっており、複数の lncRNA に適用できる一般則の確立が望まれていた。そのために類似機能を有する新しい lncRNA の探索が必要となっていた。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、遺伝子発現制御のハブとして機能する核内構造体を構成する霊長類特異的 lncRNA の機能を解明することによって、「lncRNA による種特異的な形質獲得」という仮説を支持する発現制御機構を分子レベルで検証する。そのために、脳サイズと関連することが報告されている霊長類特異的ゲノム増幅領域由来の NBPF lncRNA によるエピジェネティックな遺伝子発現の活性化機構を解明し、そこから導かれる種特異的な形質獲得モデルを構築する。

(2) NBPF lncRNA のような種特異的な核内構造体は、特異的なクロマチン制御、RNA プロセッシング制御に関わると考えられ、その標的となる遺伝子こそが種特異性を規定する要因となっていることが予想される。核内構造体を形成することの指標として、lncRNA が通常の方法では細胞から抽出されにくい性質（難溶性）を示すことが明らかになったので、その性質を指標に類似機能をもつ lncRNA を探索できるかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) lncRNA による種特異的な形質発現を規定する分子機構を、NBPF lncRNA を例に解明する。第一に、NBPF lncRNA の生合成機構を明らかにするために、ノーザンプロット解析によって転写物全長を検出し、オーバーラップするタンパク質遺伝子の発現を阻害剤で処理した際の影響を解析する。また近傍のエクソンとイントロンのプローブと NBPF lncRNA のプローブを用いて RNA-FISH を実施し、シグ

ナルの重なり具合を検出した。

(2) パブリックに公開されているエンコードプロジェクトのエピゲノム関連情報によると、NBPF 遺伝子座位は、高度にリピートした領域で、各リピート領域にヒストン H3K4 モノメチル化修飾のピークが検出されている。こうしたことから、NBPF 領域によって形成される核内構造体は、エンハンサーとして標的遺伝子の活性化に寄与していることが考えられる。そこで NBPF lncRNA の機能阻害によって、エンハンサー機能が失われるかどうかを解析するために、NBPF lncRNA を実施者らが以前開発した化学修飾アンチセンス核酸による核内 RNA ノックダウン法で、特異的に分解できる条件を確定する。

(3) NBPF lncRNA によるエンハンサー機能が、どのように標的遺伝子の発現を活性化しているのかについてを明らかにするために、NBPF ノックダウン細胞とコントロール細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーの RNA sequencing (RNA-seq) 解析によって、NBPF のノックダウンによって発現変動する遺伝子を明らかにする。

(4) NBPF lncRNA の細胞からの抽出過程で、通常の RNA 抽出法では半分程度しか抽出されていないことが明らかになり、物理的な処理を加える新しい抽出法によってほぼ 100% 抽出できることが明らかになった。この新しい抽出法を至適化し、他の難溶性 RNA を同定するために、通常な RNA 抽出法と難溶性 RNA 抽出のための改良法の 2 種類の RNA 抽出法によって、HeLa 細胞から RNA サンプルを調整する。

### 4. 研究成果

(1) NBPF lncRNA の生合成経路の解析  
ゲノム上にマップされる NBPF lncRNA は、2つのエクソンとその間のイントロンの繰返し構造の中のイントロンに相当する領域に存在している。そこで、NBPF lncRNA が

