

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15084

研究課題名（和文）ノンコーディングRNAの新規機能分類「Architectural RNA」の確立

研究課題名（英文）Establishing "Architectural RNA" as a novel functional category of noncoding RNAs

研究代表者

中條 岳志 (Chujo, Takeshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：50788578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：実施者による研究期間前半の成果、後任者による研究、共同研究、研究室の尽力により、architectural RNAという言葉と機能分類は、世界中の研究者による論文で使用されるようになった。従って、本研究が目的としていた「ノンコーディングRNAの新規機能分類Architectural RNAの確立」は達成されたとと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今世紀に発見された機能未知のnoncoding RNA (ncRNA) 群の内、核内顆粒の構造構築を司るncRNAをarchitectural RNA (arcRNA) として確立することができた。

研究成果の概要（英文）：This study, along with my successor's study, other lab members' studies, and my collaborator's studies have collectively enabled the establishment of "architectural RNA" as one functional category of long noncoding RNAs, which was the final goal of this study.

研究分野：RNA

キーワード：architectural RNA 核内RNA顆粒 難溶性RNA

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。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの4分の3の領域が転写され、明確な転写単位を持つ200塩基以上のノンコーディングRNA(長鎖ncRNA)が、2万種類以上あることが明らかにされた。長鎖ncRNAの役割としては、エピジェネティックな遺伝子発現制御などが明らかになり、発現異常が癌や筋ジストロフィー等の疾患を引き起こす例も報告されている。しかし現時点では、大部分の長鎖ncRNAの存在意義は解明されていない。このような状況で、廣瀬研究室は、核内のパラスペックル顆粒に局在するNEAT1長鎖ncRNAが、パラスペックル顆粒を構築する骨格分子であることを発見した(Sasaki et al. PNAS, 2009)。さらに、実施者らは、顆粒構造の骨格として働く長鎖ncRNAをarchitectural RNA(arcRNA)と命名・機能分類することを提唱した(Chujo et al. BBA, 2016)。arcRNAの作用機構の例としては、arcRNAが構築した顆粒内に転写因子やRNA結合タンパク質等を大量に捕捉することで、核質でのこれら制御因子による遺伝子発現制御を抑えること(分子スポンジ作用)を所属研究室は報告した。個体レベルでは、たとえばNEAT1 arcRNAは、哺乳類において妊娠、乳腺の発達、癌細胞の生存を促進する。したがって、新しいarcRNAを同定してその機能を解明することで、新たな遺伝子発現制御機構や疾患発症機構の解明に結びつくことが期待される。しかしながら、arcRNAを系統立てて探索する有効な手法が存在しなかったため、研究開始当初の時点でarcRNAとして分類可能なヒト長鎖ncRNAは3種類に留まっていた。

実施者は研究開始当初までに、細胞からRNAを抽出する方法を改善した結果、NEAT1を含む既知のarcRNAのみが、従来の抽出方法では細胞から抽出されにくい性質(難溶性)を発見した。NEAT1の難溶性の原因は、フェノールやグアニジン塩といった強力な変性剤を含むRNA抽出試薬中においてもNEAT1の強いRNA-タンパク質間相互作用、およびNEAT1結合タンパク質の強固なタンパク質間相互作用が維持されてNEAT1がタンパク質から外れないことであった。さらに、このような結合力はarcRNAが核内顆粒を構築する駆動力でもある点に着目し、新規arcRNAを探索するために、次世代シーケンス解析を駆使して「難溶性RNA」をトランスクリプトームワイドに同定した。その結果、40種類以上の難溶性RNAを見出した。その中で発現量が多い10種類には、NEAT1 arcRNAも含まれ、これら高発現難溶性RNAは核内で顆粒状構造体への局在を示したことから、新規arcRNAであることが強く示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究は、新しいarcRNAを発見し、さらにarcRNAの共通項を明らかにすることにより、arcRNAというncRNA機能の基盤概念と一つの機能カテゴリーを確立することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) ストレス条件下における新規arcRNAの探索

ヒトには2万種類以上の機能未知な長鎖ncRNAが存在する。また既知のarcRNAはいずれも特定のストレス下で転写が誘導される。これらの知見から、ストレスに応答して発現する新たなarcRNAが存在することが期待される。そこで、細胞にストレスを与えた際などに発現する新たなarcRNAの同定を目的として、様々なストレスを与えた細胞や疾患モデル細胞からのRNA抽出時にニードル処理有りまたは無しの場合合計26サンプルの難溶性RNA/次世代シーケンスを実施した。

