

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19293

研究課題名（和文）ノンコーディングからコーディングRNAへの機能転換機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of functional conversion from noncoding to coding RNAs

研究代表者

廣瀬 哲郎（Hirose, Tetsuro）

大阪大学・大学院生命機能研究科・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）：細胞核内で確固としたlncRNA機能を持つHSATIII RNAが、温度変化の時系列に沿って細胞質に局在変化し、mRNAに機能転換する過程を解析した。RNA核外輸送については、時間経過に伴ってHSATIII RNA結合タンパク質が再構築され、核外輸送因子ALY/REFが結合することを見出した。この再構築はHSATIIIの「るつぼ」や「スポンジ」機能によって促進されることが示唆された。次に、翻訳産物のHSATIIIポリペプチドの相互作用因子としてストレス顆粒因子やシャペロンを検出した。さらに翻訳産物がこれらの相互作用因子と共に細胞先端部分のアクチン重合部位に共局在することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、核から細胞質へのRNAの局在変化機構について、相分離構造体でのRNA機能が結合因子の再構築を促し、結果的に核外輸送因子を呼び込んでRNAを細胞質に輸送させるという流れが明らかになった。一方で、細胞質での翻訳産物の相互作用因子と細胞内局在が明らかになったことによって、機能転換したmRNAが機能的なポリペプチドを産生していることが示唆された。これによって、lncRNAからmRNAへの機能変換の全体像を把握し、前例のないRNAの複雑な一生を明らかにする道筋を整備できた。今後、このポリペプチド機能の解明によって、ストレス応答や関係する疾患の新たな機構解明につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the process by which HSATIII RNAs, which possess definitive lncRNA functions within the cell nucleus, relocate to the cytoplasm and convert its function to mRNA in response to thermal stress and recovery. Regarding the nuclear export of HSATIII RNA, we found that HSATIII RNA-binding proteins are remodeled and eventually the nuclear export factor ALY/REF binds to HSATIII RNA. This reassembly is promoted by the 'crucible' or 'sponge' functions of HSATIII. Next, stress granule factors and chaperones were detected as interactors of the HSATIII translation products. Furthermore, we confirmed that the translation products co-localize with these interactors at actin polymerization sites at the cell periphery.

研究分野：分子生物学

キーワード：long noncoding RNA mRNA 核外輸送 サテライトDNA 相分離

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムが産生している数万種類もの lncRNA は、塩基配列を基に情報学的に分類されたものである。最近その中に短いペプチドをコードする mRNA が混在していることが示され、各 RNA の素性決定の難しさが再認識された。そんな中で申請者は、細胞核内での確固とした lncRNA 機能を持つ HSATIII RNA が、温度変化の時系列に沿って核から細胞質に局在を変化し、ペプチドを産生する mRNA に機能転換する現象を見出した(図1)。本研究では、この lncRNA から mRNA への機能転換機構とその意義の解明を目指す。申請者は、これまでに巨大な相分離構造体の骨格として働く Architectural lncRNA を発見し、その作用機構の研究を展開してきた。熱ストレスで発現誘導される HSATIII lncRNA は、核内ストレス体 (nSB) という相分離構造体の骨格として構造構築を先導し、ストレス除去後の回復初期に 500 種類もの mRNA の温度依存的スプライシングを制御している。この確固とした lncRNA 機能に加えて、ストレス回復の時間経過に沿って、当初核内の nSB に限局していた HSATIII が細胞質に移行して周縁部に別の RNA 顆粒を形成することを見出した。それに伴って、HSATIII は翻訳され、ユニークなリピート配列ペプチドを産生することが明らかになった。つまり HSATIII は、温度変化の時系列に沿って、核内 lncRNA から細胞質 mRNA へと劇的な機能転換を果たすことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、この核内 lncRNA から細胞質 mRNA への機能転換の要となる HSATIII RNA の核から細胞質への局在変化の分子機構を明らかにし、それが温度変化と時間経過によってどのように制御されているかを明らかにする。さらに周縁部で RNP 顆粒を形成している HSATIII がどのように翻訳され、また翻訳産物ペプチドがどのような機能を果たしているかを明らかにする。こうした RNA の機能転換機構の理解を通して、細胞内 RNA の素性決定法を再構築することに挑戦する。

3. 研究の方法

3-1. HSATIII lncRNA の核から細胞質への局在変化機構の解析

HSATIII lncRNA は、熱ストレス(42°C)に応答して発現し、まず核内に nSB を形成する。その後、ストレス除去後の回復初期(1時間)には、nSB は特異的キナーゼを取り込んで構成因子のリン酸化を促進し、温度依存的スプライシングを制御する。さらに回復 4 時間後になると、HSATIII は細胞質の周縁部に別の RNP 顆粒を形成する。そこで、本研究では回復期 1~4 時間に HSATIII が核から細胞質に移行する機構を明らかにする。この機構は、HSATIII RNP 複合体のリモデリングによると考えられる。そこで、申請者が同定した HSATIII の核内での相互作用因子 (SAFB) と細胞質での相互作用因子 (PURA) に注目して、それらの因子が入れ替わる機構を解析する。さらに温度と時間経過が及ぼす影響を解明する。