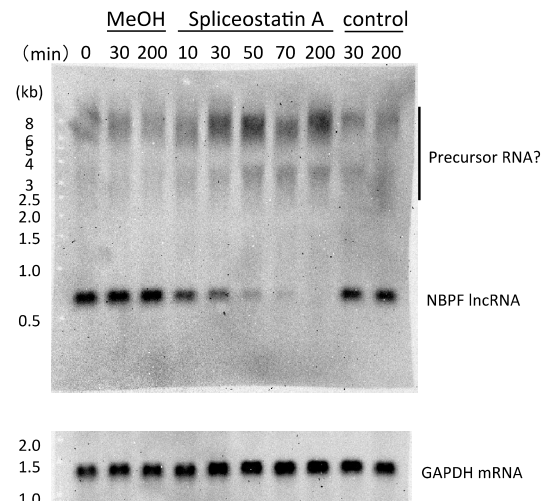


図1. NBPF lncRNA はスプライシングによって切り出されたイントロンである。

自に転写され、周囲の遺伝子発現とは独立に合成されるのか、あるいは周囲の遺伝子前駆体 RNA の一部として転写され、スプライシングによって切り出されるのか、について検証した。そのためにスプライシング反応の阻害剤である Spliceostatin A を細胞に投与した。その結果投与後 50 分後には NBPF lncRNA はほぼ消失することが明らかになった (図 1)。ノーザンブロット解析で検出された NBPF lncRNA のサイズは約 700 nt であり、また RACE 解析などにより、NBPF lncRNA の末端はイントロンの両末端に一致することが示された。これによって、NBPF lncRNA は、前駆体 RNA のスプライシングによって切り出されたイントロンに相当し、それが核内構造体を形成していることが示された。つぎに NBPF lncRNA の局在を調べた結果、この lncRNA は隣接するエクソンとイントロンのプローブで検出される核内シグナルとオーバーラップした核内ドットシグナルが検出された。このことは、NBPF lncRNA が自身のゲノム座位に留まって存在していることが示唆された。

### (2) NBPF lncRNA の機能阻害条件の検討

上記(1)において NBPF lncRNA が、切り出されたイントロンにもかかわらず分解されずに自身のクロマチン座位近傍に蓄積していることが示された。この NBPF 遺伝子のイントロン領域は、ヒストン H3 K4 モノメチル化修飾のピークが見られるために、このイントロン領域がエンハンサーの役割を果たしている可能性が考えられた。そこで NBPF lncRNA の機能阻害を行い、その効果を解析することにした。RNA 産物の一時的な機能阻害には通常 RNAi が使われるが、NBPF lncRNA は核内に存在しているため、細胞質 mRNA を標的とした RNAi では分解しづらいことが推測された。そこで実施者が以前開発した化学修飾によって安定化させたアンチセンス核酸を細胞核内に導入することによって、内在性の RNase H によって標的 RNA を特異的に分解する系 (Ideue *et al.*, RNA 2009) を利用した。様々な条件を試行後、NBPF lncRNA を効率よくかつ特異的にノックダウンできる 2 種類のアンチセンス核酸を選別することに成功した。

### (3) 次世代シーケンス解析による NBPF lncRNA の標的遺伝子の解析

上記(2)において選別したアンチセンス核酸を用いて K562 細胞においてノックダウンを実施し、2 種類のアンチセンス核酸それぞれによるノックダウン細胞、GFP アンチセンス核酸によるネガティブコントロールサンプル、効果が確認されている NEAT1 lncRNA のアンチセンス核酸によるノックダウンサンプルの 4 つの RNA サンプルを調整した。そしてこれらを用いて、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq、東京大学先端研の油谷教授

との共同研究) によって、RNA sequencing 解析を実施した。次いでデータ解析において、1. コントロールと NBPF ノックダウンの間で FPKM 値が 1.62 倍以上または 0.62 倍以下 ( $\log_2(\text{fold change})$  が 0.6 以上または -0.6 以下) に変化したもの、2. コントロールまたは NBPF ノックダウンの FPKM 値が 1 以上であるものを選別した。その結果、28 種類の変動遺伝子を抽出することができた。それらの発現変動を qRT-PCR で検証したところ、NBPF 遺伝子クラスター近傍の NOTCH2NL 遺伝子の発現が著しく低下することが明らかになった。よって NBPF lncRNA は近傍の NOTCH2NL 遺伝子の活性化に寄与していることが示された (図 2)。NOTCH2NL は興味深いことに霊長類で特異的に認められる遺伝子である。NOTCH2NL は、NBPF 座位の近傍にあるため、そこからのリードスルー転写物がアンチセンス核酸によって分解されている可能性があった。しかし他の近傍の遺伝子は全く影響を受けずに NOTCH2NL のみの発現が減少することから、この効果は NBPF lncRNA を介した効果であると考えられる。ノックダウンの一方で、当初期待されたようなグローバルな遺伝子発現プロファイルの著しい変化は認められなかった。よって少なくとも K562 細胞において、NBPF lncRNA が自身のクロマチン座位と核内構造体を介して多