(2) arcRNAを探索するための新規手法の開発

癌関連の核内顆粒として知られるSam68 nuclear body(SNB)は、RNA分解酵素感受性を示すことなどから、顆粒構築に必要なarcRNAを有すると考えられる。実施者が難溶性RNAを同定したHeLa細胞においてもSNBは存在するが、SNBに局在する難溶性RNAはなかった(Chujo et al. EMBO J, 2017)。また、既知のarcRNAの中には、難溶性を示さないarcRNAも知られている。従って、難溶性を示さないRNAがSNBの構築に関わると考えられ、このようなarcRNAを探索する方法を開発しようと考えた。一般にarcRNAは、必ず構築する核内顆粒の内部に存在する。そこで、SNBを構築するRNAを探索する方法として、Fluorescence activated cell sorting(FACS)法を活用しようと考えた。すなわち、FACSによってSNBを単離し、内部のRNAを同定すれば、SNBを構築するRNAの有力候補を得られると考えた。研究材料としては、蛍光タンパク質Venusを融合したSam68(Venus-Sam68)を安定的に発現するHeLa細胞を使用した。

(3) 難溶性RNAに存在するRNAエレメントの探索

早稲田大学浜田研との共同研究で、難溶性RNAに存在するRNAエレメントや結合タンパク質の探索を開始した。

4. 研究成果

(1) ストレス条件下における新規 arcRNA の探索

様々なストレスを与えた細胞の難溶性 RNA を次世代シーケンス解析により同定した結果、ある種のストレスを与えた細胞において、新たに一群の難溶性 RNA が生じることが判明した。これらの RNA は新しく発現した RNA ではなく、既存の一部の mRNA が転写終結せずに転写延長したものであった。量が多いものもあり、新たな arcRNA として有力な候補を得ることができた。

(2) arcRNA を探索するための新規手法の開発

初めに、セルソータにより核内顆粒のように小さな粒子を本当に分離できるかを検証するために、直径 200 nm の蛍光ビーズをセルソータにかけた結果、セルソータで確かに微細な粒子を分離できることを確認した。次に、細胞の前処理方法を検討した結果、細胞の固定と分画、超音波破碎、さらなる分画により、SNB が濃縮可能になった。さらに FACS による SNB を含む蛍光の強い粒子を分離することに成功した。その結果、分離した粒子において SNB のマーカータンパク質である内在 Sam68 と内在 HNRNPL が濃縮されている一方で、核小体マーカータンパク質 Nucleolin はほとんど含まれていなかったことをウェスタンブロットで確認し、SNB の濃縮が行えたことを確認した。そこで、この粒子に含まれる RNA を次世代シーケンス解析した結果、残念ながら有意に濃縮する RNA を見出すことができなかった。原因として考えられる可能性は、1) SNB 画分に核質の混入があった可能性、あるいは 2) SNB の arcRNA は一般的な長鎖ノンコーディング RNA や mRNA ではなく、短いリピート配列 RNA であり一般的な解析方法では排除されていた可能性がある。1) に対処するためには、Venus-Sam68 の蛍光による濃縮に加えて、内在の SNB マーカータンパク質の染色を行い 2 段階の FACS による濃縮を行う方法が考えられる。2) に対処するためには、インフォマティクスの専門家に相談することが必要だと考えられる。

(3) 難溶性 RNA に存在する RNA エLEMENTの探索

早稲田大学浜田研との共同研究で、Chujo et al. EMBO Journal (2017) で報告した難溶性 RNA に存在する RNA エLEMENTと結合タンパク質の探索を開始し、今後の展開が期待される。

(4) 総括

実施者は本研究の期間中に廣瀬研から異動したため、本研究の当初の計画の実施は遅滞せざるを得なかった。しかしながら、実施者による研究期間前半の成果、廣瀬研究室における後任者による研究、共同研究、廣瀬研究室の尽力により、architectural RNA という言葉および機能分類は、世界中の研究者による論文で使用されるようになった。従って、本研究が当初の目的としていた「ノンコーディング RNA の新規機能分類 Architectural RNA の確立」は達成されたと言えるだろう。

(5) 発表論文

1. Regulation of growth hormone biosynthesis by Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) in pituitary adenomas.

Takesue T, Wei FY, Fukuda H, Tanoue Y, Yamamoto T, Chujo T, Shinojima N, Yano S, Morioka M, Mukasa A, Kuratsu J, Tomizawa, K.

Endocrine Journal 66(9) 807 - 816. 2019 年.

2. Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation.

Yamazaki T, Souquere S, Chujo T, Kobelke S, Chong YS, Fox A, Bond C, Nakagawa S, Pierron G, Hirose T.

Molecular Cell 70(6) 1038 - 1053. 2018 年.

3. Nuclear bodies built on architectural long noncoding RNAs: unifying principles of their construction and function.

Chujo T, Hirose T.

Molecules and Cells 40(12) 889 - 896. 2017 年.

4. Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs.

Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuya Kawaguchi, Satoshi Kurosaka, Toru Takumi, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose.