3-2. HSATIII RNA の翻訳機構と翻訳産物の機能解析

細胞質に移行した HSATIII は、RNP 顆粒として微小管上を周縁部に向けて輸送される。この時、細胞を微小管重合阻害剤で処理すると周縁部への RNP 顆粒の蓄積が阻害される。そこでこの周縁部への輸送が HSATIII の翻訳に必要なかどうかを、HSATIII 翻訳産物ペプチドに対する抗体(作成済)を用いて、局在と共役した翻訳機構を解析する。さらに翻訳産物のユニークなリピート配列ペプチドの機能について、神経芽腫細胞突起をモデル系にして過剰発現による細胞形態変化などを解析し、HSATIII が翻訳される意義を解明する。

4. 研究成果

霊長類細胞の核内で確固とした lncRNA 機能を持つ HSATIII RNA が、温度変化の時系列に沿って核から細胞質に局在を変化させ、mRNA に機能転換するという実施者のオリジナルな発見について、その過程の詳細な解析を実施した。

4-1. HSATIII RNA の翻訳に関する多面的検証

これまでに HSATIII が熱ストレス回復後期になると核から細胞質に移行して HERALD と命名した RNA 顆粒を合成すること、それに伴って翻訳される可能性が示された。さらにストレス回復期の時間経過と共に、細胞質の HSATIII 構造体の数が増加し、それに伴って翻訳産物が検出されるようになることを観察した。本研究では、まずこれまでに作成していた HSATIII ポリペプチドに対する抗体を用いて、HSATIII ポリペプチドがストレス回復後期に特異的に合成されることを再確認した。さらに回復期にてシクロヘキシミドによる翻訳阻害によってその合成が損なわれること、さらに HSATIII の KD によっても合成が損なわれることを明らかにした。

さらに東京大学医科学研究の稲田利文教授との共同で熱ストレス回復後期の細胞からポリソーム画分を調整し、その画分に HSATIII RNA が検出されることを RT-PCR によって検出した。これらの結果から、熱ストレス回復後期に細胞質に輸送された HSATIII RNA が翻訳されてリピートアミノ酸配列からなるポリペプチドを合成していることが確認できるデータとして示すことができた。

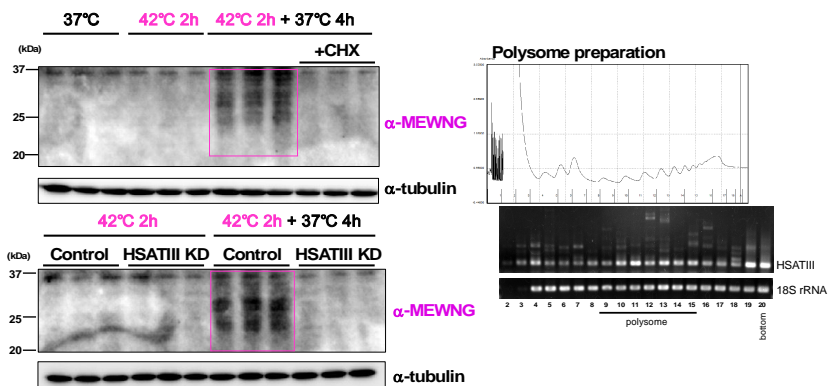


図 1. HSATIII RNA の翻訳の多面的検証
左：ウェスタンブロットによる HSATIII ポリペプチドの検出、CHX (上) と HSATIII KD (下) の効果を示す。右：ポリソーム画分における HSATIII RNA の検出

4-2. HSATIII RNA の核外輸送機構

核内で nSB を形成している HSATIII RNA が細胞質に輸送されて別の構造体を形成され、さらに翻訳されるまでの過程で、この RNA に結合するタンパク質の多くが入れ替わる RNP 再構築が起こることが分かった。HSATIII は nSB で SAFB, SRSF など数多くのタンパク質と結合しているが、熱ストレス回復期の時間経過に沿って、一部の RNA の結合タンパク質が PURA, PUB のような別の RNA 結合タンパク質に入れ替わる。特に回復期の時間経過に伴って核内ストレス体(nSB)に核外輸送因子のアダプターである ALY/REF が局在するようになることを見出した。

