

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22374

研究課題名（和文）RNAの「もつれ」による細胞内相分離の誘発機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism to induce intracellular phase separation by RNA tangling

研究代表者

廣瀬 哲郎（Hirose, Tetsuro）

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：30273220

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）：核内相分離構造体パラスペックルはシェルとコアの二層構造からなり、その骨格として働いているNEAT1 lncRNAはその内部に規則正しく配置されている。NEAT1はRNA同士の相互作用（もつれ）を介して、U字型構造をとりつつ、両末端領域がひとまとめになって存在すると考えられる。この可能性をCRISPR/cas9ゲノム編集による変異解析で検証した結果、NEAT1の両末端を同時に欠失させると、U字構造をとらずに構造体内にランダムにRNA末端が配置するようになり、二層構造も消失することが明らかになり、RNAのもつれが構造体の微細構造を組み立てるのに寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内相分離は、細胞内を膜構造を使わずに区画化する機構として大きな注目を集めている。さらに神経変性疾患の発症などに深く関わる可能性が浮上している。本研究で示唆されたRNAのもつれによって相分離構造の微細な内部構造が決定されている可能性は、細胞内の様々な部位でRNAの発現に応じて一過的に形成される相分離構造を、RNAの配列に基づいて理解し、さらに人為的にコントロールするための基盤知見となりうる。一方で、RNAのもつれは、ゲノムから合成されている様々な種類のRNAにおいて起こりうる現象であり、これによって各RNAの運命が決定されている可能性も浮上した。

研究成果の概要（英文）：NEAT1 lncRNA acts as the structural scaffold of phase separated nuclear body paraspeckles. NEAT1 forms a U-shape configuration with bundled terminal regions and each of the terminal and the central NEAT1 regions is assigned in the specific paraspeckle area. We investigated the possibility that short RNA-RNA interactions or RNA tangling contributes to the NEAT1 configuration and spatial assignment using CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis. We found that the deletion of both terminal regions disrupt the organized paraspeckle structures and U-shape formation of NEAT1, suggesting the RNA tangling contributes to form the paraspeckle fine structure.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 超分子複合体 核構造・機能 タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内相分離の研究は、膜構造を介さず特定因子を空間的に隔離する機構として世界中で進展著しい。それらの研究は、細胞内で相分離した非膜構造体に含まれる RNA 結合タンパク質の天然変性領域を介した相分離機構の解析に向けられている。一方で、本研究で取り上げる「RNA 相分離」は、RNA 同士の複数の短い相互作用 (RNA の「もつれ」) によって引き起こされると考えられるが、詳細な分子機構やその意義についてはほぼ手付かずのままであった。申請者は、これまで ncRNA をコアとした核内構造体の相分離を介した形成機構について様々な知見を世界に先駆けて獲得してきたが、その過程でこれらの核内構造体には、従来のタンパク質の天然変性領域を介した相分離の他に ncRNA 自体による RNA 相分離コアが形成されていることを明らかにした。つまりタンパク質相分離を解消する化学試薬で細胞を処理した結果、核内構造体のタンパク質相分離部分が解離したのにも関わらず、RNA 相分離コアが残存していることを発見した。さらに申請者が新たに同定した核内構造体の中にも上記試薬耐性の相分離コアを見出したことより、RNA 相分離は細胞内で一般的現象であることが示唆された。これらの観察は、未だ報告がほとんどない RNA 相分離に関する実施者のオリジナルな成果であり、これらの研究対象を利用すれば、細胞内での ncRNA の「もつれ」による RNA 相分離の誘発機構が解明できることから、本研究構想に至った。本研究によって RNA 相分離とタンパク質相分離という 2 つの相分離機構が協調した細胞内空間隔離のための新しいメカニズムを提示できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

膜を介さずに特定因子を細胞内の局所空間に隔離する「相分離現象」に大きな注目が集まっている。細胞内相分離は RNA 結合タンパク質に含まれる天然変性領域の多価相互作用によって液滴形成に至る過程であることが明らかにされ、関連研究が世界中で急速に発展している。しかし一方で、タンパク質が存在しない状態でも RNA 単独で相分離が起こることが最近明らかにされた。この相分離は、RNA 合成段階での RNA 同士の複数の短い相互作用、いわゆる、RNA の「もつれ」による RNA 塊の形成によって誘発されると考えられる。本研究では、RNA 相分離の分子機構とその意義の解明に焦点を合わせる。そこでこれまでの申請者オリジナルな発見に基づいて、核内構造体内で RNA 相分離体コアを形成する ncRNA の分子間・分子内での「もつれ」の重要性を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

