

Title	独立した非膜性オルガネラとしてのパラスペックル形成の分子メカニズムに関する研究
Author(s)	高桑, 央
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15685号
Issue Date	2023-12-25
DOI	10.14943/doctoral.k15685
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91351
Туре	theses (doctoral)
Note	配架番号:2814
File Information	TAKAKUWA_Hiro.pdf



# 学位論文

# 独立した非膜性オルガネラとしてのパラスペックル形成の 分子メカニズムに関する研究

(Study on the molecular mechanism for the paraspeckle

formation as distinct membraneless organelles)

2023 年 12月 北海道大学 高桑 央

# 学位論文

# 独立した非膜性オルガネラとしてのパラスペックル形成の 分子メカニズムに関する研究

(Study on the molecular mechanism for the paraspeckle

formation as distinct membraneless organelles)

2023年12月 北海道大学 高桑央

# <u>目次</u>

発表論文目録および学会発表目録1
要旨3
略語表6
緒言8
方法15
結果
実験結果 1: mini-NEAT1 変異細胞株における PS は別の MLO である NS の内部に取り込まれる表現型を示す
実験結果 2: PS のシェルに存在する SFPQ はオリゴマー形成ドメインとダイマー形 成ドメイン、PLD を介して NS からの分離を誘導する
1.3 SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1の mini-PS コアへの人為的な繋留は
<b>mini-PS</b> のNSからの分離を誘導しない39
<ul> <li>2.4 SFPQとHNRNPF、BRG1はWTのPSのシェルに局在する41</li> <li>2.5 SFPQとHNRNPF、BRG1は協調的にmini-PSのNSからの分離を誘導する42</li> </ul>
2.6 SFPQ のダイマー形成ドメインおよびオリゴマー形成ドメイン、PLD は PS の NS からの分離に必要である43
<b>2.7 SFPQ</b> の PLD に濃縮して存在するプロリンとグルタミンは mini-PS の分離 欠損の効率的な機能相補に必要である44
2.8 SFPQ による PS のアセンブリー機能は mini-PS の NS との分離誘導には 不十分である47
実験結果 3: PS のシェルに局在する U2 snRNP の因子は NS への取り込みを誘導 する

<b>3.1 m9.8–16.6k 変異細胞株における PS は NS</b> から独立して存在する49
3.2 mini-PSの NS への取り込みに必要な NEAT1の 8-9.8kb 領域には U2
<b>snRNP</b> に関連するタンパク質が相互作用する51
3.3 U2 snRNP に関連するタンパク質の PS のシェルへの人為的な繋留は PS
の NS 内部への取り込みを誘導する55
<b>3.4 U2 snRNP</b> の主要な構成因子である SF3B1 は PS のシェルに局在する 57
3.5 U2 snRNP の阻害剤と U2 snRNA のノックダウンにより mini-PS の NS か
らの分離を誘導された58
考察60
結論
謝辞67
利益相反
引用文献69

## 発表論文目録および学会発表目録

### 本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hiro Takakuwa\*, Tomohiro Yamazaki\*, Sylvie Souquere, Shungo Adachi, Hyura Yoshino, Tetsuya Yamamoto, Tohru Natsume, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, and Tetsuro Hirose Shell protein composition encoded by NEAT1 domains dictates the formation of paraspeckles as distinct membraneless organelles under submission \*Equally contributed

### 本研究の一部は以下の学会に発表した

1. Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Gerard Pierron, and Tetsuro Hirose Molecular mechanisms of the paraspeckle formation as distinct nuclear bodies RNA 2019、2019 年 6 月、ポーランド、クラクフ

# 2. Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Gerard Pierron, and Tetsuro Hirose

物物理学的な理解に基づいた相分離構造体パラスペックルの独立性維持機構の解明 第43回日本分子生物学会、2020年 12月、オンライン

3. Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Gerard Pierron, Masaaki Murakami, and Tetsuro Hirose

Molecular grammar of the SFPQ prion-like domain for the paraspeckle segregation from nuclear speckles

第 22 回日本 RNA 学会年会、2021 年 7 月、オンライン

4. Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Gerard Pierron, Masaaki Murakami, and Tetsuro Hirose Molecular grammar of the SFPQ prion-like domain for the paraspeckle segregation from nuclear speckles 第 44 回日本分子生物学会、2021 年 12 月、横浜 5. Hiro Takakuwa, Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Shungo Adachi, Tohtu Natsume, Masaaki Murakami, Gerard Pierron, and Tetsuro Hirose Protein compositions of the shells of the paraspeckles determine their positioning in the nucleus 第 23 回日本 RNA 学会年会、2022 年 7 月、京都

2

## 要旨

【背景と目的】 真核生物の細胞核内には、膜構造を持たない顆粒状の非膜オルガネ ラ (Membraneless organelles; MLO) が多数存在している。近年 MLO が、その構 成因子である RNA やタンパク質の相分離と呼ばれる物理現象によって形成されるこ とが明らかになった。一群の MLO は RNA をその必須の骨格として形成されているこ とが明らかとなっており、その代表的なものとして NEAT1 長鎖ノンコーディング RNA (Long noncoding RNA; lncRNA) によって形成される核内構造体パラスペックル (Paraspeckle; PS) があげられる。PS は、スプライシング因子の集積する別の MLO である核スペックル (Nuclear speckle; NS) の近傍に形成される。PS は、種々の RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein; RBP) や特定の RNA を繋留する分子 スポンジとして機能し、遺伝子発現制御に重要な働きをすることが知られている。PS には 60 種類以上のタンパク質が集積し、その中でも SFPQ や NONO, FUS, RBM14, SWI/SNF 複合体のタンパク質因子は PS の形成に必要不可欠である。PS は、コア・シェル構造を持つ MLO であることが知られており、NEAT1 lncRNA は 5' 側と3'側が構造体のシェル(表面)に、中央領域がコア(中心)に局在するように折り たたまれた状態で PS の内部に配置される。23 kb にも及ぶ NEAT1 lncRNA のどの RNA 領域が PS の機能や性状を規定しているのかを探索するために、 CRISPR/Cas9 システムを用いて NEAT1 の様々な領域を欠失した変異細胞株を多 数樹立し、PS の表現型の解析が行われた。その結果、NEAT1 の特定の RNA 領域 は、PS のアセンブリーやコア・シェル構造形成に必要不可欠であることが明らかとなっ た。

