

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871195

研究課題名(和文) 選択的3'末端プロセッシングによる長鎖非コードRNAの機能獲得機構の解明

研究課題名(英文) Functional acquirement of long noncoding RNA is regulated by alternative 3' end processing

研究代表者

長沼 孝雄 (NAGANUMA, TAKAO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40466462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NEAT1 lncRNAの選択的3'末端プロセッシングがどのように発動・制御されてRNA機能の多様性が生み出されているのかを明らかにするために、NEAT1の選択的3'末端プロセッシング制御因子であるHNRNPKに着目し、それと相互作用し、プロセッシング制御機能を調節する因子を複数発見した。また、NEAT1 lncRNAの選択的3'末端プロセッシングが、MAPキナーゼ経路の1種であるJNK経路によって調節されている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To be aimed at elucidating the production mechanism of diverse functions of lncRNA, we explored how the alternative 3' end processing of NEAT1 lncRNA is acted and regulated. HNRNPK, which is a factor of the alternative 3' end processing of NEAT1 lncRNA, was focused and we discovered the multiple interaction factors that modulate the function for the processing of HNRNPK. In addition, we showed the great potential that the alternative 3' end processing of NEAT1 lncRNA was modulated by JNK pathway, which is one of MAPK pathways.

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 選択的3'末端プロセッシング

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノムのトランスクリプトーム解析により哺乳類ゲノムの大部分が、タンパク質をコードしない長鎖非コード RNA (lncRNA) として転写されていることが明らかとなってきた。しかしこれら lncRNA の大多数は、塩基配列とゲノム上の転写領域の情報のみが蓄積されているだけで、依然として機能不明のままである。lncRNA の 1 つである NEAT1 は、パラスペックルと呼ばれる細胞核内構造体を構築するユニークな RNA 機能を持つことが明らかにされており、lncRNA の研究分野において非常に注目されている RNA 分子の 1 つである。また近年、NEAT1 が癌や神経変性疾患において発現亢進が確認されるなど難治疾患との関連性も見出されており、疾患研究の分野においても注目され始めている。

NEAT1 が選択的 3'末端プロセシングにより 2 つの異なるアイソフォーム (3.7kb のショートアイソフォームと 23kb のロングアイソフォーム) を生み出していること、また異なる 2 つのアイソフォームのうちロングアイソフォームだけがパラスペックル構造構築機能を持つことが明らかになっており、NEAT1 のパラスペックル構造構築機能発現に選択的 3'末端プロセシング機構が必須である。このことは、lncRNA が多様性を生み出し、自身の RNA 機能を獲得するために選択的 3'末端プロセシングを利用していることを示唆するものである。実際 lncRNA には、タンパク質遺伝子に共通して存在するイントロンが存在せず、単一エクソン転写産物として産生されるものが多い。そのため遺伝子機能の多様性獲得戦略として、タンパク質遺伝子がエクソンの組合せを変える選択的スプライシングに依存しているのに対し、lncRNA は選択的 3'末端プロセシングに依存して多様性を獲得している可能性がある。そこで、本研究では NEAT1 lncRNA の選択的 3'末端プロセシングがどのように発動・制御されて RNA 機能の多様性が生み出されているのかを明らかにし、lncRNA の機能獲得機構を解明することを旨とした。

## 2. 研究の目的

本研究は NEAT1 lncRNA の選択的 3'末端プロセシングが、どのように発動・制御されて RNA 機能の多様性が生み出されているのかを明らかにし、lncRNA の機能獲得機構を解明することを目的としている。本研究では、NEAT1 の選択的 3'末端プロセシング制御因子である HNRNPK のプロセシング制御機能が、どのように調節されているのかを明らかにする。また、NEAT1 の選択的 3'末端プロセシングを変化させるような生理条件やシグ

ナル伝達経路を明らかにする。

## 3. 研究の方法

NEAT1 の選択的 3'末端プロセシング制御因子である HNRNPK のプロセシング制御機能が、どのように調節されているのかを明らかにするために、HNRNPK の相互作用タンパク質因子に着目し、バイオインフォマティクスを用いた *in silico* 解析によりそれらを探索した。得られた候補分子に関しては、実際に HNRNPK のプロセシング制御機能が発揮される場であるパラスペックルへの局在を NEAT1 の RNA-FISH と候補分子の免疫蛍光染色を組合せることで確認した。次に、パラスペックルへの局在が確認された分子については、RNAi によるノックダウンを行い、その際の NEAT1 アイソフォーム生成の変化を RNase プロテクションアッセイにより確認した。