ALY/REF の HSATIII への結合は、nSB の主要構成因子の SAFB によって阻害されており、SAFB のノックダウンによって ALY/REF の結合が著しく増大することを見出した。さらに興味深いことに、nSB の核内機能である SRSF のリン酸化の「るつぼ」や RNA の m⁶A 化リーダー因子の「スポンジ」の機能を阻害剤を用いて阻害すると、HSATIII の核外輸送が著しく阻害されることも明らかになった。このことから回復期初期の nSB 機能によって HSATIII の RNP リモデリングが誘発され、その結果 ALY/REF の結合が促進されて、HSATIII の一部が細胞質に輸送される可能性が示された。

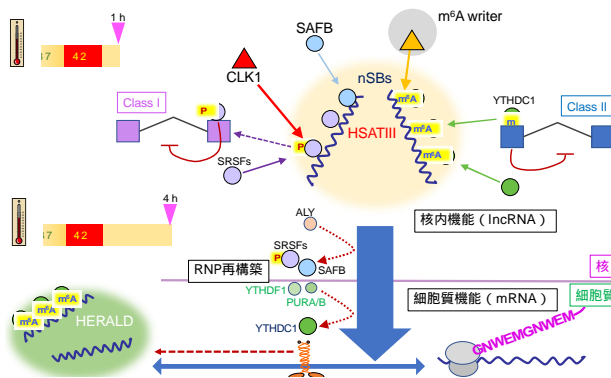


図 2. HSATIII RNA 結合タンパク質の再構築と核外輸送への誘導機構モデル

4-3. HSATIII ポリペプチドの機能解析

HSATIII 翻訳産物の機能を明らかにすることを目的に、このポリペプチドに関する基盤情報を収集した。まず核と細胞質への細胞画分によって、多くの HSATIII ポリペプチドは核と細胞質の両方に局在しており、核への存在量が多いことを明らかにした。さらに人工的にデザインした HSATIII ポリペプチドを発現するプラスミドに Flag タグをつけたものを細胞内で発現させたところ、こちらにも主に核内と細胞質の辺縁部に局在することを確認した。次に HSATIII ペプチドの免疫沈降と質量分析によって、相互作用因子として多くの RNA 結合タンパク質を同定した。国立がんセンター研究所の足達俊吾博士との共同で HSATIII ポリペプチドの相互作用因子を免疫共沈降や TURBO-ID 法によって検出したところ、ストレス顆粒 RNA 結合タンパク質やシャペロンが検出された。さらに、プラスミド由来の HSATIII リピートペプチドの翻訳産物の細胞内局在を検出したところ、細胞先端部分や核内に局在することが確認された。特に、細胞先端部分のアクチン骨格重合部位で強く検出され、相互作用因子の RNA 結合タンパク質とともにそこで RNP 複合体を形成していることが示された。これらの基盤情報をもとに、今後 HSATIII の翻訳の意義を解明するための足がかりができた。

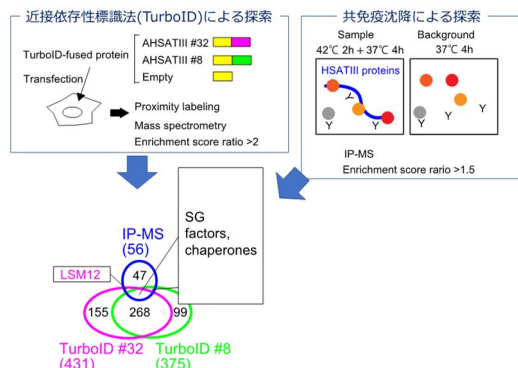


図 3. HSATIII 翻訳産物の相互作用因子の探索

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6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 Obuse Chikashi, Hirose Tetsuro	4. 巻 85
2. 論文標題 Functional domains of nuclear long noncoding RNAs: Insights into gene regulation and intracellular architecture	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 102250 ~ 102250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2023.102250	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, Yamazaki Tomohiro, Hirose Tetsuro	4. 巻 42
2. 論文標題 Satellite RNAs: emerging players in subnuclear architecture and gene regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e114331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2023114331	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 Hirose Tetsuro, Ninomiya Kensuke, Nakagawa Shinichi, Yamazaki Tomohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 288 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-022-00558-8	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 Takakuwa Hiro, Yamazaki Tomohiro, Souquere Sylvie, Adachi Shungo, Yoshino Hyura, Fujiwara Naoko, Yamamoto Tetsuya, Natsume Tohru, Nakagawa Shinichi, Pierron Gerard, Hirose Tetsuro	4. 巻 25
2. 論文標題 Shell protein composition specified by the lncRNA NEAT1 domains dictates the formation of paraspeckles as distinct membraneless organelles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1664 ~ 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-023-01254-1	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 Iwakiri Junichi, Tanaka Kumiko, Chujo Takeshi, Takakuwa Hiro, Yamazaki Tomohiro, Terai Goro, Asai Kiyoshi, Hirose Tetsuro	4. 巻 29
2. 論文標題 Remarkable improvement in detection of readthrough downstream-of-gene transcripts by semi-extractable RNA-sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 170 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079469.122	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 Hirose Tetsuro, Ninomiya Kensuke, Nakagawa Shinichi, Yamazaki Tomohiro	4. 巻 24
2. 論文標題 A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	6. 最初と最後の頁 288 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41580-022-00558-8	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 Mattick John S., Amaral Paulo P., Carninci Piero, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Molecular Cell Biology	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) 10.1038/s41580-022-00566-8	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 該当する