MLO は周囲の細胞内空間との明確な「仕切り」がないにもかかわらず、互いに独立 した構造体として混じり合わずに共存している。PSはNSの近傍に形成されるが、2つ の MLO が独立した構造体として存在するための分子メカニズムは未だ不明である。 そこで本研究では、PSとNSをモデルとして、別々のMLO 同士が分離して存在する ための分子機構を明らかにすることを試みた。

【方法と結果】NEAT1の5'側と3'側を大きく欠失した mini-NEAT1 変異細胞株において、PS が通常近接する独立した MLO である NS の内部に包含されるという予想外な表現型を示した。この結果は、NEAT1 の特定の RNA 領域が、PS を独立したMLOとして存在させるために必要であることを示している。より詳細な表現型の解析を行うため、超解像度顕微鏡を用いた解析を行なった。その結果、mini-NEAT1 変異株でのパラスペックル (mini-PS) は NS の内部に取り込まれているものの、完全には混じり合わずに、そのコア・シェル構造は保持されていた。次に、PS が NS から独立し

て存在するために必要なタンパク質因子の探索を行った。lncRNA の多くは RBP とリ ボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成することで機能することから、mini-NEAT1 変異 株において欠失している RNA 領域に結合する RBP が重要な役割を果たしている可 能性を考えた。RNA-FISH 法を用いて、野生株 (Wild type; WT) の PS と比較して、 mini-PS への局在量が大きく減弱している RBP を探索した。その結果、SFPQ タン パク質の mini-PS への局在量が顕著に減弱していた。次に、MS2 システムにより SFPQ を mini-NEAT1 RNA 上に人為的に繋留することで、mini-PS の NS からの 分離欠損を機能相補することが可能であるのかを解析した。その結果、SFPQ を mini-PS のシェル領域に繋留することによって、WT と同様に、mini-PS が NS から 分離した。一方で、このような機能相補は mini-PS のコア 領域に SFPQ を繋留した 場合は、観察されなかった。さらに、SFPQ のどのドメインが PS の NS からの分離機 能に重要であるのかを明らかにするために、SFPQ のドメイン欠失変異体を用いて同 様の解析を行った。その結果、SFPQ の Coiled-coil (CC)ドメインや NOPSドメインと いったダイマーやオリゴマー形成に重要なドメインだけではなく、プリオン様ドメイン (Prion like domain; PLD) も重要であることが示唆された。

mini-PSは、NSに特異的に取り込まれることから、特定の因子がmini-PSのNSへの取り込みを誘導する可能性を考えた。mini-NEAT1 RNA上のmini-PSのNSへの取り込みに重要な領域を探索し、その領域に結合するRBPをMass spectrometry (MS)解析により網羅的に同定した。その結果、SF1を含むU2 snRNPの構成タンパク質がmini-NEAT1 RNAのサブドメインに結合していることが明らかとなった。次にSF1が、通常NSとは独立して存在する、WT-PSのNSへの取り込みを誘導する機能があるのかどうかを検証した。MS2システムを用いて、WTのNEAT1 RNA上にSF1を人為的に繋留した結果、SF1のPSシェル領域への繋留により、PSのNS内部への取り込みを観察できた。一方で、PSのコア領域へ繋留した場合には、PSはNSとは独立して存在していた。

【考察】本研究において、SF1 のように PS の NS への取り込みを誘導可能な因子 および SFPQ のように PS の NS からの分離を誘導可能な因子を同定した。NEAT1 lncRNA は mRNA と同様に、RNA polymerase II によって転写される。一般的に、 スプライシングされた mRNA は NS に局在し、細胞質に輸送され、翻訳される。対照 的に、NEAT1 lncRNA はスプライシングされずに核内に保持される。SF1 はスプライ ソソームを構成する因子であることから、SFPQ は NEAT1 lncRNA 上へのスプライシ ング因子の結合を阻害することにより、独立した MLO としての PS 形成を促進してい ることが推察された。PS と NS が独立して存在するためには、シェルに局在する SFPQ が重要な役割を果たしていることを見出したが、SFPQ が直接的に機能するの か、あるいはSFPQと相互作用する因子を介して機能するのかは未だ明らかになっていない。また、今回同定した因子以外にも同様のプロセスに関与する因子が存在している可能性が考えられる。したがって、より詳細な分子メカニズムの解明が今後の課題である。

【結論】 PS は、NEAT1 lncRNA 上に SFPQ をリクルートし、PS のシェル領域に配置する機構を通じて NS と独立した MLO として存在している。一方で、SF1 は PS の NS への取り込みを誘導可能であることを見出した。本研究は、PS のシェルに局在するタンパク質が PS とその他の MLO との独立性を制御していることを強く示唆しており、MLO のシェル領域に局在する因子の重要性を理解する上で基盤知見となることが期待できる。

# 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

arcRNA	Architectural RNA
ASO	Antisense oligonucleotide
BPB	Bromophenol blue
CC	Coiled-coil
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA binding domain
DBHS	Drosophila behavior human splicing
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole 1-8-D-ribofuranoside
eCLIP	Enhanced crosslinking and immunoprecipitation
EM	Electron microscopy
FBS	Fetal bovine serum
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GO:CC	Gene ontology cellular component
HyPro	Hybridization-proximity labeling
IMDM	Iscove's modified dulbecco's medium
kb	Kilobase
LLPS	Liquid-liquid phase separation
lncRNA	Long noncoding RNA
MCP	MS2 coat protein
mini-PS	Mini-NEAT1 paraspeckle
MLO	Membraneless organelles
MS2BS	MS2 binding site
NS	Nuclear speckle
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAS	Polyadenylation site
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PlaB	Pladienolide B
PLD	Prion like domain
Pol II	RNA polymerase II
PS	Paraspeckle

PSP	Paraspeckle protein
RBP	RNA binding protein
RNP	Ribonucleoprotein
RRM	RNA recognition motif
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sgRNA	Single-guide RNA
SIM	Structured illumination microscopy
smFISH	single-molecule Fluorescence in situ hybridization
snoRNA	Small nucleolar RNA
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein
SRM	Super-resolution microscopy
SSA	Spliceostatin A
SWI/SNF	Switch/sucrose non-fermentable
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TSA	Tyramide signal amplification
WT	Wild type



