

課題番号	LS136
------	-------

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 25 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	細胞内構造構築 RNA の作用機序と存在意義の解明
研究機関・ 部局・職名	北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
氏名	廣瀬 哲郎

1. 当該年度の研究目的

これまでに実施してきた以下の2つのサブ研究項目を引き続き実施する。

1. 長鎖非コード(nc)RNA によるパラスペックル構造構築と作用機序の解明
2. 新しい構造構築 RNA の探索

1については、これまでに明らかにした NEAT1_2 ncRNA アイソフォームの合成・蓄積と、その後の RNP アッセンブリー過程に必須な役割を果たすパラスペックル蛋白質と NEAT1 ncRNA の分子間相互作用を詳細に解析し、パラスペックル形成を司る RNA と蛋白質によるネットワーク構築過程を明らかにする。またこの過程に重要な新しい仲介因子の作用機構を明らかにする。パラスペックルの生体内機能を解明するために、前年度までに明らかにしたパラスペックル巨大化現象と、その条件下で誘導される細胞死の制御機構についての分子機構を明らかにする。また NEAT1 KO マウスを用いた表現型解析、神経変性疾患との関わりに関する共同研究を実施する。2については、前年度までに新たに発見した癌関連蛋白質を含む RNA に依存した核内構造体について、その構成因子の同定、および作用機構について解析をすすめる。

2. 研究の実施状況

1. パラスペックル構造構築に必須な 7 種類のタンパク質間相互作用を検出した。次にパラスペックル会合因子として同定したタンパク質複合体の機能阻害解析によって、この会合因子が NEAT1 の転写伸長を調整しつつ、各因子間ネットワーク形成を促進し、パラスペックル構造構築を統合していることを明らかにした。一方、薬剤投与細胞でのパラスペックル肥大化機能を検討した結果、核質に散在していたタンパク質群が、肥大化パラスペックル内に吸い込まれるスポンジ作用を見出し、これと連動した急激な標的遺伝子の発現抑制を検出した。これによって、パラスペックルのサイズ変化による上記スポンジ作用によって、核質の制御因子量が変化し、それらの標的遺伝子の発現を制御されているモデルを提唱した(*Mol Biol Cell* 2014)。さらに共同研究によって、NEAT1 欠損マウスの卵巣内における表現型解析(投稿中)や神経変性疾患患者運動ニューロンにおける異常パラスペックル形成などの興味深い知見を得た(*Mol Brain* 2013)。
2. 前年度に見出した2つの RNA 構造体の構築メカニズムの解析を行った。この2つの構造体は、ある癌細胞株では融合して単一の構造体(以下、融合体)を形成し、別の癌細胞株では独立に別の構造体として存在し、正常繊維芽細胞では検出されないことが明らかになった。各因子の機能阻害解析を通して、2つの構造体は、共に構造構築 RNA に依存して形成され、独自のタンパク質成分を要して構築されることが推

