

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26113005

研究課題名(和文)ネオタクソノミに応じたncRNAの生理機能の解明

研究課題名(英文)Functional analyses of physiological function of ncRNA according to the neo-taxonomy

研究代表者

中川 真一(Nakagawa, Shinichi)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：50324679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 109,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムからはタンパク質をコードしないノンコーディングRNAが数多く転写されている。ncRNAは大別すると、RNAサイレンシングに関わる「小さなRNA」と、長さが200塩基以上の「長鎖ノンコーディングRNA(IncRNA)」に分けられるが、2万種類を越すIncRNAのうちどれぐらいが実際の生理機能を持っているのかは不明である。そこで、既知の機能性IncRNAがマイルドなUV照射によって高効率でタンパク質に架橋される性質を利用し、新規機能性IncRNA候補遺伝子を同定する手法を開発した。また、IncRNAが形成する微細構造を超解像顕微鏡を用いて解析する手法も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IncRNAのうち機能解析が行われたものは全体の1%にも満たず、転写のノイズに過ぎないと考えられているものも多い。また、転写されたRNAではなくその領域をRNAポリメラーゼが通過することに生理的意義があるIncRNAも報告されており、実際にRNA分子が生理機能を持つIncRNAを効率よく同定する方法が求められていた。我々が開発した手法は極めて簡便に機能性IncRNAの候補を同定することが可能であり、今後の効率的な個別の遺伝子の機能解析への道筋をつけることができた。また、IncRNAが形成するサブミクロンオーダーの構造体の内部構造の解析が可能となり、構造に基づいた分子作動機構予測が可能となった。

研究成果の概要(英文)：A number of noncoding RNAs that do not encode proteins are transcribed from the genome. The ncRNAs can be divided into two large groups: "small RNA", which are involved in RNA silencing, and "Long noncoding RNA (IncRNA)", which are more than 200 bases long. It is not clear how many of the IncRNAs actually have physiological functions. We have developed a method to identify novel functional IncRNA candidate genes using the property that known functional IncRNAs are highly efficiently cross-linked to proteins by mild UV irradiation. We also established a technique to analyze the fine structure formed by IncRNA using a super-resolution microscope.

研究分野：分子生物学

キーワード：IncRNA 長鎖ノンコーディングRNA Neat1 パラスペックル RNAseq

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

高等真核生物のゲノムからは、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA(ncRNA)が大量に転写されている。過去5年ほどの間にこれらの分子群を対象とした機能解析が精力的に行われ、その中でも大半を占める長鎖ノンコーディング RNA(lncRNA)（便宜上200塩基以上の長さを持つものがこれに分類される）の多くがクロマチン修飾因子と複合体を形成してエピジェネティックな遺伝子発現を制御しているのではないかという考え方が提唱されている。しかしながらこれまで機能が明らかにされたのは2万とも3万ともいわれる lncRNA のうちのごく一部であり、その他大多数のものについては機能解析が手つかずのまま残されていた。また、個体レベルでの生理機能が明らかとなっている lncRNA についても、具体的にどのような複合体を形成し、どのような分子動作機構でその機能を発揮しているかという点に関しては未解明のものが多かった。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、長鎖 ncRNA の中でも核内構造体を形成する lncRNA タクソンに注目し、分子-細胞-個体レベルでの解析を展開することで、lncRNA が生理機能を発揮する際の作用機序を明らかにすることを目的としている。特に、核内構造体パラスペックルの骨格となる Neat1 に注目し、Neat1 がどのようにしてその生理機能を発揮するのか、細胞構造学的な基盤を明らかにすることを目指した。また、解析がほとんど手をつけられていない大部分の lncRNA について、機能性に応じて分類する方法を開発することを試みた。

## 3. 研究の方法

Neat1 が骨格となる核内構造体パラスペックルは直径約 300 nm の構造体であり、理論上の空間分解能が 200 nm しかない通常の光学顕微鏡ではその内部構造を明らかにすることはできない。そこで通常の光学顕微鏡の回折限界を超えた観察を可能にする超解像顕微鏡を用い、Neat1 の RNA の各領域、並びにパラスペックルに濃縮することが知られている各種 RNA 結合タンパク質のパラスペックル内部での局在を観察した。また、既知の機能性 ncRNA はタンパク質と強固な巨大複合体を形成していることに注目し、タンパク質と相互作用している RNA を特異的に同定する手法を開発することを試みた。