核内相分離構造体パラスペックルの構造骨格として働いている NEAT1 ncRNA の配列上で、情報学的手法によって予測された RNA-RNA 相互作用部位を含む領域を、CRISPR-Cas9 系によって欠失させた NEAT1 変異細胞株を樹立した。この細胞株において変異 NEAT1 によって形成されたパラスペックルを、NEAT1 ncRNA に対するアンチセンス核酸を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによって共焦点レーザー顕微鏡で検出した。また NEAT1 5' 及び 3' 末端領域や中央領域のパラスペックル内の配置を顕微鏡や電子顕微鏡で観察し、パラスペックル変異体の形状や大きさなどを定量解析した。一方、nSB の解析については、HSATIII ncRNA のアンチセンス核酸プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション、SAFB などのタンパク質の免疫蛍光染色によって共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

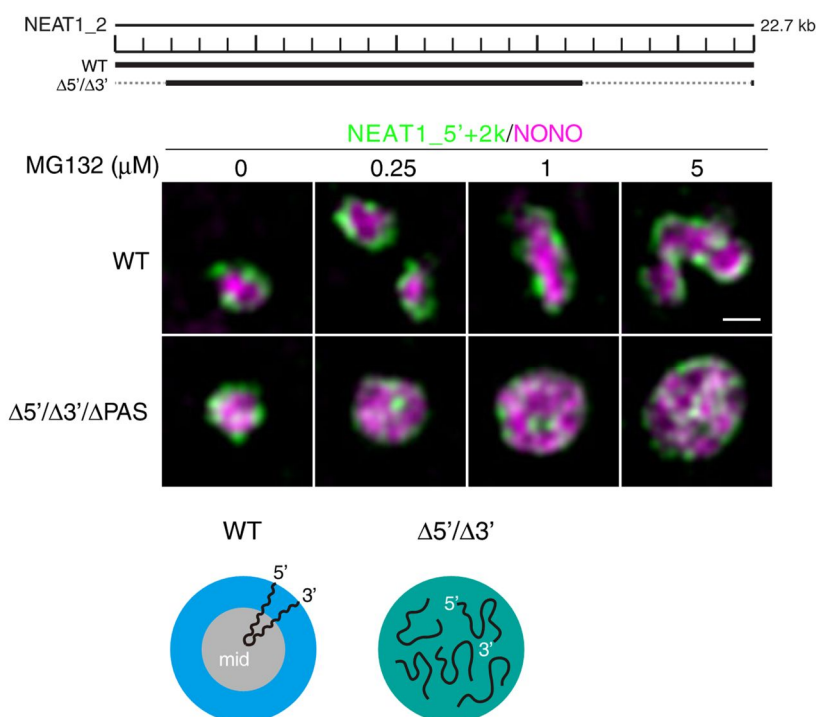
4. 研究成果

1. NEAT1 ncRNA は、23kb にも及ぶ長大な RNA である。パラスペックル構造体中で、NEAT1 の 5' 末端と 3' 末端の双方は構造体表面領域 (シェル) に、中央領域を構造体内部領域 (コア) に存在し U 字型の立体構造をとっていることが明らかになったことから、5' 側と 3' 側をひとまとめにする機構の存在が示唆されていた。またこうした RNA 構造がパラスペックル内部の微細構造形成に重要な役割を果たしていると考えられている。最近米国グループによる情報学的 RNA 二次構造予測によって、5' 末端近傍と 3' 末端近傍領域との間に断続的な塩基配列の相補性がブロードに認められることが指摘されたことから、RNA-RNA 間の短い相補配列の蓄積である、いわゆる「RNA のもつれ」によって NEAT1 の機能的立体構造が決定されている可能性が浮上した。そこでこの相補領域を欠いた NEAT1 変異体を用いて解析した結果、5' と 3' の相補部位双方を大きく欠失した NEAT1 変異体は、パラスペックル内部で U 字構造を取らず、5' 末端のみシェルに、3' 末端はコアに位置した線状構造に変化することが明らかになった。これによってパラスペックルの大きさやダイナミクスが変化し、さらに核内の別の非膜性構造体に取り込まれるなどの予想外の表現型を示すことが明らかになった。

2. 核内相分離構造体パラスペックルの構造骨格として働いている NEAT1 lncRNA が、パラスペックル構造体中で、NEAT1 の両末端を構造体表面領域 (シェル) に、中央領域を構造体内部領域 (コア) に存在し U 字型の立体構造をとりつつ、5' 側と 3' 側をひとまとめになって存在している機構について CRISPR/cas9 ゲノム編集による変異解析を行った。その結果、5' と 3' 領域のそれ