真核生物の細胞核内には膜構造を持たない顆粒状の MLO が多数存在している。 近年、これらの MLO が相分離と呼ばれる物理現象を介して形成され、特定の生体分 子を濃縮する細胞内空間を形作ることによって、さまざまな細胞内プロセスに関与する ことが明らかとなりつつある (Banani et al., 2017; Shin and Brangwynne, 2017; Alberti et al., 2019; Sabari et al., 2020; Lyon et al., 2021)。核内において、多く の MLO はクロマチン間領域と呼ばれるクロマチン間の隙間領域に存在する。核内に 存在する MLO である、核小体やカハールボディ、NS、PS、PML ボディ、ヒストン遺 伝子座ボディは遺伝子発現制御に関わることが報告されている (Banani et al., 2017; Sabari et al., 2020)。一般的に、これらの MLO は種々のタンパク質や核酸を含んで いる。MLO の主要な構成因子である RNA は、RNA やタンパク質の分子間相互作 用を促進することによって、MLO の形成に寄与することが示唆されている(Van Treeck and Parker, 2018; Roden and Gladfelter, 2021; Yamazaki and Hirose, 2021)。



図 1. 真核生物の細胞内に存在する MLO、(Banani et al., 2017)より引用 これまでに細胞質と核内に存在する MLO が多数同定されている。いくつかの MLO は特定の細胞株においてのみ観察されるが、ここではそれらも含めて示している。

lncRNA は遺伝子発現制御やクロマチン制御のような細胞内プロセスの基本的な制 御因子である。Architectural RNA (arcRNA) と呼ばれる一群の lncRNA は、MLO の形成において必須の構造骨格として機能する (Chujo and Hirose, 2017; Yamazaki et al., 2019)。その代表的なものとして、NEAT1\_2 lncRNA によって形成 される核内構造体 PS が挙げられる。NEAT1\_2 lncRNA は多数の RBP を集約する ことによって、PS の必須の構造骨格として機能する (Chen and Carmichael, 2009; Clemson et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Sunwoo et al., 2009)。PS は NS と呼 ばれる MLO の近傍に独立して形成され、SFPQ や NONO、PSPC1 のような Drosophila Behavior Human Splicing (DBHS) family タンパク質が集積する MLO として同定された(Visa et al., 1993; Fox et al., 2002)。PS は、妊娠の促進や 乳腺の発達のような生理条件だけではなく、ガンやウイルス感染などの病理条件にお いても重要な役割を果たすことが報告されている (Hirose et al., 2014; Imamura et al., 2014; Nakagawa et al., 2014; Adriaens et al., 2016; Mello et al., 2017). NEAT1 遺伝子からは、NEAT1\_1 (3.7 kb)とNEAT1\_2 (22.7 kb)の2種類の異な るアイソフォームが選択的な 3'末端プロセシングによって合成される (Naganuma et al., 2012)。また、NEAT1\_1 は PS の形成に必須ではないが、NEAT1\_2 は PS の形 成に必須であることが明らかになっている (Naganuma et al., 2012; Yamazaki et al., 2018)。NEAT1\_1 lncRNA は、一般的な mRNA の転写終結と同様に、その末 端にポリA鎖が付加されることにより安定化される。一方で、NEAT1\_2 lncRNAの3' 末端は、Triple helixと呼ばれる RNA 三重鎖構造をとっており、NEAT1\_2の安定化 に寄与している (Sunwoo et al., 2009; Wilusz et al., 2012)。PS は、RNA polymerase II (Pol II)による NEAT1\_2 の転写と連動して NEAT1 遺伝子座の近 傍に形成される (Mao et al., 2011)。そのため、Pol Ⅱの阻害剤を用いた転写阻害に より、PS は急速に消失する (Fox et al., 2005)。 これまでに 60 種類以上のタンパク質 が PS に局在することが明らかとなっており、パラスペックルタンパク質 (Paraspeckle protein; PSP)である SFPQ や NONO、 FUS、 RBM14、 SWI/SNF 複合体の構成因 子は、PS の形成プロセスに必要不可欠である (Naganuma et al., 2012; Kawaguchi et al., 2015; Yamazaki and Hirose, 2015)。 例えば SFPQとNONO タンパク質は、NEAT1\_2 lncRNA の発現に必要であり、NONO や FUS、RBM14、 SWI/SNF 複合体タンパク質は PS のアセンブリーに必要である (Naganuma et al., 2012; Kawaguchi et al., 2015; Yamazaki and Hirose, 2015; Yamazaki et al.,  $2018)_{\circ}$ 



# 図 2. NEAT1の選択的 3' 末端プロセシングとNEAT1\_2 による PS 形成、(Yamazaki et al., 2019) より引用

(A) 選択的 3' 末端プロセシングにより、NEAT1 遺伝子座からは 2 つのアイソフォーム が合成される。NEAT1\_2 は 3' 末端に存在する Triple helix 構造により安定化され る。(B) PS 形成における 2 段階のプロセス。Pol II により、NEAT1\_2 が転写された後 に、種々の RBP が結合することで NEAT1\_2 RNP を形成する。その後約 50 種類の NEAT1\_2 RNP が相分離を介してアセンブルすることによって 1 つの PS が形成され る。PS の形成に必要な PSP は、大きく分けて 2 つのカテゴリーに分類される。 Category 1A は、NEAT1\_2 の発現に必要である PSP を含んでいる。Category 1B は、PS のアセンブリーに必要なタンパク質を含んでいる。 CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した NEAT1 欠失変異体 RNA を発現する多数の細胞株において、PS の表現型が解析されてきた (Yamazaki et al., 2018, 2021; Modic et al., 2019)。その結果、NEAT1\_2 lncRNA 上には、RNA の安定化や NEAT1\_1 と NEAT1\_2 のアイソフォームスイッチ、PS のアセンブリーに関与する RNA の機能的ドメインが存在することが明らかとなった(Yamazaki et al., 2018)。特 に、NONO や SFPQ タンパク質の複数の結合サイトを含んでいる NEAT1\_2 の中央 領域は、相分離を介した PS のアセンブリーに必要不可欠である (Yamazaki et al., 2018)。また、NONO タンパク質が相分離を誘発するためには、RRM2/NOPS ドメイ ンや CC ドメインを含む自己凝集性ドメインが重要な役割を果たしている (Yamazaki et al., 2018)。



