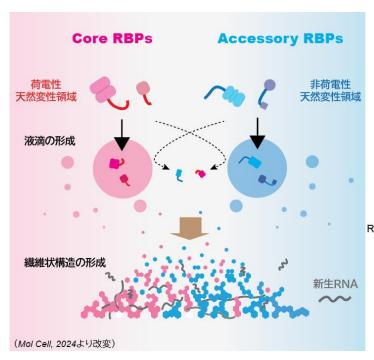
# RNA 代謝を司る新規核内構造を同定

~RNA 結合タンパク質の混合・分離ダイナミクスが産み出す網目構造が スプライシングを駆動する~

# 【ポイント】

- RNA 代謝(※1)を担う RNA 結合タンパク質(RBP)群が核内で構築する基本構造を同定しました。
- これら RBP は、性質の異なる蛋白領域を持つことで水と油のように分離した液滴を形成し、 さらに RNA と一体化することで繊維状となって網目構造を細胞核内に広げます。
- 各 RBP 網目構造は、新生 RNA 上の空間占有をめぐって競合することで、スプライシング(※ 2)をはじめとする RNA 代謝を駆動します。
- ALS をはじめとする神経変性疾患の病原変異は、RBP の天然変性領域(IDR)(※3)に集積しています。本研究で、IDR 変異がもたらす網目構造の乱れと異常スプライシングの関係を明らかにしました。



RBP網目構造を広げている 核

細胞核内で、絡み合うも混和しない

RNA上での RBP網目繊維の空間占有をめぐる競合が スプライシングを駆動する

# 【要旨】

名古屋大学大学院医学系研究科 神経遺伝情報学の 増田章男(ますだあきお)准教授らの研究グループは、RNA 結合タンパク質(RBP)が形成する核内全体に広がる網目構造が、RNA スプライシングを駆動していることを発見しました。

ヒトを含む真核生物では、核内でスプライシングに代表される RNA 代謝を行うことで、限られた遺伝情報から種々の mRNA を作り出し、生命活動に必須な蛋白の多様性を生み出しています。スプライシングは、RBP を中心に数百個の分子が共同して進める複雑なステップですが、その時空間的な分子制御の詳細は未解明でした。

今回、超解像顕微鏡(※4)による細胞の精細観察により、スプライシングを直接に担う RBP 群(core RBP)とその活性を調節して間接的にスプライシングを制御する RBP 群 (accessory RBP)が、核内で混ざり合うことなく絡み合う網目状の構造を構築していることを発見しました。Core RBP と accessory RBP は、それぞれ荷電性と非荷電性という異なる性質の天然変性領域(IDR)を持っており、その液一液相分離活性を介して互いに混和しない液滴を形成します。細胞核内では、さらに新生 RNA に結合することで繊維状構造をとります。この RBP 繊維が新生 RNA 上の空間占有をめぐって競合し、各局所で優位となった RBP 群がそれぞれの機能を発揮することで、スプライシングを駆動することを解明しました。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)をはじめとする神経変性疾患の病原変異は、RBP の IDR に集積していることが知られています。本研究で、IDR 変異が網目構造を乱すことや、人為的な網目構造の改変が神経変性疾患に関わる異常スプライシングを引き起こすことを明らかにしています。

本研究では、核内網目構造による RNA スプライシング駆動という新規分子機構解明を基に、RNA 代謝異常が関与する疾患の病態解明と治療に寄与することが期待されます。

本研究成果は、「Molecular Cell」(2024年7月24日付電子版)に掲載されました。

#### 1. 背景

遺伝情報は DNA から mRNA を経て、さらに蛋白へと流れていきます。我々ヒトを含む真核生物は、細胞核内で mRNA に様々な編集や修飾を加えることで種類を増やし、限られた遺伝情報から多様な機能性蛋白を作り出しています。中でも、RNA スプライシングは数百の分子からなる巨大な分子装置 スプライソソームによって触媒される複雑なイベントで、この蛋白多様性の創出に中心的な役割を果たしています。スプライソソームを構成する RNA 結合タンパク(RBP)は明らかになってきましたが、これらの RBP が、どのようにして必要な時に必要な RNA 部位に集合して、その活性を発揮しているのか、大きな謎を残したままでした。

