

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06478

研究課題名(和文) 核内ストレス体の構成変動に着目したストレス応答機構の解明

研究課題名(英文) Compositional dynamics of nuclear stress bodies and its roles in stress response

研究代表者

二宮 賢介 (Ninomiya, Kensuke)

大阪大学・生命機能研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：00437279

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)：熱ストレス下で、霊長類ゲノム特異的サテライト領域から転写されるHSATIII lncRNAは、核内で特異的なRNA結合蛋白質を集積し、nuclear stress body (nSB)と呼ばれる巨大な核内構造体を形成するarchitectural RNAである。本課題研究において、nSBが熱ストレス条件下で形成された後、熱ストレス回復過程で経時的に構成因子の種類や修飾を変化させていくこと、さらにその動的特性によって、熱ストレス回復初期に機序の異なる2つのスプライシング制御機構の足場となって、400種以上に及びmRNAの発現を制御していることを見出し、それらの成果を二報の論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内ストレス体は熱ストレス下の細胞核内で形成される霊長類特異的な構造体であるが、その分子機能は30年近くにわたってほとんど解明されていなかった。本研究課題において、核内ストレス体が熱ストレス回復期の遺伝子発現を2つの異なる分子機構の足場となることで制御していることを見出した。この結果は、霊長類特異的な細胞ストレス応答機構の解明に寄与すると考えられる。また、核内ストレス体の足場となる分子は単純な繰り返し配列で構成された長鎖非コードRNAであり、そのRNAが複数の分子機能の共通の足場になりうることを示した点で、学術的にも示唆に富んだ興味深い成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：HSATIII lncRNAs are primate-specific transcripts mostly consisting of GGAU repeat. HSATIII lncRNAs are transcribed under thermal stress conditions and stably remain in the nucleus, where they recruit specific RNA-binding proteins (RBPs) to assemble massive membraneless subnuclear structures called nuclear stress bodies (nSBs). Recently, we reported that nSBs repress splicing of hundreds of specific pre-mRNAs during thermal stress recovery through the dual control mechanisms: “reaction crucibles” for CLK1-dependent re-phosphorylation of SRSF9 and “molecular sponges” for sequestration of m6A-related factors.

研究分野：分子生物学

キーワード：熱ストレス応答 長鎖非コードRNA スプライシング 非膜性構造体

1. 研究開始当初の背景

核内ストレス体(nuclear stress body, 以下 nSB)は、1980年代に発見された、熱ストレス下の細胞核に現れる霊長類特異的な非膜性核内構造体であり、SR 蛋白質や HNRNP などの特異的な RNA 結合蛋白質に富む。2000年代に入り、ペリセントロメア領域の Satellite III 反復配列からヒートショック特異的に転写される HSATIII 長鎖非コード RNA (lncRNA) が nSB の必須な足場であることが明らかになった(文献 1)。以上より nSB は熱ストレス下において RNA プロセッシングを制御する霊長類特異的な機能があることが予測されるが、その実際の構成や機能は殆どが不明のままであった。近年、我々は nSB の構成蛋白質、および、制御下にある遺伝子の網羅的な探索を行い、それらの解析の結果、nSB は環境依存的、経時的にその構成を変化させることで、核内 RNA のプロセッシングや修飾を調節し、様々なストレス応答機構を制御している可能性を見出した。

(文献 1) Sandqvist A and Sistonen L. *J Cell Biol*, 164: 15-17, 2004.