それを欠失した NEAT1 変異体は、パラスペックル内部で U 字構造を取りづらくなり、欠失側の RNA 末端がシェルからコアに存在位置を変化させ線状構造に変化することが明らかになった。さらに 5' と 3' 末端領域の両方を同時に欠失させると、もはやシェル-コア構造は取れなくなり、構造体内にランダムに RNA 末端が配置するように変化することが明らかになった。またパラスペックルの大きさや含まれる RNA の分子数もこうした欠失変異によって大きく変化することが明らかになった。一方で、共同研究による情報学的解析によって、NEAT1 は全長にわたって多数の短い RNA-RNA 相互作用によって RNA 分子同士が会合できることが明らかになり、こうした RNA のもつれが NEAT1 を束ねてシェル領域において 5' 領域と 3' 領域を区画化する原動力となっている可能性が強く示唆された (図)。これらの知見は、物理理論による構造体形態の予測とその検証に関する知見と共に論文として取りまとめた。

3. 相分離構造体を解離する 1,6-ヘキサソール処理によって、HSATIII ncRNA を骨格とした核内ストレス体(nSB)の RNA 凝集体が保持されることを見出し、RNA 間相互作用の重要性が示唆されていたが、今回 nSB の中心的なタンパク質因子である SAFB ファミリーをノックダウンしてもやはり nSB は解離しないことを見出し、タンパク質よりも RNA 間相互作用が構造骨格形成に寄与していることを支持するものとなった。



図：WT NEAT1 では末端をシェル、中央部をコアに配置した二層構造のパラスペックルを形成する。一方、両末端の欠失変異体 (Δ5'/Δ3') では配置はランダムになる。Δ5'/Δ3'では予測された RNA-RNA 相互作用領域が欠失している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki T, Yamamoto T, Yoshino H, Souquere S, Nakagawa S, Pierron G, Hirose T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020107270	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yamazaki T, Hirose T.	4. 巻 2254
2. 論文標題 CRISPR-Mediated Mutagenesis of Long Noncoding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 283-303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1158-6_18	査読の有無 有
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 Yamamoto T, Yamazaki T, Hirose T	4. 巻 16
2. 論文標題 CRISPR-Mediated Mutagenesis of Long Noncoding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Matter.	6. 最初と最後の頁 4692-4698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9sm02458a	査読の有無 有
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 廣瀬哲郎	4. 巻 95
2. 論文標題 ゲノムの暗黒物質はどこまで解明されたか	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 北海道医学雑誌	6. 最初と最後の頁 99-101
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 Ninomiya Kensuke, Hirose Tetsuro	4. 巻 6
2. 論文標題 Short Tandem Repeat-Enriched Architectural RNAs in Nuclear Bodies: Functions and Associated Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 6~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ncrna6010006	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 Yamazaki Tomohiro, Nakagawa Shinichi, Hirose Tetsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Architectural RNAs for Membraneless Nuclear Body Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology	6. 最初と最後の頁 039404 ~ 039404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/sqb.2019.84.039404	査読の有無 有
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 Ninomiya Kensuke, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Iwakiri Junichi, Terai Goro, Asai Kiyoshi, Hirose Tetsuro	4. 巻 39
2. 論文標題 LncRNA dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019102729	査読の有無 有
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 Aly Mahmoud Khamis, Ninomiya Kensuke, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Hirose Tetsuro	4. 巻 516
2. 論文標題 Two distinct nuclear stress bodies containing different sets of RNA-binding proteins are formed with HSATIII architectural noncoding RNAs upon thermal stress exposure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 419 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.06.061	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 非コードRNAによる相分離構造体の形成と機能制御
3. 学会等名 第112回 未来医療セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮賢介, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 HSATIII lncRNAs dictate primate-specific response to thermal stress through the dual mechanisms of splicing control
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 非コードRNAによる相分離構造体の形成と機能制御
3. 学会等名 核酸医薬シンポジウム 2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 ノンコーディングRNAによる核内構造体アーキテクチャ
3. 学会等名 第79回 日本癌学会 学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 Formation and function of phase separated nuclear bodies formed by architectural RNAs
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Formation of phase separated membrane-less nuclear bodies by long noncoding RNA
3. 学会等名 EMBO workshop, RNP network dynamics in development and disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Architectural noncoding RNA controlling liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 84th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 ノンコーディングRNAによる核内相分離構造体の形成機構
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 ノンコーディング RNA による相分離構造体の形成機構
3. 学会等名 日本リウマチ学会 第6回JCRベーシックリサーチカンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 細胞内の相分離構造体形成を主導するRNAの役割
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第9回CSJ化学フェスタ2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ノンコーディングRNA構造体nSBの新機能を発見～温度を感じたリン酸化反応の「るつぼ」として働く～ https://www.hokudai.ac.jp/news/2019/12/rnansb.html
--

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			
オーストラリア	University of Western Australia			
フランス	CNRS			