## 4. 研究成果

### Neat1 が骨格となるパラスペックルの形成機構の解明

まず初めに RNA とタンパク質を同時に検出して超解像顕微鏡を用いて観察する手法を最適化し、パラスペックルの観察を行った。その結果、パラスペックルは特徴的な core-shell 構造を有しており、Neat1 の 5' と 3' が shell 部分に、中心領域が core 領域に分布していることが明らかとなった。また、パラスペックルの構造形成に必要な各種 RNA 結合タンパク質の局在を調べたところ、Sfpq、Nono、Fus、は core 領域に、Tardbp は shell 領域に、Rbm14、Brg1 は core、shell の両領域にパッチ状に存在していることが明らかとなった。また、Fus を欠損する細胞におけるパラスペックル様の構造体を観察したところ、Neat1 が Sfpq や Nono と複合体を形成しているものの、特徴的な core-shell 構造を作ることができずランダムな集合塊を形成していることも明らかとなった。これらの観察から、Neat1 は Sfpq や Nono と初期複合体を形成し、それらが Fus によって放射状に並ぶことでパラスペックルへと成長するというモデルを提唱した。

### 機能性長鎖 ncRNA を予測できる UPA-Seq 法の開発

既知の機能性 lncRNA はタンパク質と強固な複合体を形成しているため、マイルドな UV 照射条件下でもタンパク質に効率的にクロスリンクされ、フェノールクロロホルム処理を行うと中間層へと分離され、水層からの回収率が大幅に低下する。この性質を利用し、UV 照射後にフェノールクロロホルム処理を行い、水層から得られた RNA を RNA-Sequencing によって解析した (UPA-Seq: UV-phenol aqueous phase RNA-sequencing)。その結果、UPA-Seq においては、既知の機能性 lncRNA にマップされるリードのカウント数が大幅に低下すること、タンパク質をコードする mRNA でも P-body や神経細胞の RNA 顆粒に局在するものにマップされるリードのカウント数が減少すること、カウント数の低下を指標として同定した新規機能性 lncRNA の候補遺伝子の転写産物の多くは転写サイトにおいて輝点として観察されるものが多いことなどが明らかとなった。

### その他

Neat1 のノックアウトマウスの表現型解析を行い、乳腺の発生や黄体の形成に異常が見られることを明らかにしたほか、Gomafu のノックアウトマウスが基礎活動量の増加を示し、覚醒剤の連続投与への応答が顕著に亢進することを見出した。また、国際共同研究を通して、ガン細胞のタイプによって Neat1 がガン細胞の増殖を抑制、あるいは促進すること、Malat1 が従来考えられていたようにガン細胞の転移の促進をするのではなく、むしろ転移を抑制する例があること、Neat1 が循環器系において免疫応答を制御していること、Neat1 を欠損したグリア細胞において統合失調症と相関がある遺伝子発現変化が見られる