#### 2. 研究成果

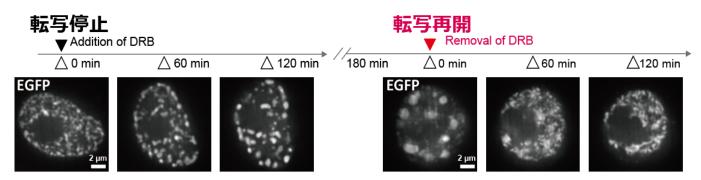
従来の光学顕微鏡を大幅に上回る空間分解能を持つ超解像顕微鏡を用いて、ヒトとマウスの細胞内での RBP 分布を高解像に観察したところ、スプライソソームの中核構成 RBP(core RBP) と、その活性を調節して間接的にスプライシングを制御する RBP 群(accessory RBP)が、核内で混ざり合うことなく絡み合う網目構造を広げていることを発見しました(図 1)。この RBP 網目構造は、調べた限りほぼ全ての RBP が、ヒト/マウスの諸組織で展開する、普遍的に観察される構造です。

# Core RBP (SF3B1) Accessory RBP (U2AF2) Merge 200 nm Neuron, human adult brain (60Y, Female, Frontal lobe) N2A, mouse neuroblastoma cells

【図 1】 ヒトやマウスの細胞核内で観察された、RNA結合タンパク質 (RBP) が構築する網目構造

超解像顕微鏡で観察されたヒト脳組織(左モノクロ写真)や培養細胞(右カラー写真)の核内に広がるRBPの網目構造。 Core RBPとaccessory RBPは、それぞれ別の網目構造を構築しており、混和することなく密接に絡み合っていた。 網目の孔サイズは、200 nm 程度(50-500 nm)と通常の光学顕微鏡で確認し難い小ささである。

RBP 網目構造は、転写と密接な関係があり、細胞内の転写を強制的に停止させると網目構造は融合して大きな液滴様に変化し、転写再開により再び網目構造に戻ります(図 2)。また、特に core RBP の網目構造が、新生 RNA の分布と一致しています。新生 RNA と RBP との緊密な連携が網目構造を創出しています。

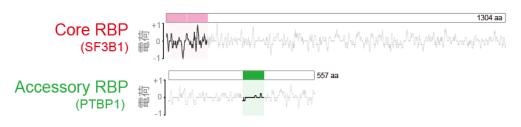


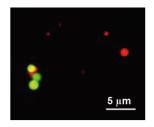
【図 2】 転写依存的なRBP網目構造の構築

EGFPタグが付いたMATR3(accessory RBPの一つ)を、HEK細胞に過剰発現させ、live imagingにより網目構造の変化を経時的に追跡した。転写阻害剤DRB添加により転写停止させると、網目構造は液滴様になっていく。DRB除去により転写を再開させると、再び網目構造が回復した。(Mol Cell, 2024より改変)

*In silico*でのアミノ酸配列のクラスター解析により、core RBP と accessory RBP には、それぞれ荷電性の天然変性領域(IDR)、非荷電性の IDR を持つ特徴が見出されました。

精製したリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 実験や IDR 領域発現ベクターを用いた細胞実験により、core RBP と accessory RBP が、荷電性 IDR と非荷電性 IDR 間の相分離を介して、互いに混和不能な液滴を形成することが確認されました。(図3)