2. 研究の目的

本研究課題は、nSB の構成変動に着目し、その機構、および、その機構を介した核内 RNA のプロセッシング、核外輸送、塩基修飾、安定性の制御機構を解析することで、nSB によるストレス応答機構、ひいては霊長類特異的なストレス応答機構を解明することを目的にしている。

3. 研究の方法

nSB に含まれるタンパク質の網羅的な解析、および制御下にある遺伝子の解析から、nSB による遺伝子発現制御機構として、後述の 2 種類の仮説を設定し、検証を行った。第一のモデルは、熱ストレスによって脱リン酸化した SR タンパク質群 (特にその一つである SRSF9) が nSB に集積し、ストレス回復期に SRSF9 をリン酸化する酵素である CLK1 をリクルートすることで、速やかに再リン酸化し、リン酸化 SRSF9 がスプライシング制御を行うというモデルである。第二の機構は、HSATIII lncRNA 自身が主に熱ストレス回復期に m6A 修飾を受けることで、他の RNA の m6A 修飾を競合的に阻害し、それらの m6A 修飾依存的なスプライシングを制御するというものである。まず、これらの仮説の基盤となる分子メカニズムを検証するために、nSB 内でのタンパク質の種類の変動や、RNA やタンパク質の修飾およびその変化を ChIRP (Chromatin Isolation by RNA Purification) 法による解析や、ChIRP 法とタンパク質リン酸化等の生化学的解析、タンパク質や RNA の質量分析などを組み合わせた解析を行った。また、細胞染色により、上記の機構に関連するタンパク質の熱ストレス回復期特異的な nSB へのリクルートや、その結果としての核質からの減少について解析した。

SRSF9 および、m6A 修飾関連タンパク質のノックダウン細胞でトランスクリプトーム解析を行い、nSB の制御下にあるトランスクリプトームの情報と照合することで、二つの機構の各々による制御標的 RNA を同定・分類した。また、実験的な検証のために、2 つの機構を担うタンパク質それぞれのノックダウンによる nSB 標的 RNA のスプライシング変化の解析、新生鎖 RNA のスプライシング解析を行った。

また、非霊長類細胞にヒト 9 倍染色体を組み込んだ細胞を用いて、HSATIII lncRNA を強制的に発現させた非霊長類細胞で、熱ストレス回復期のスプライシング変動パターンの解析を行い、非霊長類細胞遺伝子由来の RNA 前駆体のスプライシングを解析し、その変動パターンがヒト型の挙動に近づく実例を発見した。

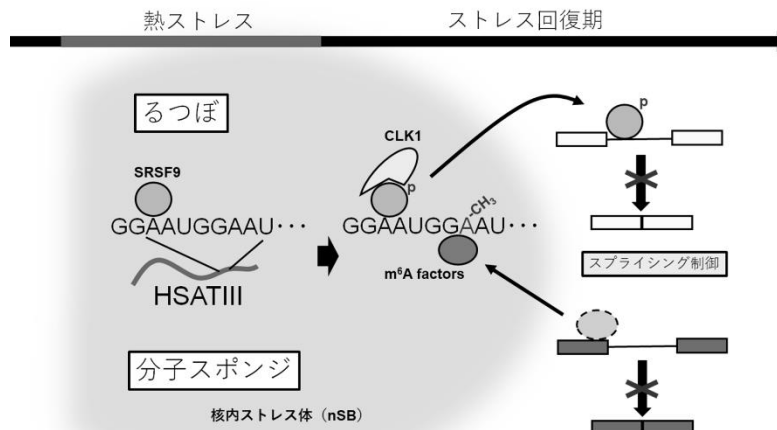
4. 研究成果

本研究課題の中で、まず、nSB がストレス回復期に 400 種類以上に及ぶ mRNA のスプライシングを主に抑制的に制御していること、また、その分子機序の一端として、nSB が SR 蛋白質の再リン酸化を促進する場として働くことを明らかにした。具体的には、スプライシング制御に関わる RNA 結合タンパク質ファミリーである SR タンパク質は熱ストレス下で脱リン酸化することが知られており、また、熱ストレス下では nSB に集積する。ストレス回復期にそれらを基質とするリン酸化酵素 CLK1 が nSB にリクルートされ、SR タンパク質群を効率的に再リン酸化することで、スプライシングが制御されるというものである。一方で、この機構だけでは、nSB によるスプライシング制御の全容を説明できないため、別の分子機構の存在が示唆された。

