

## ゲノムの暗黒物質ノンコーディングRNAの機能探索



研究室紹介

廣瀬 哲郎\*

Functional exploration of noncoding RNAs as genomic dark matter

Key Words : human genome, noncoding RNA, intracellular phase separation

### はじめに

ヒトゲノムは、約30億塩基対からなるDNA分子で、ヒトの一生の活動のための遺伝情報が書き込まれています。この遺伝情報とは、体を作り、生体反応を触媒するタンパク質を発現するための情報と考えられてきました。しかしヒトゲノム中のタンパク質情報をコードしている領域は、全体のたった2%にすぎません。そして残りの98%は、意味をなさないジャンクな領域と考えられていました。21世紀に入り、ゲノムのどの領域から情報が発現しているのかを網羅的に調べるポストゲノム解析が行われた結果、驚くべきことに、ヒトゲノムの75%もの領域から数万種類にも及ぶタンパク質をコードしない正体不明のRNAが合成されていることが明らかにされました。これらが“ノンコーディングRNA (ncRNA)”です。ncRNAの発見は、それまでタンパク質の発現だけに限られていたゲノム機能の概念を大きく変えました。そして、これまで細胞内に存在していたのにも関わらず、研究者の目に留まることのなかったncRNAは、“ゲノムの暗黒物質”と呼ばれるようになり、俄然その機能に注目が集まることになりました。私たちの研究室では、これらの暗黒物質の存在が確認された2005年頃から、ncRNAの機能を対象とした基礎研究を開始しました。そこで本稿では、これまで私たちの研究室が明

らかにしたncRNAの新機能についてご紹介します。

### ノンコーディングRNAの遺伝暗号

ncRNAは、RNA自身が活性を持って機能します。それでは、ncRNAの機能に関する情報はどのようにRNA配列の中に書き込まれているのでしょうか。タンパク質を発現するための遺伝暗号は、地球上に生きる全ての生物で共通です。しかしタンパク質をコードしないncRNAの働きを規定する遺伝暗号は、全く別に存在するはずで、私たちの研究室の目標は、ncRNAのための新規遺伝暗号を解読することです。ncRNAは、細胞内で裸で存在するのではなく、必ずパートナーのRNA結合タンパク質 (RBP) と結合してRNP複合体として機能しています。このRNP複合体こそが、ncRNAが決まった機能を果たすための作動装置です (図1)。機能的なncRNAの作動装置を形成するためには、決まったパートナーのRBPがncRNA配列を読み取って結合し、機能的なRNP複合体を形成していく必要があります。

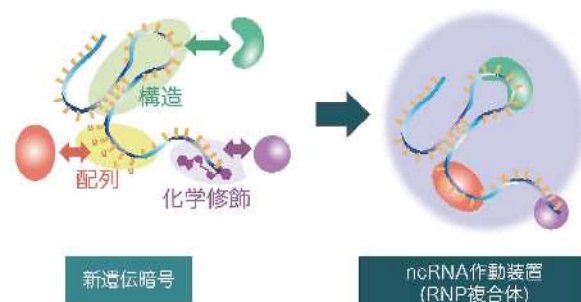


図1. ncRNA作動装置は、ncRNA配列の新遺伝暗号を認識して結合するRBPと共に形成される。



\* Tetsuro HIROSE

1969年1月生まれ  
名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻 博士後期課程中退 (1995年)  
現在、大阪大学 大学院生命機能研究科 細胞ネットワーク講座 RNA生体機能研究室 教授 理学博士  
専門/分子生物学  
TEL : 06-6879-4674  
FAX : 06-6879-7965  
E-mail : hirose@fbs.osaka-u.ac.jp

つまりこれらのRBPが認識しているncRNA配列や構造こそがncRNA機能を規定している遺伝暗号に相当すると考えられます。このようなコンセプトのもとで、ncRNAの遺伝暗号を解読するために、

その対象となる確固とした機能を有する ncRNA を探索した結果、NEAT1 という細胞核内のパラスペックルという機能未知な構造体に特異的に局在する ncRNA に行き当たりました (図 2)。

