

令和元年8月29日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19335

研究課題名(和文) RNAによるタンパク質相転移の制御系開発

研究課題名(英文) Development of an RNA-induced protein phase separation system

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液相転移(LLPS)の試験管内誘導系の開発とそれを用いたLLPS誘導機構の解明を目的としている。In vivo解析で同定されたパラスペックル形成に必要なNEAT1 arcRNAのC2サブドメイン由来のRNA断片をin vitroで合成し、HeLa核抽出液と混合するとLLPSが誘導されることを改良検出法によって定量的に検出することに成功した。さらに、in vivoでC2サブドメインに機能的に相互作用するNONO、SFPQがこのLLPSに必須なこと、RBM14、FUSが二次的にRNA上に結合することを見出した。こうしてRNAを足場としたLLPS誘導機構の理解が大きく進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LLPS研究は世界的に大きな注目を集め、多くの研究が急速に進んでいる。本研究は、そうした中でLLPSにRNAが果たす役割を解析するためのin vitro解析系を開発し、それを用いて実際に関与するタンパク質因子を同定したことが意義深い。さらにin vivo解析で同定したncRNAの機能ドメインの役割が、LLPS誘導機能であることを明確に示したこともncRNA研究分野に大きなインパクトを与える成果といえる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop an in vitro LLPS system and understand the LLPS mechanism using the system. We found that LLPS was induced with the RNA fragment derived from the C2 subdomain of NEAT1 arcRNA, that was identified as the functional region for nuclear paraspeckle formation by CRISPR/Cas9 genome editing analysis, which was synthesized in vitro and mixed with HeLa nuclear extract. We devised sensitive and quantitative detection system of LLPS. Using the in vitro system, we identified NONO and SFPQ, which are required for paraspeckle assembly in vivo, are also required for in vitro LLPS and further identified RBM14 and FUS that are secondarily recruited to the C2 RNA. Thus, our research unveiled the mechanism of LLPS which was induced by C2 subdomain of NEAT1 arcRNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：noncoding RNA 液相分離 RNA結合タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核内構造体パラスペックルは、リボソームの 1500 倍もの体積をもつ巨大 RNP 複合体である。その構造骨格として機能する NEAT1 arcRNA による構造構築機構を解析したところ、プリオン様ドメイン (PLD) を有する 6 種類の RNA 結合タンパク質が NEAT1 と共にパラスペックル会合に必須であること、そこで PLD が重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方で PLD タンパク質が溶液中で液体相分離 (LLPS) によって液滴やヒドロゲルを形成することが示され、この相転移構造こそがパラスペックルを含む核内構造体の構造の本質であることが示唆された。こうした背景から、arcRNA の機能とは、PLD タンパク質の LLPS 誘導を指すことが示唆された。そこで、NEAT1 配列に隠された LLPS を誘導する仕組みを明らかにするため、ゲノム編集技術を駆使してパラスペックル形成のキーとなる NEAT1 arcRNA 領域を絞り込むことに成功した。そして、この絞り込んだ RNA 断片を *in vitro* で合成し、これを核抽出液に加えたところ、試験管内で LLPS による液滴形成を誘導できることが明らかになった。そこでこの系をさらに改良することによって、NEAT1 arcRNA の機能領域を介した LLPS 誘導の分子機構を理解することができる状況となった。

### 2. 研究の目的

本研究は、「タンパク質の液体相転移 (LLPS)」と「長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) 機能」という 2 つの萌芽的な事象を、試験管内解析系を利用した生化学的解析によって機能的に結びつけ、lncRNA による LLPS 誘導という普遍的現象の基盤ルールを確立することを目的としている。またこの研究は、タンパク質凝集異常で引き起こされる難治性神経変性疾患の発症予防のための基盤技術につながる可能性を秘めている。

### 3. 研究の方法

#### In vitro LLPS 系の開発

NEAT1 arcRNA のパラスペックル形成に必要なサブドメイン由来の RNA を T7 RNA ポリメラーゼによって、ビオチン化ヌクレオチドを取り込ませ、ビオチン化 RNA を合成し、これをストレプトアビジンによって磁気ビーズ上に固定した。このビーズを HeLa 核抽出液と混合して、ビーズの凝集具合を顕微鏡で観察した。コントロールとしてアンチセンス鎖、無関係の RNA などを用意した。LLPS の阻害には、1,6-Hexanediol を加えてビーズの凝集具合を観察した。