#### 図 3. NEAT1\_2 の RNA 機能ドメインと NEAT1\_2 中央領域を介した PS 形成

(A) NEAT1\_2 lncRNA の機能的なモジュラーRNA ドメイン構造。NEAT1\_2 lncRNA 上には、NEAT1\_2の安定性 (ピンク)、NEAT1\_1から NEAT1\_2 へのアイ ソフォームスイッチ (緑)、polyadenylation site (PAS) (黄色)、PS のアセンブリー (青)、 TDP-43 タンパク質の結合サイトである UG-repeat (ネイビー)、シェル形成ドメイン (オ レンジ)、R-loop 形成、DNA:RNA 三重鎖構造形成に関連する RNA 機能ドメインが 存在する。(Yamazaki et al., 2019) より一部改変。(B) NEAT1\_2 の中央領域に存在 する、機能的に重複した複数の結合サイトに NONO と SFPQ が結合する。その後、 RRM2/NOPS と CC ドメインを介して NEAT1\_2 上をコーティングすることにより NEAT1\_2 RNP が形成される。同時に FUS や RBM14 が RNP にリクルートされる ことにより、それらの PLD 間に働く多価の相互作用を介した PS 形成が促進される。 (Hirose et al., 2019) より一部改変。 電子顕微鏡 (Electron microscopy; EM) と超解像度顕微鏡 (Super-resolution microscopy; SRM)を用いた観察の結果、PS は球状あるいは円筒状の形状を持つことが観察された (Souquere et al., 2010; West et al., 2016)。NEAT1\_2 の 5'側と 3' 側の領域はシェル (表面) に、中央領域はコア (中心) に局在するように折り畳まれた 状態で PS 内部に配置される (Souquere et al., 2010; West et al., 2016)。さらに、 PSP も PS 内部において特異的な局在パターンを示すことから、PS は特徴的なコア-シェル構造をとることが示唆されている (West et al., 2016)。このような PS の特徴的 な形状や内部構造は、球状で不規則な内部構造を示す液液相分離 (Liquid-liquid phase separation; LLPS) によって形成される典型的な MLO とは大きく異なる。ソフ トマター物理学の理論解析を用いた研究成果により、PS が相分離の一種であるミセル化により形成されるブロック共重合体ミセルとして形成されることが明らかとなった (Yamazaki et al., 2021)。以上のことから、NEAT1\_2 lncRNA は PS の形状や機能 をその配列中にコードしていることが示唆されているが、未だそのルールを完全に理解するに至ってはいない。

多くの MLO は細胞内空間において、互いに独立して存在している。一方で、一群 の MLO は常に近傍に存在することが知られている。PS は常に NS の近傍に形成さ れるが、2 つの MLO 同士の融合あるいは一方が他方に取り込まれることなく、独立し て存在するための分子メカニズムは未だ明らかになってはいない。そこで私は博士課 程の間に、PS の NS の内部あるいは外側への局在を制御するための分子メカニズム の解明を目指し、これまで研究を行ってきた。



## 図 4. ミセル化により形成される PS のコア・シェル構造

(A) PS の Core-Shell 構造の模式図。NEAT1\_2 は、5' 側と3' 側がシェルに、中央 領域がコアに局在するように折りたたまれた状態で PS 内部に配置される。PSP は、コ アやシェル、パッチ状のように特異的な局在パターンを示す。(West et al., 2016) より 引用。(B) LLPS とミセル化によって形成される相分離構造体の模式図。LLPS により 形成される構造体は、球状で不規則な内部構造を有する(上図)。一方で、ミセル化に より形成される構造体は、球状で規則的な内部構造を有する(下図)。転写量の増加 に伴う形状と内部構造の変化も示す。(Yamazaki et al., 2022) より引用。

方法

#### 細胞培養

ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株KBM7より樹立された一倍体細胞株HAP1 は、ホ ライゾン・ディスカバリー・グループより入手した。HAP1細胞は終濃度10%のFetal Bovine Serum (FBS, Gibco)及び1%のPenicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai)を含むIscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)で 37°C、5% CO2の条件下で培養した。NEAT1の発現誘導を行うために、MG132 (Sigma-Aldrich)を終濃度5 μMで培地に添加し、6時間培養した。転写阻害実験で は、終濃度30 μMの5,6-Dichlorobenzimidazole 1-8-D-ribofuranoside (DRB、 Sigma-Aldrich)を培地に添加し、4時間培養した。その後、培地を3度交換して、阻 害剤を十分にウォッシュアウトし、1から8時間のタイムコースで回復培養を行なった。 U2 snRNPの阻害実験では、理化学研究所の吉田稔博士から提供していただいた Spliceostatin A (SSA)あるいはPladienolide B (PlaB, Cayman Chemical)をそ れぞれ最終濃度1 ng/mlあるいは1 μMで培地に添加し、30分もしくは60分間培養し た。Flp-In T-REx 293細胞は終濃度10%のFBS及び1% Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Nacalai)を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で37°C、5% CO2の条件下で培養した。

#### CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集細胞株の樹立

CRISPR/Cas9を用いたNEAT1遺伝子の部分欠失変異細胞株の樹立には、以前 の報告と同様の方法を用いた(Yamazaki et al., 2018; Yamazaki and Hirose, 2021b)。HAP1細胞 ( $1.5 \times 10^6$ 細胞)に対して、Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) とNucleofector 2b装置 (Program: X-005, Lonza) を使用し、2種類の Single-guide RNA (sgRNA) とSpCas9を同時に発現するPX-330 B/B plasmid (Yamazaki et al., 2018) (2 µg) とブラストサイジン耐性遺伝子を発現する pcDNA6/TR plasmid (0.2 µg) をエレクトロポレーション法により導入した。24時間の 培養後に、ブラストサイジンを20 µg/mlとなるように添加し、2日培養することで、プラス ミドが導入された細胞の濃縮を行った。その後、プラスミドが導入された細胞を限界希 釈し、96ウェルプレートに播種し、単一クローンを得た。それぞれのクローンに欠失が 導入されているかをゲノムPCRにより確認し、DNAシークエンスにより目的の欠失が 導入されているのかを確認した。

MS2バクテリオファージコートタンパク質の結合モチーフであるステムループ構造を 6回繰り返した6 × MS2配列のNEAT1 locusへのノックイン細胞株の樹立には、上記 のPX-330 B/B及びpcDNA6/TRに加えて、両端に6 × MS2 repair template 切断 用sgRNA配列を持つ2 μgのノックインプラスミドも同時に細胞に導入した。上記と同様 に単一クローンを取得し、ゲノムPCRとDNAシークエンスにより目的の配列が挿入さ れているのかを確認した。本研究で用いたsgRNAの配列と樹立したHAP1変異細胞 株を以下の表1に示す。