測された。2つの構造体の構造構築RNAを同定するために、PAR-CLIP法によって、それぞれの結合RNA断片情報をゲノムワイドで取得した。またこれとは独立に、複数のRNA構造体の会合に共通に必要な会合因子を明らかにし、RNA構造体の構築機序に共通性があることが示唆された。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済みー査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. *<u>Hirose, T.</u>, Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., Yokoi, T., Nakagawa, S., Bénard, M., Fox, A., Pierron, G. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. <i>Mol. Biol. Cell</i> 25, 169-183 (2014). 2. Nishimoto, Y., Nakagawa, S., <u>Hirose, T.</u>, Okano, H.J., Takao, M., Shibata, S., Suyama, S., Kuwako, K., Imai, T., Murayama, S., Suzuki, N., Okano, H. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. <i>Mol. Brain</i> 6, 31 (2013). 3. Naganuma, T., *<u>Hirose, T.</u> Paraspeckle formation during the biogenesis of long noncoding RNAs. <i>RNA Biology</i> 10, 456-461 (2013). <p>(掲載済みー査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 廣瀬哲郎、谷川明恵 NEAT1 長鎖ノンコーディング RNA は、タンパク質の核内構造体への係留を介して転写を制御する 実験医学 32: 1249-1252 (2014) <p>(未掲載) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Hirose, T.</u>, Mishima, Y., *Tomari, Y. Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. <i>EMBO Rep</i> in press (2014). 2. Ono H, Motoi N, Nagano H, Miyauchi E, Ushijima M, Matsuura M, Okumura S, Nishio M, <u>Hirose T.</u>, Inase N, Ishikawa Y. Long non-coding RNA HOTAIR is relevant to cellular proliferation, invasiveness and clinical relapse in small cell lung cancer. <i>Cancer Med.</i> in press (2014) 3. Chakravarty D, Sboner A, Nair S, Giannopoulou E, Li R, Hennig S, Mosquera JM, Park K, Kossai M, Erho N, Vergara I, Ghadessi M, Davicioni E, Jenkins R, Palanisamy N, Chen Z, Nakagawa S, <u>Hirose T.</u>, Bander N, Beltran H, Fox A, Elemento O, Rubin M. The Estrogen receptor alpha regulated NEAT1 long non-coding RNA promotes prostate cancer progression. <i>Cancer Discov.</i> in press (2014)
<p>会議発表 計 16 件</p>	<p>専門家向け 計 15 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 廣瀬哲郎 長鎖非コード RNA 研究から見えてきた新しいゲノム機能 第 14 回分子複合医薬研究会 2013 年 5 月 10 日 池田 2. 廣瀬哲郎 “長鎖”非コード RNA の機能探索:ゲノムの暗黒物質はどこまで明らかになったか? ゲノム創薬フォーラム第 32 回談話会「マイクロ RNA の新展開と創薬への利用」 2013 年 5 月 28 日 東京 3. Mannen T, Goshuman N, Hirose T. Screening of the RNase-sensitive subnuclear structures identified the Sam68 nuclear body that was built on RNA with novel protein components. RNA2013, 2013 年 6 月 13 日 Davos 4. Kawagushi Tm Tanigawa A, Naganuma T, Hirose T. Paraspeckle formation during NEAT1 lncRNA biogenesis is integrated by SWI/SNF chromatin remodeling complexes. RNA2013, 2013 年 6 月 13 日 Davos 5. Hirose T. The roles of long noncoding RNA in the architecture of subnuclear structures. SEMINAIRES RECHERCHE Institut Gustave Roussy, CNRS, 2013 年 6 月 17 日 Villejuif 6. 廣瀬哲郎 長鎖非コード RNA の機能を規定するタンパク質因子 厚労省難治性疾患克服研究事業「神経変性疾患に関する調査研究」夏期ワークショップ 2013 年 7 月 19 日 東京 7. 萬年太郎、五島直樹、廣瀬哲郎 RNase 感受性スクリーニングにより同定された核内 RNA 顆粒状構造体の解析 第 15 回 RNA ミーティング 2013 年 7 月 25 日 松山 8. 川口哲哉、長沼孝雄、谷川明恵、廣瀬哲郎 クロマチン再構築複合体による ncRNA 転写伸長制御を介し