その機構の解明に向け、まず私達は、RNA の m⁶A 修飾関連蛋白質が nSB に集積しており、HSATIII

自身が m⁶A 修飾を受けていることを見出した。更に、前述の nSB 標的 mRNA の一部は、通常状態の細胞では、m⁶A 修飾によってスプライシングを促進されていた。そこで、HSATIII が m⁶A 因子群の標的となり、それらを核質から nSB に隔離することで、他の mRNA の m⁶A 修飾依存的なスプライシングを抑制している可能性を検証した。検証の結果、熱ストレス後の核質では、m⁶A 因子は nSB 領域の大きさに比例して減少していた。加えて、HSATIII をノックダウンし nSB の形成を阻害すると、m⁶A 因子の核質での量は回復し、更には、上記の nSB 標的 mRNA の m⁶A 修飾とそれに伴うスプライシングが促進された。二つの機構は、基本的にそれぞれ独立した標的 RNA のスプライシングを制御しているが、一部の標的 RNA は両方の機構で二重に制御されていることも明らかになった。

以上より、HSATIII は単純なリピート RNA でありながら、SR 蛋白質の再リン酸化を促進する “reaction crucible” (るつぼ) の特性と、m⁶A 因子を隔離する “molecular sponge” (分子スポンジ) の特性を併せ持ち、nSB はこの両方の機構を併用してストレス回復期のスプライシングを効率的に制御することが分かった (下図)。また、HSATIII lncRNA が熱ストレス回復期におけるヒト特有のスプライシング変動パターンを規定していることを見出した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ninomiya Kensuke, Iwakiri Junichi, Aly Mahmoud Khamis, Sakaguchi Yuriko, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Terai Goro, Asai Kiyoshi, Suzuki Tsutomu, Hirose Tetsuro	4. 巻 40
2. 論文標題 m6A modification of HSATIII lncRNAs regulates temperature dependent splicing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2021107976	査読の有無 無
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 Shibata Tomonori, Nagano Konami, Ueyama Morio, Ninomiya Kensuke, Hirose Tetsuro, Nagai Yoshitaka, Ishikawa Kinya, Kawai Gota, Nakatani Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Small molecule targeting r(UGGAA)n disrupts RNA foci and alleviates disease phenotype in Drosophila model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20487-4	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 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 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 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, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Iwakiri Junichi, Terai Goro, Asai Kiyoshi, Hirose Tetsuro	4. 巻 39
2. 論文標題 Lnc <scp>RNA</scp> dependent nuclear stress bodies promote intron retention through <scp>SR</scp> protein phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 二宮賢介, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAの細胞質における動態と分子機能
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮賢介, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 霊長類特異的なHSAT111 lncRNAの細胞質における新規分子機能
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮賢介, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 The novel molecular function of HSAT111 lncRNAs in cytoplasm
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 HSAT111 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 フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAによる2つのスプライシング制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAによる2つのスプライシング制御機構
3. 学会等名 第5回北大部局間横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAによる2つのスプライシング制御機構
3. 学会等名 2019年度 北海道大学共同利用・共同研究拠点アライアンス部局横断シンポジウム「計算科学が拓く汎分野研究」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAによる2つのスプライシング制御機構
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮賢介
2. 発表標題 核内ストレス体による2つのスプライシング制御機構
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 二宮賢介 廣瀬哲郎 (分担執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学工業社	5. 総ページ数 86
3. 書名 「化学工業」2020年4月号 「注目される最先端相分離研究」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪大学プレスリリース 霊長類細胞は二刀流で熱ストレスに対処する https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_results/papers/detail/1025</p> <p>北海道大学プレスリリース ノンコーディングRNA構造体nSBの新機能を発見～温度を感知したリン酸化反応の「るつぼ」として働く～ https://www.hokudai.ac.jp/news/2019/12/rnansb.html</p>
--

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
---------	---------