#### Flp-Inシステムを用いたドキシサイクリン誘導性遺伝子発現細胞株の樹立

表1. 本研究で用いた sgRNA 配列と HAP1 変異細胞株

		-			
NEAT1変具細胞株	NEAT1 (22743 nt) における挿入/欠失領域	後照	sgRNA#1 (5' から 3')	sgRNA#2 (5' から 3')sgRNA#2	改変した細胞株
HAP1 mini-NEAT1 (△1-8k/16.6-22.6k)	1034-8006/16613-22647	Yamazaki et al., 2017			
NEAT1 Δ16.6-22.6k	16613-22647	Yamazaki et al., 2017			
NEAT1 Δ1-8k	1034-8006	Yamazaki et al., 2017			
NEAT1 Δ4-8k/16.6-22.6k	4054-8005/16613-22647	This study	TACCACTTAGAACTCTAACC	GGATATCATATACTCACAAC	HAP1 NEAT1 Δ16.6-22.6k
NEAT1 Δ1-4k/16.6-22.6k	1034-4053/16613-22647	This study	AGAGGCCTTCCCGCTGAGGC	TACCACTTAGAACTCTAACC	HAP1 NEAT1 Δ16.6-22.6k
NEAT1 Δ20.1-22.6k	20157-22647	This study	GGGAGGCGCGGAGCCGCCGC	TCAGATAACCATTCTAACTA	HAP1 WT
NEAT1 Δ1-8k/20.1-22.6k	1034-8005/20157-22647	This study	AGAGGCCTTCCCGCTGAGGC	GGATATCATATACTCACAAC	HAP1 NEAT1 A20.1-22.6k
NEAT1 Δ1-8k/16.6-20.1k	1034-8006/16613-20156	This study	TGACTTGATTTGGCTGTGCA	TCAGATAACCATTCTAACTA	HAP1 NEAT1 ∆1-8k
m9.8-16.6k (∆1-9.8k/16.6-22.6k)	1033-9830/16613-22647	Yamazaki et al., 2017			
NEAT1ノックイン変異細胞株	NEAT1 (22743 nt) における挿入/欠失領域	後期	sgRNA#1 (5' から 3')	sgRNA#2 (5' から 3')sgRNA#2	改変した細胞株
mini-NEAT1/6xMS2BS@8.2kb	8175-(6xMS2BS insertion)-8176	This study	GCATCGTACGCGTACGTGTT	GGAGATTGGTTGTACAACAA	HAP1 mini-NEAT1
mini-NEAT1/6xMS2BS@16.2kb	16204-(6xMS2BS insertion)-16205	This study	GCATCGTACGCGTACGTGTT	GGAACCCTCTTACTTACTGG	HAP1 mini-NEAT1
m13-16.6k/6xMS2BS@14kb	14020-(6xMS2BS insertion)-14021	Yamazaki et al., 2017			
NEAT1/6xMS2BS@1.4kb	1438-(6xMS2BS insertion)-1439	This study	GCATCGTACGCGTACGTGTT	AGCAGATGCATCCGGCTCGA	HAP1 WT
NEAT1/6xMS2BS@14kb	14020-(6xMS2BS insertion)-14021	This study	GCATCGTACGCGTACGTGTT	TACCGCATATCTGTGTGTACAT	HAP1 WT

ドキシサイクリン依存的に標的遺伝子の発現を誘導可能な Flp-In T-REx 293細胞 株を樹立するために、1.25 µgのpcDNA5/FRT/TO/i/FLAG/MCP-SFPQ WTあるい は変異体タンパク質を発現するプラスミドおよび1.25 µgのリコンビナーゼを発現する pOG44プラスミドをLipofectamine LTX (Invitrogen)を用いてトランスフェクションし た。プラスミドDNAが安定的にゲノムDNAに導入された細胞株をハイグロマイシン (WAKO)を終濃度150 µg/mlで添加した培地中でセレクションした。導入遺伝子の発 現を誘導するために、ドキシサイクリンを終濃度1 µg/mlで添加した培地中で48時間 培養を行なった。

#### Plasmidのコンストラクション

N末端側にMS2 coat protein (MCP) が融合したタンパク質を発現するベクターを 作成するために、pcDNA5/FRT/TO/i/FLAG/N末MCPベクターの制限酵素サイトを 用いてTDP-43、BRG1、HNRNPF、PSPC1、SF1、U2AF2、PTBP1のORFを挿 入した。MS2テザリングシステムによって、PS上へのリクルートが観察できなかったN 末MCP融合タンパク質に関しては、C末端側にMCPを融合発現させた。C末端側に MCP が融合したタンパク質を発現するベクターを作成するために、 pcDNA5/FRT/TO/i/FLAGベクターの制限酵素サイトを用いて、MCPのORFを挿入 した。次に、pcDNA5/FRT/TO/i/FLAG/C末MCPベクターの制限酵素サイトを用い て、SF3B4とSF3A3のORFを挿入した。FLAG-SF3B4-MCPタンパク質及びFLAG-SF3A3-MCPタンパク質が主に細胞質への局在を示したため、SV40核局在シグナル 配列をインバースPCR法に基づく部位特異的変異導入によって挿入した。C末端側 にMCPが融合したHNRNPH1タンパク質を発現するベクターを作成するために、 pcDNA5/FRT/TO/i/FLAGベクターの制限酵素サイトを用いて、HNRNPH1のORF を挿入した。次に、pcDNA5FRT/TO/i/FLAG/HNRNPH1ベクターの制限酵素サイ トを用いてMCPのORFを挿入した。

#### Plasmidトランスフェクション

MS2テザリング実験のために、HAP1細胞を12ウェルプレートに、1ウェルあたり5.0 × 10<sup>4</sup>の細胞密度で播種した。24時間培養した後に、1.5  $\mu$ gのプラスミドを3  $\mu$ Lの TransIT-LT1 (Mirus)を用いてトランスフェクションした。共免疫沈降実験のために、 HAP1細胞をPoly-L-Lysineコーティングを施した100 mm プレートに、9.0 × 10<sup>5</sup>の 細胞密度で播種した。24時間培養した後に、15  $\mu$ gのプラスミドを45  $\mu$ LのTransIT-LT1 (Mirus)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を48時間 (最後の6時間にMG132の処理時間を含む)培養したのちに、それぞれの実験操 作を行なった。