様式19 別紙1

	<p>た核内構造体の構築機構 第15回RNAミーティング 2013年7月25日 松山</p> <p>9. Hirose, T. The roles of long noncoding RNA in the architecture of subnuclear structures. 新潟神経学夏期セミナー・共同利用研国際シンポジウム 2013年7月27日 新潟</p> <p>10. 廣瀬哲郎 哺乳類 lncRNA による核内構造体構築メカニズムとその意義 第5回 RNAi 研究会 2013年8月31日 広島</p> <p>11. Hirose T. Searching and functional analysis of the subnuclear structures built on specific long noncoding RNA. 第86回日本生化学会年会シンポジウム 2013年9月12日 横浜</p> <p>12. Hirose T. Architectural role of long noncoding RNAs in vertebrates. 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013年12月4日 神戸</p> <p>13. 萬年太郎、五島直樹、廣瀬哲郎 RNase 感受性スクリーニングにより同定された核内 RNA 顆粒状構造体の解析 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸</p> <p>14. Kawaguchi T, Tanigawa A, Naganuma T, Kimura H, Ohkawa Y, Hirose T. SWI/SNF chromatin remodeling complexes integrate cotranscriptional assembly of nuclear paraspeckle on NEAT1 long noncoding RNA. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸</p> <p>15. 廣瀬哲郎 細胞内構造構築 RNA の作用機序と存在意義の解明 FIRST シンポジウム「科学技術が拓く2030年」へのシナリオ 2014年2月28日 東京</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>1. 廣瀬哲郎 リアルラボ@産総研「ゲノムの暗黒物質に迫る」2013年9月15日 東京</p>
<p>図書</p> <p>計2件</p>	<p>1. *Hirose, T., Mannen, T. Rapid and Efficient Elimination of Specific Nuclear Noncoding RNAs in Mammalian Cells with Antisense Oligonucleotides. <i>Methods Mol Biol.</i> in press (2014)</p> <p>2. *Hirose, T., Goshima, N. Genome-wide co-localization screening of nuclear body-localized proteins using the fluorescent-tagged cDNA library. <i>Methods Mol Biol.</i> in press (2014)</p>
<p>産業財産権 出願・取得状況</p> <p>計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件</p> <p>(出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>北海道大学遺伝子病制御研究所 (http://www.igm.hokudai.ac.jp) の研究成果欄にて発表</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>2013年9月15日 日本科学未来館 リアルラボ@産総研「ゲノムの暗黒物質に迫る」参加者20名 遺伝子の働きについてクイズを交えて分かりやすく解説し、その上でノンコーディング RNA についての新しい話題を紹介した。その後実験室ツアーを行い、顕微鏡を用いて実際にノンコーディング RNA が細胞内に局在している様子を観察してもらった。アンケートの結果、非常に好評であった。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載</p> <p>計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	128,000,000	85,260,000	42,740,000	0	0
間接経費	38,400,000	25,578,000	12,822,000	0	0
合計	166,400,000	110,838,000	55,562,000	0	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を 除く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	10,335,207	42,740,000	0	53,075,207	53,075,207	0	0
間接経費	0	12,822,000	0	12,822,000	12,822,000	0	0
合計	10,335,207	55,562,000	0	65,897,207	65,897,207	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	25,116,846	EVOS FL Auto Imaging System一式、実験試薬等
旅費	1,424,047	研究成果発表及び情報収集旅費等
謝金・人件費等	20,766,900	博士研究員及び研究補助員人件費
その他	5,767,414	学会参加費及び次世代シーケンス解析サービス等
直接経費計	53,075,207	
間接経費計	12,822,000	
合計	65,897,207	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
製氷機 フレックアイス メーカー 一式	ホンザキ社製 FM-120K	1	594,300	594,300	2013/10/8	北海道大学
ハイオクリンベンチ 一式	パナソニック社製 MCV-B131F-PJ	1	998,550	998,550	2013/10/9	北海道大学
CO2インキュベ ーター 一式	パナソニック社製 MCO-19AICUV- PJ	1	937,650	937,650	2013/10/23	北海道大学
Milli-Q Advantage 一式	メルゲリホア社製 ZOOQOVOJP	1	1,475,397	1,475,397	2013/10/25	北海道大学
液体窒素凍結保存 容器	テイラーワートン社製 LS3000	1	504,000	504,000	2013/11/13	北海道大学
超低温槽マイハイ 一式	日本フーザー社製 VT-208	1	633,360	633,360	2013/11/26	北海道大学
EVOS FL Auto Imaging System 一式	ライフテック/ロジンス社製 A0814-178C-001	1	6,669,810	6,669,810	2014/2/5	北海道大学
ライトサイクラー480メン テナンスキットA	ロジンス社製5091985	1	682,500	682,500	2014/2/12	北海道大学