#### LLPS 責任因子の探索

*In vitro* LLPS 中に RNA 上に結合しているタンパク質を検出するために、RNA 沈降を行い結合タンパク質をウェスタンブロットによって検出した。また HeLa 核抽出液から NEAT1 機能ドメインに依存した LLPS 誘導に必須の役割を果たしている候補タンパク質を免疫除去によって取り除いた核抽出液を調整し、上記 *in vitro* LLPS 実験に用いた。

### 4. 研究成果

#### In vitro LLPS 系の開発

*in vitro* において、RNA によって LLPS が効率よく誘導できる系の改良に取り組み、RNA の効果を効率よく発揮させるために、磁気ビーズに RNA をコンジュゲートさせ、ビーズ周辺に RNA が高濃度で存在する「環境」を形成させることによって、細胞内の核内構造体形成環境を模倣することにした。用いる RNA としては、*in vivo* において、LLPS を介した核内構造体形成を担う NEAT1 lncRNA の機能ドメインとして同定した C ドメイン内の 2 つの機能サブドメイン領域由来の RNA 断片とそれぞれのアンチセンス RNA 断片を用いた。これらの RNA をビオチン化ビーズ上に固定化したものを用意し、そこに HeLa 細胞核抽出液と混合した。その結果、機能ドメイン由来のセンス RNA を用いた場合、多数のビーズ同士が集合した大きな凝集塊が形成された。この結果は、RNA ビーズ周辺で誘発された LLPS 様相転移によって凝集塊が作られたことを意味している。一方でこの凝集塊は、2 つのアンチセンス RNA を用いた場合は形成されず、また LLPS を阻害する 1,6-hexanediol 処理によって解離することが明らかになった。こうして *in vitro* において RNA 配列依存的に LLPS を誘発させ、それを効率よく検出する系が確立された。

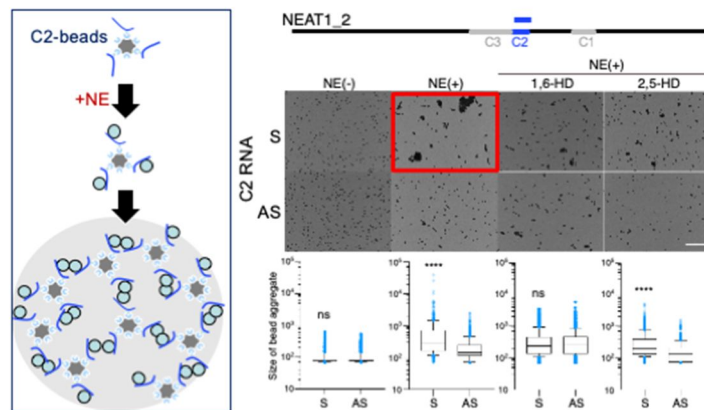


図. *In vitro* LLPS 系による NEAT1 C2 サブドメインの LLPS 誘導機能の解明

機能ドメイン由来のセンス RNA を用いた場合、多数のビーズ同士が集合した大きな凝集塊が形成された。この結果は、RNA ビーズ周辺で誘発された LLPS 様相転移によって凝集塊が作られたことを意味している。一方でこの凝集塊は、2 つのアンチセンス RNA を用いた場合は形成されず、また LLPS を阻害する 1,6-hexanediol 処理によって解離することが明らかになった。こうして *in vitro* において RNA 配列依存的に LLPS を誘発させ、それを効率よく検出する系が確立された。