#### RNA-FISHと蛍光免疫染色

RNA-FISHと蛍光免疫染色は以前に報告された方法に従い行なった。共焦点顕 微鏡の画像は、FV1000D (Olympus)、LSM900 with Airyscan2 (Zeiss) を用い て取得した。Super-resolution microscopy (SRM) 画像は、LSM900 with Airyscan2と63倍の対物レンズを用いて取得した。Structured-illumination microscopy (SIM) 超解像度画像は、ELYRA PS.1 (Zeiss) と100倍の対物レンズ を用いて、以前に報告された方法に従い取得した。RNA-FISHで用いたRNAのア ンチセンスプローブの配列を以下の表2に示す。

# 表 2. NEAT1 RNA-FISH において用いたアンチセンス RNA プローブの配列

名称	RNA配列 (5`から 3')
NEAT1_0-1k-AS	agaauacucaagcuugcaugccugcaggucgacucuagaggauccCCAACAAUACCGACUCCAACAGCCACUCGG CUUACUGUCCCGGGCUUACCAGAUGACCAGGUAAUGUUUUAAGUGAAUGGAUAAGUUAAAGGGA GGAAGAAGGGGUGGAGUGAGCUCACAAGAAGAGUUUAGCGCCAAACCUAGAGAAAAGUCCAAAAG GAGCACUGCCACCUGGAAAAUAAAGCGUUGGUCAAUGUUGUCCCCAACACCCGAGCAGCGUGCC UCGCAGUCCCCGCCUGUCAAACAUGCUAGGUGCCGCACCAGUCACCGGUGAGGAUGGCGCCUUA ACUCCACAUCACUCCUCAGACCACCCCUCACCUCCGCCCAGGGGCCUGGCUUCGCACCCAGACC UGGACGCUCCACCAGGCUGGGCCCGGCCUGGGCCCGGCCUGGCUUCGCACCCAGACC UGGACGCUCCACCAGGCUGGGCCCGGCCUGGGCCCGUCCAGGCCGAGCGAAAAUUACAUACC ACCCUGGGCCAGAGCGGUCAGCCCGUCGAGCUAAGUUCAGUUCCACAAGACCAGGCCUCAUCC CCAGGCGGGUUCACAGCCCUUGGUCUGGAAAAAAAGGGGCUGCUGGCAUGGACAAGUUGAAGAU UAGCCCUCCCGGCCUCCUGCAGCCUGCACCCACUGCCUGC
NEAT1_21.7-22.6k-AS	agaauacucaagcuaugcaucaagcuugguaccgagcucggauccacuaguaacggccgccagugugcuggaauucgcccuuC AUAGCCAGGGGACAUUGUCCCCCAGCUUCACAUCCACAUGUCUCCUAGCAUGGCACAUGCAUAU CCUGCCCAAGGAGCAUGAAGUCAGACCAGCAAACUGAACACGAGGCACAGUCCUGCAUGCUCUG GGACCGAGCACUGAGGGGCCCACAGGUGAGAAGGUGCUGGCCCUUCAGCUCUCCCUCC
NEAT1_DS1-600-AS	agaauacucaagcuaugcaucaagcuugguaccgagcucggauccacuaguaacggccgccagugugcuggaauucgcccuuA GCACAGGCUGACUUCCCUGUCCCACCCGGCACCUUGUGGUCCCAGCUGUUGGCCUUCCUGCAC AAGGGCCGGUUCGUUGGGCCUGUCCGCCCACCCAUCUCCAGCCAG
MALAT1_4601-5219-AS	agaauacucaagcuaugcaucaagcuugguaccgagcucggauccacuaguaacggccgccagugugcuggaauucgcccuua AGAUGGACAUUGCCUCUUCAUUGUAUUUCUCAUCAAUUCAUUAUUUUUGUGGUUAUAGCUUGAC AAGCAAUUAACUUUAAAAUGGUAGAUUCCGUAACUUUAAAUUGGUAGCUUUCAUUUGCUUAAAAU UUUUUGGCAUAUGCAGAUAAUGUUCUCAUCAGUAGUAAGAAUCUCAGGGUUAUGCUUAUUACCC AAUGGAGGUAUGACAUAUAAUCUUUUUCUGCCUUUACUUAUCAAUUCACCAAGGAGCUGUUUUCU CUGCAUCUAGGCCAUCAUACUGCCAGGCUGGUUAUGACUCAGAAGAUGUUAUCUGAAAAAAGUC UAUAGAAAAAAAAAA

smFISH解析を行うために、Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) コーティングを施し たカバーグラス上で細胞を培養し、4% PFA/PBSを用いて、室温で10分間固定した。 PBSで5分間洗浄後、氷上でPBS/0.5% Triton-X100を用いて5分間透過処理を行 い、PBSで5分間の洗浄を3回行った。カバーグラスを1 × Blocking buffer (Roche) 中で、室温で1時間ブロッキング反応を行った。1次抗体を1 × Blocking buffer (Roche) で希釈し、カバーグラスを4℃で一晩反応させた。その後、TBSTで5分間、 3回洗浄し、2次抗体を1 × Blocking buffer (Roche) で希釈し、カバーグラスを室温 で1時間反応させた。再びTBSTで5分間、2回洗浄し、PBSで5分間洗浄した。 Stellaris Wash buffer (10% Formamide and 2×SSC) で5分間洗浄し、0.4 µlの Stellaris® FISH Probes, Human NEAT1 5' Segment with Quasar® 570 Dye (BIOSEARCH) を加えたStellaris hybridization buffer (10% Formamide, 2× SSC, and 100 mg/ml dextran sulfate) 40µlとともに37℃で16時間反応させた。 mini-NEAT1 RNAの検出には、Stellaris® FISH Probes, Human NEAT1 5'及 び middle Segment with Quasar® 570 Dye (BIOSEARCH) をそれぞれ0.2 µl ずつ40 µlのStellaris hybridization bufferに添加して、37℃で16時間反応させた。 カバーグラスをStellaris Wash bufferを用いて37℃で30分間洗浄し、2×SSCで5 分間、室温で洗浄し、PBSで5分間洗浄した。カバーグラスをProLong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific) あるいは VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium with DAPI (Vector) でスライドグラスにマウントした。 RNA-FISHと蛍光免疫染色に用いた抗体は表.3に示した。