NEAT1 の選択的 3'末端プロセシングを変化させるような生理条件を明らかにするために、HNRNPK のプロセシング制御機能を調節するような生理条件やシグナル応答経路を *in silico* で探索し、いくつかの候補の生理条件やシグナル応答経路を得た。得られた生理条件やシグナル応答経路が NEAT1 の選択的 3'末端プロセシングにどのような効果を及ぼすかを、生理条件やシグナル応答経路に関わる酵素の阻害剤を細胞に添加することで NEAT1 アイソフォーム生成の変化を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) HNRNPK のプロセシング制御機能調節因子の探索

HNRNPK は、転写、RNA プロセシング、翻訳といった遺伝子発現の様々なステップやシグナル伝達経路において機能することが知られている。この多様な機能は、HNRNPK 自身の翻訳後修飾や相互作用因子によって調節されている。はじめにバイオインフォマティクスを用い *in silico* で HNRNPK と相互作用することが示唆される分子を探索し、HNRNPK のプロセシング制御機能調節因子の候補を複数得ることに成功した。次に候補因子に対して HNRNPK のプロセシング制御機能が発揮される場であるパラスペックルへの局在を NEAT1 の RNA-FISH と候補分子の免疫蛍光染色を組合せることで確認したところ、候補因子のいくつかは NEAT1 と共局在し、パラスペックルに局在することが示された。これらの中から既に HNRNPK との相互作用が報告されている 2 つの分子、RBM42 と PRMT1 に注目し、さらなる解析を行った。

RBM42 は RNA 結合ドメインを持つ RNA

結合タンパク質であり、HNRNPK と相互作用し、細胞増殖や生存に関わるタンパク質の mRNA を安定化する機能が知られている。RBM42がHNRNPKのプロセシング制御機能にどのような効果を及ぼすかを明らかにするために、RNAi法を利用しRBM42をノックダウンした細胞におけるNEAT1のアイソフォーム生成をRNaseプロテクションアッセイで検出したところ、NEAT1のショートアイソフォームの生成に著しい低下が観られた(図1)。この結果は、RBM42のノックダウンによりHNRNPKのプロセシング機能が促進されたことを意味しており、RBM42はHNRNPKと相互作用し、そのプロセシング機能を負に調節していることが考えられた。今後は、RBM42がHNRNPKのプロセシング機能を負に調節する分子機構を明らかにしていく。

PRMT1は、タンパク質のアルギニン残基に非対称のメチル化修飾を施す酵素の1つである。PRMT1はHNRNPKと相互作用し、HNRNPK内の5つのアルギニン残基に非対称のメチル化修飾を施すことが知られている。PRMT1がHNRNPKのプロセシング制御機能にどのような効果を及ぼすかを明らかにするために、PRMT1をRNAiノックダウンした細胞におけるNEAT1のアイソフォーム生成をRNaseプロテクションアッセイで検出したところ、NEAT1のロングアイソフォームの生成に著しい低下が観られた(図1)。この結果は、PRMT1のノックダウンによりHNRNPKのプロセシング機能が抑制されたことを意味しており、PRMT1はHNRNPKと相互作用し、メチル化修飾を施すことでそのプロセシング機能を正に調節していることが考えられた。今後は、PRMT1がHNRNPKのプロセシング機能を正に調節する分子機構を明らかにしていく。また、RBM42およびPRMT1によるHNRNPKのプロセシング

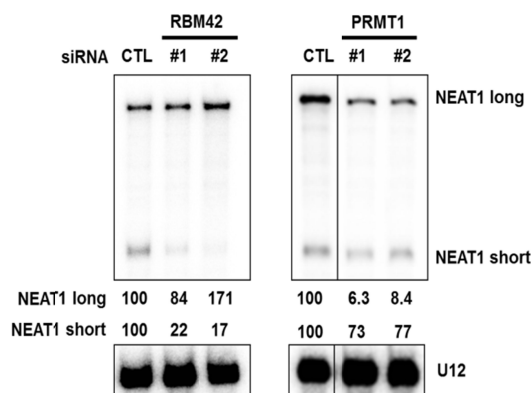


図1. RBM42およびPRMT1をノックダウンした細胞におけるNEAT1アイソフォーム生成変化の解析

機能調節のスイッチング機構についても明らかにしていく。

HNRNPKのプロセシング制御機能調節因子を新たに探索していくなかで、USP10という脱ユビキチン化酵素活性を有する興味深いタンパク質を見出し、さらなる解析を行うことにした。HNRNPKの特異抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、USP10が共沈降してくることが確認された。また、USP10の特異抗体を用いた免疫沈降においても同様にHNRNPKの共沈降が確認された。次に免疫蛍光染色によりUSP10の局在を確認したところ、パラスペクルと部分的に共局在することが明らかになった。USP10とNEAT1の相互作用を検証するためFLAGタグ融合USP10を発現させた細胞から抗FLAGタグ抗体を用いてRNA免疫沈降を行ったところ、NEAT1の共沈降が確認された。さらに、USP10とHNRNPKとの相互作用にRNAが仲介する可能性を検証するためにFLAGタグ融合HNRNPKを発現させた細胞から抗FLAGタグ抗体を用いてRNase A存在下で免疫沈降を行ったところ、RNase A処理によりUSP10とHNRNPK間の相互作用が弱まることが明らかになった。これらの結果は、USP10とHNRNPKの相互作用が、NEAT1を介してパラスペクル上で起きていることを示しており、おそらくUSP10はHNRNPKのユビキチン化修飾を外すことでHNRNPKのプロセシング制御機能を調節していることが考えられた。今後は、USP10がHNRNPKのプロセシング制御機能を調節する詳細な分子機構を明らかにしていく。