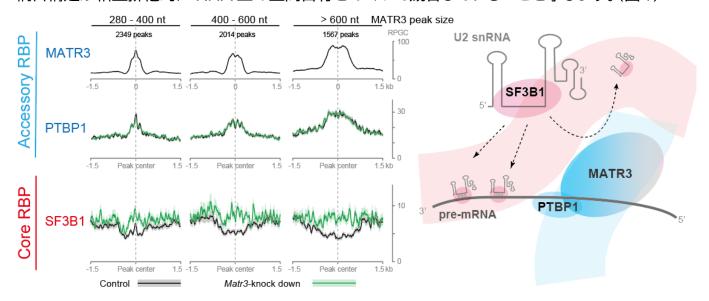




#### 【図3】 荷電性IDRと非荷電性IDRは、分離した分画を形成する

- (左図) Core RBPとaccessory RBPのアミノ酸電荷の様子。各RBPの全長図を示す。色のついた領域がIDR。 Core RBP (SF3B1)が著しく荷電したIDRを持つのに対し、accessory RBP (PTBP1) は、ほぼ無電荷のIDRを持つ。
- (右図) mCherry (SF3B1)、EGFP (PTBP1) tagを付けた各IDRのリコンビナント蛋白を作製し、in vitroで液滴形成実験を行い、蛍光顕微鏡で観察した。両者は、混合しない液滴を形成した。 (Mol Cell, 2024より改変)

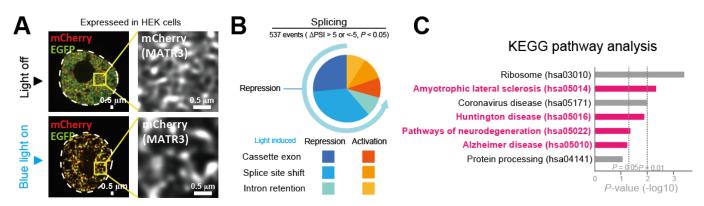
CLIP 法(※5)により、細胞内で core RBP と accessory RBP の RNA 結合の様子を解析しました。RNA 上の accessory RBP (MATR3) 集積領域では、core RBP (SF3B1) の集積が阻害されるが、別の accessory RBP (PTBP1) の集積は阻害されませんでした。また、 *Matr3*-knockdown でこの阻害は、回復しました。これは、core RBP と accessory RBP の網目構造が相互排他的に RNA 上の空間占有をめぐって競合していることを示します。(図4)



#### 【図 4】 Core RBPとaccessory RBPは、RNA上の空間占有をめぐって競合する

- (左図) CLIPによる、細胞内での core RBP (SF3B1) と accessory RBP (MATR3, PTBP1) のRNA結合の様子。MATR3ーRNA結合が顕著な領域を、その範囲に応じて3段階に分け、それらの領域におけるPTBP1と SF3B1のRNA結合の様子を示す。緑線は、Matr3-knockdown細胞、黒線はcontrol 細胞の結果。
- (右図) RBP網目構造がRNA上で競合する概念図。MATR3の網目があるRNA部位に、PTBP1の網目は共存できるが、SF3B1の網目は共存できない。 (Mol Cell, 2024より改変)

オプトジェネティクス(※6)の手法を用いて人為的に RBP 網目構造を粗雑化させた細胞で RNA-seq を行った結果、特に神経変性疾患に関連する遺伝子に異常スプライシングが認められました。また、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病原性変異(*MATR3*, S85C)をゲノムに導入した細胞で、網目構造の形成異常が確認されました。神経変性疾患に関連する遺伝子変異は、他の RBP でも IDR に集中して同定されています。RBP 遺伝子変異による網目構造の変化が異常スプライシングを引き起こすことで、疾患を発症させる可能性が示唆されます。(図5)



【図 5】 RBP網目構造の異常は、神経変性疾患に関わる異常スプライシングを引き起こす

- (A) オプトジェネティクスによる、光誘導性のaccessory RBP (MATR3) 網目構造の改変。 Blue light照射による凝集誘導により、MATR3の網目構造が著しく粗雑化した。
- (B) 網目粗雑化した細胞のRNA-seq解析結果。MATR3の基本機能であるスプライシング抑制が増強されていた。
- (C) スプライスが変化した遺伝子のGene ontology解析結果。神経変性疾患が優位に認められた (Mol Cell, 2024より改変)