### ノンコーディング RNA のアーキテクチャル機能

パラスペックルの中で NEAT1 ncRNA がどのような機能を果たしているのかを明らかにするために、その機能阻害を試みました。アンチセンス核酸を核内に導入して標的の NEAT1 を特異的に分解する系を新たに確立し、NEAT1 を細胞から除去することに成功しました。その結果、NEAT1 の除去に伴ってパラスペックル構造体が崩壊することが明らかになりました。つまり NEAT1 はパラスペックル構造体形成に必須だったわけです。それまで細胞内構造は、タンパク質が基盤となっていることが常識でしたが、この発見によって「RNA を基盤とした構造体」の存在が明らかになりました。そこで私たちは、この新しい機能を持つ ncRNA を Architectural RNA (arcRNA) と命名しました。

さて arcRNA は、どのように核内構造体を組み立てることができるのでしょうか？ NEAT1 は多数の RBP と共にパラスペックルを形成します。電子顕微鏡や超解像顕微鏡による詳細な観察の結果、パラスペックルは平均直径 360nm の巨大複合体で、Shell と Core の 2 つの層からなる秩序立った構造であることが明らかになりました (図 2)。パラスペックル構造体には、RNA だけでなく数多くのタンパク質因子も含まれています。私たちは、パラスペックルとの共局在スクリーニングによって、40 種類ものパラスペックルタンパク質 (PSP) を同定した。同定された PSP のアミノ酸配列を検討したところ、ほとんどの PSP は、RBP の特徴を持っており、さらにアミノ酸組成が著しく偏った天然変性領域 (IDR) を同時に持っていました。これらの PSP を個別に機能阻害した結果、パラスペックル形成に必須な 7 種類の RBP を同定しました。必須 PSP は、1. NEAT1 を安定化するもの (カテゴリー 1A)、2. NEAT1 量には影響せずパラスペックル会合を促進するもの (カテゴリー 1B) の 2 つに分かれることがわかりました。さらに、必須 PSP と共通して相互作用する SWI/SNF クロマチン再構築複合体も会合ステップに必須であることがわかりま

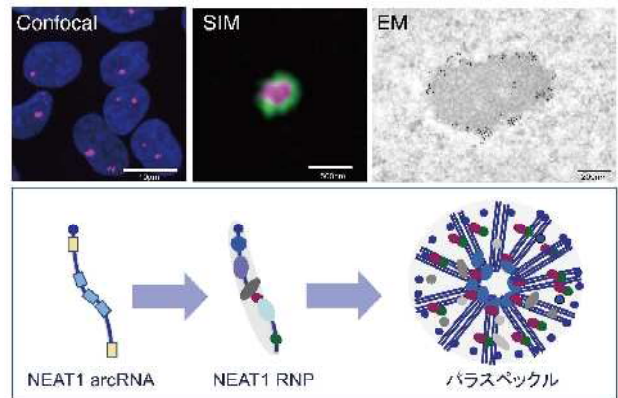


図 2. NEAT1 の RNA ドメインによるパラスペックル形成過程 (上図) とパラスペックルの 3 種類の顕微鏡像

した。こうしてパラスペックルの形成は、NEAT1 arcRNA が RNA ポリメラーゼ II によって転写されると、そのクロマチン座位近傍にカテゴリー 1A PSP によって NEAT1 が安定化され、NEAT1 RNP を形成され、次にカテゴリー 1B PSP と SWI/SNF 複合体によって 50 個もの NEAT1 RNP が集められて巨大なパラスペックル構造体へと会合することがわかりました (図 2)。

一方で、NEAT1 arcRNA 自体の役割は依然として不明でした。特に RNA 配列のどの部分が機能しているのか皆目見当が付きませんでした。そこで、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を取り入れて、一倍体ヒト培養細胞で NEAT1 の領域を網羅的に部分欠失させる変異解析を行い、NEAT1 中のパラスペックル形成に必要な領域を複数同定しました。その結果、5' 末端と 3' 末端に NEAT1 を安定化する領域があり、中央領域にパラスペックルの会合に必要な領域があることがわかり、これによって上記 2 つの形成ステップを arcRNA 領域に落とし込むことに成功しました。これによって arcRNA は、タンパク質と同様に複数の機能ドメインからなるモジュール構造をとっており、その領域に対応した PSP が結合してパラスペックル形成に至るといった道筋が見えてきました。

### ノンコーディング RNA と細胞内相分離

パラスペックル形成の道筋が見えてきた頃、細胞生物学の分野で、液-液相分離 (LLPS) という物理現象が膜を持たない細胞内構造体 (非膜性構造体) の形成の原動力になっていることが報告されました。