## (2) HNRNPKのプロセシング制御機能を調節する生理条件やシグナル応答経路の探索

これまでにNEAT1ロングアイソフォーム生成が細胞の生理条件やシグナル応答により大きく変動することを見出してきている。これは、細胞の生理条件やシグナル応答により選択的3'末端プロセシングが調節され、NEAT1ロングアイソフォームの生成を制御していることが示唆されている。つまり、細胞生理条件やシグナル応答によりHNRNPKのプロセシング制御機能が調節されていると考えられた。そこで、HNRNPKのプロセシング制御機能の調節に関わる生理条件やシグナル応答経路をin silicoで探索を試みたところ、HNRNPKがMAPキナーゼ経路と関連性を持つことが見出された。実際HNRNPKは、MAPキナーゼであるERKやJNKと相互作用し、リン酸化修飾を受けることが知られている。MAPキナーゼ経路とHNRNPKのプロセシング制御機能の関連性を検証するために、細胞にMAPキナーゼの各種阻害剤(ERK阻害剤PD98059、JNK阻害剤

SP600125、p38MAPK 阻害剤 SB203580) を添加し、その際の NEAT1 アイソフォーム生成への効果を検証したところ、JNK 阻害剤である SP600125 を添加した細胞で NEAT1 ショートアイソフォーム生成比の上昇が示された(図 2)。次に JNK 経路を活性化させることが知られている除草剤の一種であるパラコート(paraquat)を細胞に添加し、JNK 経路を活性化させたところ NEAT1 ロングアイソフォーム生成比の上昇が示された(図 2)。これらの結果は、NEAT1 アイソフォームを生成するために必須な選択的 3'末端プロセシングと MAP キナーゼ経路の 1 つである JNK 経路が関連していることを示しており、おそらくは JNK が HNRNPK をリン酸化することでそのプロセシング制御機能を調節していることに由来することが考えられた。今後は、JNK 経路による HNRNPK のプロセシング制御機能調節の分子機構を明らかにしていく。

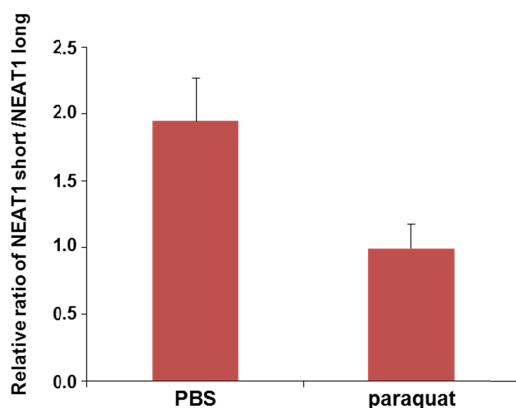
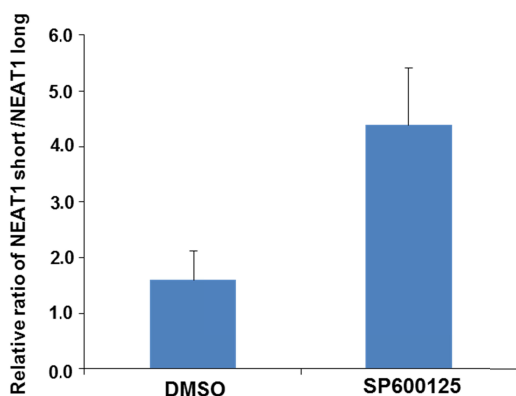


図 2. JNK 経路を阻害した細胞( SP600125 添加)および JNK 経路を活性化( paraquat 添加)させた細胞における NEAT1 アイソフォーム生成比変化の解析

## 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 2 件)

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 U S A, Vol.112(14) pp. 4304-4309, 2015 doi: 10.1073/pnas.1423819112. 査読有り

Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. "NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies." Molecular Biology of the Cell, Vol. 25(1) pp. 169-183, 2014 doi: 10.1091/mbc.E13-09-0558. 査読有り

[学会発表](計 1 件)

長沼孝雄、藤井結衣、千葉智樹 "HNRNPK の脱ユビキチン化を制御する分子機構の解明" 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2014.11.26

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

長沼 孝雄 (NAGANUMA, TAKAO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号 : 40466462