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 11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構築と機能制御
3. 学会等名 The 3rd Kansai RNA Club (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 非コードRNAによる総分離構造体の構築と機能制御
3. 学会等名 第2回タンパク質シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 二宮賢介, 足達俊吾, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 Short-tandem repeat型RNAであるHSATIIIの多彩な分子機能
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kensuke Ninomiya, Shungo Adachi, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Characterization and functional analysis of HSATIII-derived repetitive proteins
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tetsuro HIROSE
2. 発表標題 Exploring the Role of Architectural Long Noncoding RNAs in Shaping and Regulating Phase-Separated Cellular bodies
3. 学会等名 50 Years Shine-Dalgarno Symposium (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Construction mechanism of nuclear paraspeckle as an isolated RNP micell
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposia: Cellular Mechanisms Driven by Liquid Phase Separation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms of Intracellular Organization and Gene Expression by Noncoding RNAs
3. 学会等名 千里ライフサイエンス振興財団セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kensuke Ninomiya, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 The dynamics and functions of cytoplasmic HSATIII lncRNAs
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsuyoshi Ueno, Shungo Adachi, Kensuke Ninomiya, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Searching for regulatory proteins for temperature-dependent recruitment of CLK1 to nuclear stress bodies
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manami Kakuno, Kensuke Ninomiya, Junichi Iwakiri, Kiyoshi Asai, Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Combinations of repeat sequences in HSATIII lncRNAs dictate nSB subclasses
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 Regulatory Mechanisms of Intracellular Organization by Noncoding RNAs
3. 学会等名 RNAインフォマティクス道場（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬哲郎
2. 発表標題 Regulatory mechanisms of intracellular organization and gene expression by noncoding RNAs
3. 学会等名 立命館大国際稀少疾患シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬 哲郎, 高桑 央, 山本 哲也, 山崎 智弘
2. 発表標題 Construction mechanism of nuclear paraspeckle as an isolated RNP micell
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 剛志, 足達 俊吾, 二宮 賢介, 廣瀬 哲郎
2. 発表標題 CLK1の温度依存的な核内ストレス体への リクルートを担う制御タンパク質の同定
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角野 愛美, 二宮 賢介, 岩切 淳一, 松田優一, 浅井 潔, 廣瀬 哲郎
2. 発表標題 HSAT111 lncRNAのリピート配列パターン抽出による 核内ストレス体の再構成の試み
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Intracellular Architecture by Noncoding RNAs
3. 学会等名 Academia Sinica IBMS seminar (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬哲郎, 山崎智弘, 二宮賢介
2. 発表標題 非コードRNAを足場に形成される核内相分離構造体におけるRNA結合タンパク質の役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩田瑞季, 山崎智弘, 上野 剛志, 二宮賢介, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 構成的手法を用いた核内ストレス体の形成機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二宮賢介, 足達俊吾, 廣瀬哲郎
2. 発表標題 The multifunctionality of HSATIII lncRNAs and its control mechanisms
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 剛志, 足達 俊吾, 二宮 賢介, 廣瀬 哲郎
2. 発表標題 CLK1の温度依存的な核内ストレス体へのリクルートを担う 制御タンパク質の同定と解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角野 愛美, 二宮 賢介, 岩切 淳一, 浅井 潔, 廣瀬 哲郎
2. 発表標題 ヒトゲノム完全配列から読み解くHSATIII lncRNAの配列パターン抽出とその人工化による核内ストレス体再構成の試み
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tetsuro Hirose
2. 発表標題 Microphase Separation and Paraspeckles
3. 学会等名 Keystone Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 318
3. 書名 Phase separation in living cells : benefits and risks	

1. 著者名 二宮賢介, 廣瀬哲郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 細胞 2022年7月号 Architectural RNAと液 - 液相分離 (ArcRNAとストレス応答)	

1. 著者名 廣瀬哲郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 62
3. 書名 細胞 2022年7月号 Architectural RNAと液 - 液相分離 (総論 細胞内構造の足場としてのRNAの役割)	

1. 著者名 廣瀬哲郎, 山崎智弘, 山本哲也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 264
3. 書名 セントラルドグマの新常識 (第3章 RNAの新常識 6. 細胞内構造体の骨格として働くRNA)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
フランス	CNRS			
オーストラリア	Univ. Western Australia			