# 3. 今後の展開

本研究で、RNA 代謝の基盤となるナノメーターレベルの精細さで構築された新規の核内構造 "RBP 網目構造"を同定しました。今後は、その成り立ちの分子メカニズムを解明するとともに、人為的な改変方法を模索して、網目構造制御により自由に RNA 代謝をコントロールすることが目標となります。網目構造が何らかの化学物質や細胞ストレスで変化するのか?老化や疾患ではどうか?変化するのであれば、RNA 代謝はどのような影響を受けるのか?細胞はどうなっていくのか?など興味は尽きません。今後の研究が、神経変性疾患をはじめとする RNA 代謝異常が病因となる疾患の、病態解明や治療に結び付けば幸いです。

### 4. 用語説明

#### ※1 RNA 代謝

RNA は、DNA の配列を写し取って作られた後、様々な加工や取捨選択を経て機能性 RNA となっていきます。この一連のステップを RNA 代謝と総称しており、真核細胞で盛んに行われています。RNA 代謝には、スプライシングをはじめ、5′キャッピング,3′末端プロセシング,RNA 修飾、輸送,分解など,様々な過程が含まれています。

#### ※2 スプライシング

DNA から転写された新生 RNA の一部を切り取り、必要な RNA 領域同士をつなげる機構のこ

とをスプライシングと呼びます。スプライシングで残る部位がエクソン、失われる部位がイントロンです。スプライシングは、特に真核生物で認められる機構です。

# ※3 天然変性領域(IDR:Intrinsically Disordered Region)

蛋白中で決まった立体構造をとらずにひも状に揺らいでいる領域を指します。荷電や極性などが偏った、限られたアミノ酸組成で構成されることが特徴です。近年、この領域は液─液相分離と呼ばれる膜に依存しない機能性分画形成を促進することが明らかとなり、注目されています。

# ※4 超解像顕微鏡

従来の光学顕微鏡の理論限界値(200 nm 程度)を超える解像度で試料を観察することのできる顕微鏡のこと。

### ※5 CLIP法

生細胞中で、実際にRNA上で目的蛋白が結合するRNA部位を、網羅的に解明する実験法。RNA -蛋白相互作用を探る上で欠かせない解析法として、広く認知されています。

# ※6 オプトジェネティクス

光に応答する蛋白を遺伝学的手法によって細胞内に発現させることで、細胞に直接触れることなく、光を当てるだけで細胞を操作する技術。本研究では、細胞内のRBPを凝集させるために、この技術を使用しました。

#### 5. 支援·謝辞

本研究は、科学研究費補助金(日本学術振興会(JSPS), 22H04925(PAGS), 21H02476, 22K19269, 23K18273, 23H02794)、厚生労働科学研究費補助金(23FC1014)、日本医療研究開発機構(AMED)(難治性疾患実用化研究事業(研究科題名:液-液相分離を正常化する核酸医薬による FTLD 治療法開発)、国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費などの支援を受けて実施されました。

### 【論文情報】

雜誌名:Molecular Cell

論文タイトル: Blending and separating dynamics of RNA-binding proteins develop architectural splicing networks spreading throughout the nucleus 著者名・所属名: Akio Masuda, <sup>1,3</sup> Takaaki Okamoto, <sup>1,3</sup> Toshihiko Kawachi, <sup>1</sup> Jun-ichi Takeda, <sup>1</sup> Tomonari Hamaguchi <sup>1</sup>, Kinji Ohno <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Neurogenetics, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences, Nisshin, Japan
<sup>3</sup>Equal contribution

DOI: 10.1016/j.molcel.2024.07.001

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical E/research/pdf/Mol 240725en.pdf