ことなどを明らかにした。また、lncRNA の生理機能に関する総説を執筆し、当該研究分野の確立と宣伝に努めた。

## 5. 主な発表論文等

全て論文発表、査読あり。

1. Katsel, P., Roussos, P., Fam, P., Khan, S., Tan, W., Hirose, T., Nakagawa, S., Pletnikov, M.V. & Haroutunian, V. The expression of long noncoding RNA NEAT1 is reduced in schizophrenia and modulates oligodendrocytes transcription. *NPJ Schizophr* **5**, 3 (2019). 10.1038/s41537-019-0071-2
2. Gast, M., Rauch, B., Haghikia, A., Nakagawa, S., Haas, J., Stroux, A., Schmidt, D., Schumann, P., Weiss, S., Jensen, L., Kratzer, A., Kraenkel, N., Muller, C., Bornigen, D., Hirose, T., Blankenberg, S., Escher, F., Kuhl, A., Kuss, A., Meder, B., Landmesser, U., Zeller, T. & Poller, W. Long noncoding RNA NEAT1 modulates immune cell functions and is suppressed in early onset myocardial infarction patients. *Cardiovasc Res* [Epub ahead of print] (2019). 10.1093/cvr/cvz085
3. Poller, W., Dimmeler, S., Heymans, S., Zeller, T., Haas, J., Karakas, M., Leistner, D.M., Jakob, P., Nakagawa, S., Blankenberg, S., Engelhardt, S., Thum, T., Weber, C., Meder, B., Hajjar, R. & Landmesser, U. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* **39**, 2704-2716 (2018). 10.1093/eurheartj/ehx165
4. Nakagawa, S., Yamazaki, T. & Hirose, T. Molecular dissection of nuclear paraspeckles: towards understanding the emerging world of the RNP milieu. *Open Biol* **8**(2018). 10.1098/rsob.180150
5. Mito, M., Kadota, M., Tanaka, K., Furuta, Y., Abe, K., Iwasaki, S. & Nakagawa, S. Cell Type-Specific Survey of Epigenetic Modifications by Tandem Chromatin Immunoprecipitation Sequencing. *Sci Rep* **8**, 1143 (2018). 10.1038/s41598-018-19494-9
6. Komatsu, T., Yokoi, S., Fujii, K., Mito, M., Kimura, Y., Iwasaki, S. & Nakagawa, S. UPA-seq: prediction of functional lncRNAs using differential sensitivity to UV crosslinking. *RNA* **24**, 1785-1802 (2018). 10.1261/rna.067611.118
7. Mello, S.S., Sinow, C., Raj, N., Mazur, P.K., Biegging-Rolett, K., Broz, D.K., Imam, J.F.C., Vogel, H., Wood, L.D., Sage, J., Hirose, T., Nakagawa, S., Rinn, J. & Attardi, L.D. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. *Genes Dev* **31**, 1095-1108 (2017). 10.1101/gad.284661.116
8. West, J.A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T., Yanaka, K., Kingston, R.E., Hirose, T., Bond, C., Fox, A. & Nakagawa, S. Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J Cell Biol* **214**, 817-30 (2016). 10.1083/jcb.201601071
9. Nakagawa, S. Lessons from reverse-genetic studies of lncRNAs. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 177-83 (2016). 10.1016/j.bbagr.2015.06.011
10. Ip, J.Y., Sone, M., Nashiki, C., Pan, Q., Kitaichi, K., Yanaka, K., Abe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Blencowe, B.J. & Nakagawa, S. Gomafu lncRNA knockout mice exhibit mild hyperactivity with enhanced responsiveness to the psychostimulant methamphetamine. *Sci Rep* **6**, 27204 (2016). 10.1038/srep27204
11. Hirose, T. & Nakagawa, S. Clues to long noncoding RNA taxonomy. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 1-2 (2016). 10.1016/j.bbagr.2015.11.011
12. Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J., Latil, M., Verfaillie, A., Kalev, P., Boeckx, B., Wijnhoven, P.W., Radaelli, E., Vermi, W., Leucci, E., Lapouge, G., Beck, B., van den Oord, J., Nakagawa, S., Hirose, T., Sablina, A.A., Lambrechts, D., Aerts, S., Blanpain, C. & Marine, J.C. p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. *Nat Med* **22**, 861-8 (2016). 10.1038/nm.4135
13. Ishida, K., Miyauchi, K., Kimura, Y., Mito, M., Okada, S., Suzuki, T. & Nakagawa, S. Regulation of gene expression via retrotransposon insertions and the noncoding RNA 4.5S RNAH. *Genes Cells* **20**, 887-901 (2015). 10.1111/gtc.12280
14. Standaert, L., Adriaens, C., Radaelli, E., Van Keymeulen, A., Blanpain, C., Hirose, T., Nakagawa, S. & Marine, J.C. The long noncoding RNA Neat1 is required for mammary gland development and lactation. *RNA* **20**, 1844-9 (2014). 10.1261/rna.047332.114
15. Nakagawa, S., Shimada, M., Yanaka, K., Mito, M., Arai, T., Takahashi, E., Fujita, Y., Fujimori, T., Standaert, L., Marine, J.C. & Hirose, T. The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum

- formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. *Development* **141**, 4618-27 (2014). 10.1242/dev.110544
16. Nakagawa, S. & Kageyama, Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 215-22 (2014). 10.1016/j.bbagr.2013.10.009

〔雑誌論文〕 (計 31 件)

〔学会発表〕 (計 17 件)

〔図書〕 (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)  
該当なし

○取得状況 (計 件)  
該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<https://sites.google.com/rnabiol.com/home/home>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
該当なし

(2)研究協力者  
該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。