#### ウエスタンブロット

細胞をIP buffer (1 × PBS, 0.1% Triton X-100, and complete ETDA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) に懸濁し、5秒間の超音波破砕処理を氷上で 3回行なった。細胞破砕液を14,000 rpmで1分間遠心し、Bradford法を用いて上清 のタンパク質濃度の測定を行なった。6×SDS sample buffer (0.375 mM Tris-HCl (pH6.8), 12% SDS, 60% Glycerol, and 0.03% BPB) と終濃度50 mM のDTT を サンプルに加えて、95℃で5分間の熱処理を行なった。その後に、SDS-PAGEでタ ンパク質を分離した。電気泳動の後に、タンパク質をFluoroTrans W membrane (PALL) に転写した。ウエスタンブロットに用いた抗体は以下の表. 3に示した。

# 表3. 本研究で用いた抗体の一覧

抗体名	メーカー	カタログ番号
Mouse monoclonal anti-SC35	Sigma-Aldrich (Merck)	Cat#S4045
Rabbit polyclonal anti-SON/DBP5	Abcam	Cat#ab121759
Mouse monoclonal anti-NONO (clone 3/p54nrb)	BD Biosciences	Cat#611279
Mouse monoclonal anti-FUS (clone 4H11)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-47711
Mouse monoclonal anti-SFPQ (PSF) (clone C23)	MBL	Cat#RN014MW
Rabbit polyclonal anti-HNRNPH1	Bethyl laboratories	Cat#A300-511A
Rabbit polyclonal anti-BRG1	Bethyl laboratories	Cat#A300-813A
Rabbit polyclonal anti-HNRNPF (N1N3)	GeneTex	Cat#IHC00087
Rabbit polyclonal anti-PSPC1	Naganuma et al., 2012	N/A
Rabbit polyclonal anti-HNRNPH3	Abcam	Cat#ab6663
Rabbit polyclonal anti-RBM14	Bethyl laboratories	Cat#300-331A
Rabbit polyclonal anti-TDP43	Proteintech	Cat#10782-2-AP
Rabbit polyclonal anit-HNRNPA1	MBL	Cat#RN014PW
Rabbit polyclonal anti-DDDDK-tag pAb	MBL	Cat#PM020
Mouse monoclonal anti-FLAG (clone M2)	Sigma-Aldrich (Merck)	Cat#F3165
Rabbit polyclonal anti-MS2 coat protiein	Sigma-Aldrich (Merck)	Cat#ABE76-I
Mouse monoclonal anti-HA (clone 16B12)	BioLegend	Cat#901513
Mouse monoclonal anti-SF3B1 (clone B-3)	Santa Cruz Biotechnology	Cat#sc-514655
Mouse monoclonal anti-GAPDH (clone 6C5)	Abcam	Cat#ab8245
Rabbit polyclonal anti-GAPDH	Abcam	Cat#ab37168
Goat anti-rabbit IgG, Cy2 conjugate	Abcam	Cat#ab6940
Goat anti-mouse IgG, Cy3 conjugate	Merck	Cat#AP124C
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 405	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-31556
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-28175
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11034
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11031
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11036
Streptavidin, Alexa Fluor 568 conjugate	Thermo Fisher Scientific	Cat#S11226
Streptavidin, Alexa Fluor 647 conjugate	Thermo Fisher Scientific	Cat#S32359

#### 逆転写定量PCR

トータルRNAの抽出と精製は以前に報告された方法に従い行なった (Chujo et al., 2017)。TRI reagent (Molecular Research Center) を用いて細胞を溶解させ、細胞 溶解液を55℃で20分間、1000rpmで攪拌した。製造元の取扱説明書に従って精製 したトータルRNA (5 μg) をHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) とランダムへキサマープライマーを用いて逆転写した。 滅菌水で希釈したcDNAをKAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON Genetics) を用 いたqPCRで増幅し、定量を行った。以下のプライマーを用いてqPCRを行なった。

#### 18S rRNA

Forward: 5'-TTTAAGTTTCAGCTTTGCAACCATACT-3' Reverse: 5'-ATTAACAAGAACGAAAGTCGGAGGT-3'

#### GAPDH

Forward: 5'-ATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAGAT-3' Reverse: 5'-ATGAGTCCTTCCACGATACCAAAGTT-3'

NEAT1\_2

Forward: 5'-CAGTTAGTTTATCAGTTCTCCCATCCA-3' Reverse: 5'-GTTGTTGTCGTCACCTTTCAACTCT-3'

U2 snRNA Forward: 5'-GCCTTTTGGCTAAGATCAAGTGTAGT-3' Reverse: 5'-CTATTCCATCTCCCTGCTCCAAA-3'

U13 small nucleolar RNA (snoRNA) Forward: 5'-AGTTCATGAGCGTGATGATTGG-3' Reverse: 5'-TGTGCCCACGTCGTAACAAG-3'

#### 電子顕微鏡解析

Lowicry K4M (Polysciences Inc., PA, USA) で包埋した薄切片に対して免疫電 子顕微鏡観察を行なった。 HAP1 WTあるいはmini-NETA1変異細胞を4% PFA/0.1 M Sorensenリン酸緩衝液 (pH 7.3) 中において、4℃で1時間固定し、細胞 を掻き取った後に、遠心分離することで細胞ペレットを回収した。細胞ペレットをリン酸 緩衝液で洗浄後、30%メタノールで平衡化し、Leica EM AFS2/FSP automatic reagent handling apparatus (Leica Microsystems) で沈殿させた。Lowicryl polymerizationはUV照射下で・20℃で48時間、その後20℃で40時間行なった。超薄切片を一次抗体と結合した二次抗体と30分インキュベートした。PSのような電子密度の高い構造体をより明瞭に観察するために、薄切片は酢酸ウラニルで短時間造影した。Tecnai Spirit (FEI/Thermofisher) で薄切片を解析し、デジタル画像はSIS MegaviewIII charge-coupled device camera (Olympus) で撮影した。PS内部の金粒子の分布を解析するために、100%の外形輪郭を81.2%、57.4%に段階的にダウンスケールして、3つの層に分割した。これにより、面積が等しい外周部から中心部にかけての3つの領域が形成された。金粒子は目視でカウントして、領域あたりの金粒子の割合を定量した。

#### 免疫沈降法

Flp-In T-REx293細胞を1 µg/mlのドキシサイクリンで48時間処理して、目的の遺伝 子の発現を誘導した。Flp-In T-REx293細胞から核抽出物を以前に報告された方法 で調整した。核抽出物を液体窒素で瞬間凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。核 抽出物を遠心し、夾雑物を沈殿させて、Bradford法を用いて上清のタンパク質濃度 を測定した。核抽出物をIP buffer (1 × PBS, 0.1% Triton-X, 0.6 mM PMSF, and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche]) で希釈して (タンパク質 濃度; ~2.5 mg/ml)、anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich) と4℃で一 晩転倒混和した。ビーズをWash buffer (1 × PBS, 0.1% Triton-X, 0.6 mM PMSF) で5回洗浄した。免疫沈降サンプルをSDS sample bufferで溶出した。