EMBO JOURNAL 36(10) 1447 - 1462. 2017 年.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yoshihiro Takesue, Fan-Yan Wei, Hiroyuki Fukuda, Yuki Tanoue, Takahiro Yamamoto, Takeshi Chujo, Naoki Shinojima, Shigetoshi Yano, Motohiro Morioka, Akitake Mukasa, Junichi Kuratsu, Kazuhito Tomizawa | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 Regulation of growth hormone biosynthesis by Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) in pituitary adenomas | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Endocrine Journal | 6. 最初と最後の頁 807-816 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ18-0536 | 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, Souquere Sylvie, Chujo Takeshi, Kobelke Simon, Chong Yee Seng, Fox Archa H., Bond Charles S., Nakagawa Shinichi, Pierron Gerard, Hirose Tetsuro | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Cell | 6. 最初と最後の頁 1038 ~ 1053 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.05.019 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Takeshi Chujo and Tetsuro Hirose | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Nuclear Bodies Built on Architectural Long Noncoding RNAs: Unifying Principles of Their Construction and Function. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Molecules and Cells | 6. 最初と最後の頁 889-896 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14348/molcells.2017.0263 | 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 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中條 岳志、永芳 友、鈴木 健夫、Chien Wen Chen、平田 翔児、Yi Kai Chen、田中 元雅、鈴木 勉、富澤 一仁、魏 范研 |
| 2. 発表標題 tRNAメチル化酵素による翻訳制御とその破綻による精神遅滞発症の分子機構 |
| 3. 学会等名 日本RNA学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中條岳志 |
| 2. 発表標題 翻訳マシナリ解析技術の最先端とその神経疾患機序解明への応用 |
| 3. 学会等名 健康長寿代謝制御センター神経感覚運動器研究部門交流セミナー |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 天津早貴, 岡田航, 曾超, 中條岳志, 廣瀬哲郎, 浜田道昭 |
| 2. 発表標題 architectural RNA配列の特徴抽出 |
| 3. 学会等名 生命科学系フロンティアミーティング2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Hyura Yoshino, Hiro Takakuwa, Takeshi Chujo, Archa Fox, Charles Bond, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, Tetsuro Hirose |
| 2. 発表標題 Functional domains of NEAT1 architectural lncRNA induce paraspeckle assembly through phase separation |
| 3. 学会等名 The Joint Symposium of the 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences and the 28th Hot Spring Harbor International Symposium 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Hiro Takakuwa, Hyura Yoshino, Takeshi Chujo, Archa Fox, Charles Bond, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, and Tetsuro Hirose |
| 2. 発表標題 Multiple NEAT1 modular RNA domains cooperatively construct phase-separated, distinct, highly ordered paraspeckle nuclear bodies |
| 3. 学会等名 JAJ RNA 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中條岳志 |
| 2. 発表標題 tRNAメチル化酵素の機能欠損による疾患発症機構の解明 |
| 3. 学会等名 2018年度健康長寿代謝制御研究センター交流会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuya Kawaguchi, Satoshi Kurosaka, Toru Takumi, Shinichi Nakagawa, and Tetsuro Hirose |
| 2. 発表標題 Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural long noncoding RNAs |
| 3. 学会等名 RNA Society Meeting 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中條岳志、田中くみ子、山崎智弘、萬年太郎、川口哲哉、黒坂哲、内匠透、中川真一、廣瀬哲郎 |
| 2. 発表標題 核内構造体アーキテクチャルRNAの探索手法の開発：難溶性RNA-seqとFABS法 |
| 3. 学会等名 第3回北海道大学・部局横断シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中條岳志、田中くみ子、山崎智弘、萬年太郎、川口哲哉、黒坂哲、内匠透、中川真一、廣瀬哲郎 |
| 2. 発表標題 核内構造体アーキテクチャルRNAの探索手法の開発：難溶性RNA-seqとFABS法 |
| 3. 学会等名 第8回北海道大学遺伝子病制御研究所研究成果発表会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuya Kawaguchi, Satoshi Kurosaka, Toru Takumi, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose |
| 2. 発表標題 Unusual semi-extractability as the hallmark of nuclear body-associated architectural long ncRNAs |
| 3. 学会等名 日本RNA学会年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中條岳志、山崎智弘、川口哲哉、黒坂哲、内匠透、中川真一、廣瀬哲郎 |
| 2. 発表標題 核内構造体形成のアーキテクチャル長鎖ncRNAの共通特性としての難抽出性 |
| 3. 学会等名 生化学会北海道支部会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takeshi Chujo and Tetsuro Hirose |
| 2. 発表標題 nusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural long ncRNAs |
| 3. 学会等名 2nd International Symposium for Noncoding RNA Neo-taxonomy (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「抽出しにくいRNA」から核内顆粒形成に関わる癌関連ノンコーディングRNAを発見
https://www.hokudai.ac.jp/news/170413_pr.pdf

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|