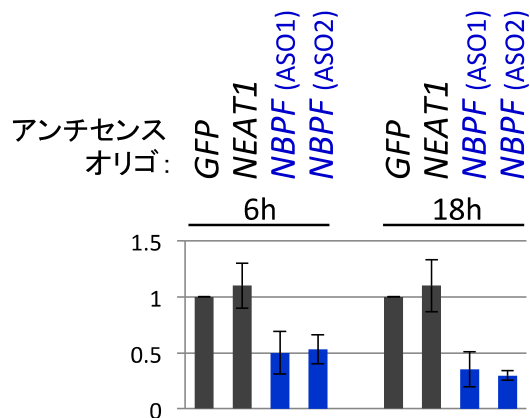


図 2. NBPF lncRNA は、NOTCH2NL 遺伝子の発現活性化を担っている。qRT-PCR によって NOTCH2NL mRNA 量を測定。

数の遺伝子の活性化を担っている直接的な機能をもつ訳ではないことが明らかになった。

### (4) 難溶性を指標とした核内構造体 lncRNA の探索法の検討

NBPF lncRNA は、通常の Trizol 液を用いた RNA 抽出法では半分程度しか抽出できないことが明らかになった。そこで Trizol 液に懸濁した細胞溶解液に物理刺激を加えると 100% 抽出できることが明らかになった。この「難溶性」という性質は、NBPF lncRNA が核内構造体の骨格になっていることに起因す

ると考えられる。そこで別の核内構造体であるパラスペックルの骨格 NEAT1 lncRNA と NBPF lncRNA の共通性を調べたところ、いずれの lncRNA も通常の RNA 抽出試薬では著しい難溶性を示した。この難溶性は、これらの lncRNA が核内でタンパク質と共に不溶性の凝集体を形成していることに起因する可能性がある。実際に、核内構造体形成に関わる FUS という RNA 結合タンパク質が難溶性の獲得に必要であり、FUS はプリオン様ドメインを介してヒドロゲル様の凝集体を形成し、このドメインが構造体形成に必須なことを西オーストラリア大との共同研究で明らかにした (Hennig *et al.*, *J Cell Biol* 2015)。こうした難溶性は、核内で構造体を形成している lncRNA の共通した特徴である可能性があり、今後新しい構造構築 lncRNA の探索のために有効な特徴である可能性が浮上した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hennig S, Kong G, Mannen T, Sadowska A, Kobelke S, Blythe A, Knott G, Iyer S, Ho D, Newcombe EA, Hosoki K, Goshima N, Hatters D, Trinkle-Mulcahy L, Hirose T\*, Bond CS\*, Fox AH\* (\* equally contributed)  
Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J. Cell Biol.* 210: 529-539 (2015). 査読有り  
DOI: 10.1083/jcb.201504117.

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.* 1859:139-146 (2016) 査読有り  
DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.05.007.

Hirose T, Nakagawa S. Clues to long noncoding RNA taxonomy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859: 1-2 (2016). 査読有り  
DOI: 10.1016/j.bbagr.2015.11.011.

Hirose T, Mannen T. Rapid and Efficient Elimination of Specific Nuclear Noncoding RNAs in Mammalian Cells with Antisense Oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.* 1206, 149-156 (2015). 査読有り  
DOI: 10.1007/978-1-4939-1369-5\_13.

Hirose T, Mishima Y, Tomari Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep.* 15, 489-507 (2014). 査読有り  
DOI: 10.1002/embr.201338390.

〔学会発表〕(計 6 件)

Chujo T, Yamazaki T, Nakagawa S, Kawaguchi T, Fujikawa C, Kubota A, Takumi T,

Hirose T, Re-quantification of paraspeckle architectural components and an exploratory search for novel nuclear RNA bodies by using an improved RNA extraction method. *Keystone symposia, Santa Fe, USA, 2016.* 2. 21-24

中條 岳志、中川 真一、川口哲哉、内匠 透、廣瀬 哲郎、NEAT1 lncRNA の難溶性を考慮したパラスペックル構造因子の再定量と構造構築原理の探究、日本分子生物学会、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)、2015. 12.1-4

廣瀬 哲郎、ノンコーディング RNA による核内アーキテクチュア、Aging, Bone and Cancer Frontline Forum、庭のホテル(東京都・千代田区)、2015.5.25

廣瀬 哲郎、RNA 機能と神経変性、日本神経学会北海道支部会、北海道大学 (北海道・札幌市) 2015.3.8

廣瀬 哲郎、Subnuclear architecture by long noncoding RNAs, 理研セミナー、理化学研究所横浜キャンパス (神奈川県・横浜市)、2014.12.8

中條 岳志、廣瀬 哲郎、難溶性 RNA の解析: NEAT1 ncRNA の細胞内再定量と新しい RNA 群の探索、日本 RNA 学会年会、ウインクあいち (愛知県・名古屋市) 2014.7.23-25

〔図書〕(計 1 件)

\*Mannen, T. \*Chujo, T, Hirose, T. Springer. Long noncoding RNAs: Structures and Functions, 2015,111-132 (\* equally contributed)

## 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: 3 0 2 7 3 2 2 0

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

中條 岳志 (CHUJO Takeshi)