パラスペクル内の PSP はダイナミックな動態を示し、さらに相分離構造体を共通して解離させる 1,6-ヘキサジオールによってパラスペクルが脱会合することからパラスペクルも相分離した構造体であり、NEAT1 には IDR タンパク質を集約することによって相分離を誘発し、巨大なパラスペクル構造を構築していることが示唆されました。つまり、arcRNA 機能の本質とは、相分離の誘発にあることがわかってきました (図 3)。

細胞内には相分離によって形成される多くの非膜性構造体が存在しています。それではこれらの構造体は、何のために相分離を介して形成されるのでしょうか？ 私たちはパラスペクルが NEAT1 の発現上昇に応じて伸長し、核質からより多くの PSP を吸い込み、PSP の標的遺伝子発現を抑制するこ

とを見出し、これを「スポンジ機能」と名付けました。一方で、パラスペクルとは別の非膜性構造体である核内ストレス体 (nSB) は、温度変化に応答した特異的 RBP のリン酸化反応の反応場として働き、RNA スプライシングを制御していることを見出し、これを「反応るつぼ機能」と名付けました。こうしたことから、細胞内で相分離によって非膜性構造体を形成する意義は、スポンジ機能によって外界から制御因子を係留したり、反応るつぼ機能によって特異的な生化学反応を効率よく行うための隔離空間の形成であることがわかってきました (図 3)。今後、さらなる新たな機能が明らかになる可能性があります。

### おわりに

私たちの研究室では、21 世紀に現れた ncRNA の機能解析を通してゲノム機能の新しい概念とその規則性を確立することを目指してきました。私たちオリジナルな arcRNA 機能は、細胞内相分離現象との融合という予期せぬ展開を迎え、現在の細胞生物学のホットトピックスとして注目を集めています。arcRNA は、細胞内での制御機能に加え、癌や神経変性疾患といった疾患の病態に重要な機能を果たしていることが報告されています。特に相分離現象を標的とした創薬開発は今後の注目すべき課題です。一方で、私たちの独自の次世代シーケンスを用いた解析によって、数多くの arcRNA 候補がヒトゲノムから産生されていることも見つかり、今後のさらなる研究によって、新たな細胞内制御機構の解明だけでなく、RNA や相分離現象を標的とした新しい創薬基盤の開発につながることを期待できます。RNA には、太古の RNA ワールドの時代から受け継いだ遺伝情報の格納、反応触媒としての機能が知られていましたが、私たちの研究は、新たに構造構築という機能を付け加えたと言えます。今後のさらなる RNA の秘めた力が明らかになることを期待しています。

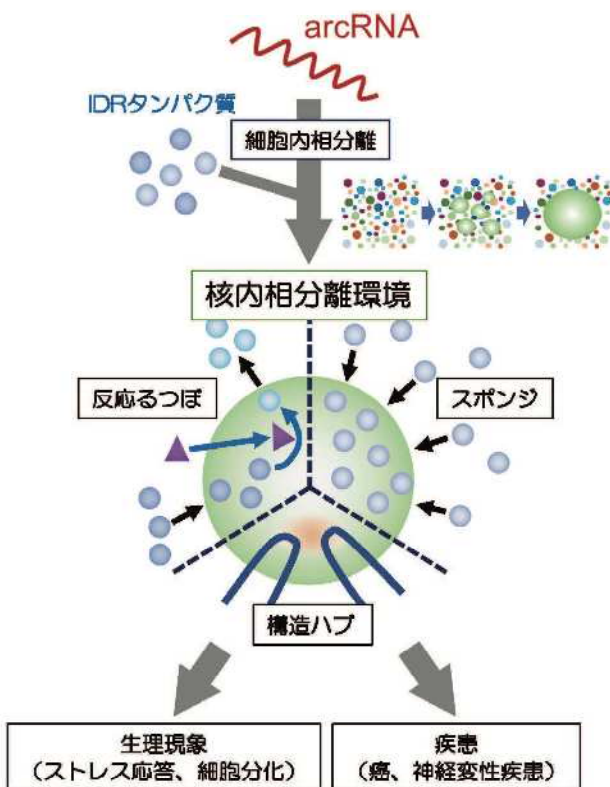


図 3. arcRNA の機能モデル IDR タンパク質を集約して相分離を誘発する。形成された構造体は、るつぼ、スポンジ、構造ハブといった機能を担う。