## LLPS 責任因子の探索

In vitro LLPS 誘導条件下で、磁気ビーズ上の NEAT1 arcRNA に結合しているタンパク質を検出するために、その磁気ビーズを回収して、そこに結合しているタンパク質をウェスタンブロットで検出したところ、NONO, SFPQ などのパラスペックル形成に必須のプリオン様 RNA 結合タンパク質が結合していることが明らかになった。さらにその NONO と SFPQ は、ヘテロダイマーとして結合しており、さらにこの因子を免疫除去によって核抽出液から除去すると、in vitro LLPS が著しく阻害されることが明らかになった。さらに FUS, RBM14 という強い LLPS 誘導機能を持つ RNA 結合タンパク質が、NONO, SFPQ に依存して C1, C2 RNA 機能サブドメイン上にリクルートされてくることが明らかになった。別途実施した In vivo における RNA 結合タンパク質のテザリング解析によって NONO, SFPQ は NOPS ドメインを用いてヘテロダイマーを形成し、さらに coiled-coil 領域間でオリゴマーを形成してパラスペックル形成の基盤を作っていることが示唆されていたが、本研究による in vitro 解析によって、機能サブドメインの働きが裏付けられた。本研究成果は、Molecular Cell (2018)に発表した。以上のことから、本研究による in vitro 系は in vivo で核内構造体形成のために起こる arcRNA サブドメインを起点する LLPS 誘導の部分的に再現できるものであり、今後この系を用いて LLPS を誘導するさらに詳細な分子機構解析に威力を発揮するものになると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)(全て査読あり)

1. [Hirose T](#), Yamazaki T, Nakagawa S. 2019. Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: the domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. WIREs RNA e1545. doi: 10.1002/wrna.1545.
2. Yamazaki T, Souquere S, Chujo T, Kobelke S, Chong YS, Fox AH, Bond CS, Nakagawa S, Pierron G, [Hirose T](#). 2018. Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. Mol Cell. 70:1038-1053.
3. Fox AH, Nakagawa S, [Hirose T](#), Bond CS. 2018. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. Trends Biochem Sci. 43:124-135.

〔学会発表〕(計 14 件)

招待講演のみを記載する。

1. [Hirose T](#). Architectural noncoding RNA controlling liquid-liquid phase separation. 84th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, USA, 2019.5.29-6.3
2. [廣瀬哲郎](#) Formation and function of phase separated nuclear bodies with architectural noncoding RNAs. 第 41 回日本分子生物学会 (ワークショップ) 横浜, 2018.11.28-11.30
3. [Hirose T](#). Nuclear architecture by long noncoding RNAs through phase separation. China Nucleic Acids Forum 2018, Guangzhou, China. 2018. 11.15-16.
4. [Hirose T](#). Nuclear body formation by long noncoding RNAs through phase separation. JAJ meeting 2018 Sapporo. 2018. 11.5-7.
5. [廣瀬哲郎](#) Molecular Mechanism of Nuclear Body Formation by Architectural Noncoding RNAs, SIL エキスパートシンポジウム 藤沢、2018.7.31
6. [廣瀬哲郎](#) Nuclear Architecture by Long Noncoding RNAs, 中国医薬大学合同シンポジウム、札幌、2018.6.21
7. [廣瀬哲郎](#) ノンコーディング RNA による細胞内構造構築、第 59 回日本神経学会学術大会、札幌、2018.5.25
8. [廣瀬哲郎](#) ノンコーディング RNA による細胞内構造構築、第 12 回日本エピジェネティック研究会、札幌 2018.5.24
9. [Hirose T](#). Dissection of architectural noncoding RNA elements and machinery. Keystone Symposia Noncoding RNAs: Forms, Function and Physiology, Keystone, USA, 2018.2.27
10. [廣瀬哲郎](#) Nuclear Architecture by Long Noncoding RNAs, 11th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2017)、仙台、2017.12.15

11. Hirose T. Molecular Dissection of Architectural Noncoding RNA Elements and Machinery. International symposium on multidisciplinary insights into higher order biological complexes. Perth, Australia, 2017.10.31
12. 廣瀬哲郎 Noncoding RNA-dependent Nuclear Body Formation through Liquid-liquid Phase Separation, 第40回日本神経科学会、千葉、2017.7.22
13. 廣瀬哲郎 Molecular Dissection of Architectural Noncoding RNA Elements and Machinery, 第43回内藤コンファレンス、札幌、2017.6.29
14. 廣瀬哲郎 ノンコーディング RNA による細胞内構造構築機構、第69回日本細胞生物学会シンポジウム、仙台、2017.6.15

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

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。