SFPQ WTと変異体タンパク質間の相互作用解析のために、HAP1細胞 (mini-NEAT1/6xMS2@8.2 kb) にpcDNA5/FRT/TO/i/FLAG/MCP-SFPQ WTあるいは 変異体とpcDNA5/FRT/TO/i/HA/SFPQ WTを発現するプラスミドを同時にトランスフ ェクションし、42時間培養した。その後終濃度5 µMのMG132を添加した培地で6時間 培養した。氷冷したPBSで細胞を洗浄し、セルスクレイパーで細胞を掻き集め、遠心し て細胞ペレットを回収した。細胞ペレットをIP bufferに懸濁し、5秒間の超音波破砕処 理を氷上で5回行なった。細胞破砕液を遠心し、Bradford法を用いて上清のタンパク 質濃度の測定を行なった。IP bufferで細胞破砕液を希釈して (タンパク質濃度; ~2.5 mg/ml)、RNaseA (Nacalai) を終濃度1 µg/mlになるように添加し、4℃で1時間処理 した。その後、細胞破砕液とanti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich) と 4℃で一晩転倒混和した。ビーズをWash buffer (1 × PBS, 0.1% Triton-X, 0.6 mM PMSF) で5回洗浄した。免疫沈降サンプルをSDS sample bufferで溶出した。

#### RNAプルダウン法

RNAプルダウンは以前に報告された方法に従い行なった (Yamazaki et al., 2018)。 T7あるいはSP6 RNAポリメラーゼ (Roche) とBiotin RNAラベリングMix (Roche) を 用いてビオチン標識したRNAを合成し、DNase I (Thermo Fisher Scientific)を添 加してテンプレートDNAを分解した。その後、CENTRI-SEP Spin Column (PRINCETON SEPARATIONS) を用いてビオチン標識したRNAを精製した。 HeLaの核抽出物 (CILBIOTECH) を20,000 × gで5分間遠心し、25 μlの上清と75  $\mu$ l O RNA pulldown buffer (1 × PBS, 0.1% Triton-X, 0.6 mM PMSF, and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche]) と混和した (最終タンパ ク質濃度;約2 mg/ml)。核抽出物をRNA pulldown bufferで洗浄した10 μlの Tamavidin2-REV Magnetic Beads (WAKO) と混和して、4℃で1時間プレクリアし た。ビオチン標識したRNA (0.5 µgのRNAをUltra-Pure Water [Themo Scientific] でTotal 10 µlにした)を90℃で2分間加熱処理し、その後氷上で2分間静置した。 RNAの適切な2次構造形成を促進させるために、10 µLの2×RNA structure buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M KCl, and 20 mM MgCl<sub>2</sub>)を加えて、室温で20分 間静置した。2次構造形成したRNAを洗浄したTamavidin2-REV Magnetic Beads (10 µl)と4℃で1時間転倒混和した。未結合のRNAをRNA pulldown bufferで洗浄 し、RNAが結合したTamavidin2-REV Magnetic Beadsとプレクリアした核抽出物 (100 µl) を4℃で3時間転倒混和した。ビーズをWash buffer (1×PBS, 0.1% Triton-X, 0.6 mM PMSF) で5回洗浄した後に、SDS-sample bufferを加えて95℃で5分間 加熱し、RNAに結合していたタンパク質を溶出した。溶出したサンプルを用いてSDS・ PAGEとウエスタンブロットを行なった。RNA pulldownで用いたRNAセンスプローブ 配列を以下の表4に示す。

## 表 4. RNA pulldown において用いたセンス RNA プローブの配列

名称	RNA配列 (5`から 3')
NEAT1_8-9.2k S	gggcgaauugggcccucuagaugcaugcucgagcggccgccaguugauggauaucugcagaauucgcccuuGUGAGUAUAUGAUAU CCAUUUCCCUACAUAGCCACUAACAUCAGGUUUUUACAAUUUUAUUUCUUGCUACUUUAAGAAAUU UUUGUGGUGAAAUACAUACAAUAGAAGUUGACUAUCUGAAUCAUUUUUAAGUAUACAUUCAGUAGUGUUAA GUAUGUCGCCAUUGUUGUACAACCAAUCUCCAGAACUUUUUCAUCUUGCAAAACAAAC
NEAT1_9.2-9.8k S	agaauacucaagcuugcaucaagcuugguaccgagcucggauccacuaguaacggccgccagugugcuggaauucgcccuuUCCAACG UUAUAAGGUACUUUUAAGGUAUUUUAGUUGUCUUAGUCUAUAUUUCUGUACUCACCUUUCUUU
	* NEAT1由来の配列は大文字で示しており、リンカー配列は小文字で示している。

## MS解析と遺伝子オントロジー解析

2回独立して行なったRNAプルダウンサンプルのマススペクトロメトリー解析は以前に 報告された方法に従って行なった (Perez et al., 2021)。ケラチンやコンタミネーション の可能性のあるタンパク質 (例; アクチンやチューブリン、ミオシン) はリストから除いた。 それぞれのRNAプルダウンサンプルから得られた特異的なペプチドの数からネガティ ブコントロール (RNAの添加なし) のサンプルから得られた特異的なペプチドの数を差 し引いた。2つの異なるRNAプローブ (8-9.2 kbと9.2-9.8 kb) から得られたペプチド数 の合計が10以上のタンパク質を表5に示す。図19Bにおいて、それぞれのRNAプロ ーブから得られたペプチド数が5以上のタンパク質を解析に含めた。遺伝子オントロジ ー 解 析 (Gene Ontology Cellular Component; GO:CC) は、g:Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) を用いて、有意水準を0.05、term sizeを4-2000に設定して行なった。

#### アンチセンスオリゴを用いたノックダウン実験

アンチセンスオリゴ (antisense oligo; ASO) を用いたノックダウン実験は以前に報告 された方法に従って行なった。U2 small nuclear RNA (snRNA) をノックダウンする ために、それぞれのASOをHAP1細胞 (1.0 × 10<sup>6</sup> 細胞) にNucleofector II b装置 (Program: X-005, Lonza) とNucleofector Kit V (Lonza) を用いてトランスフェクショ ンした。エレクトロポレーション後に、60 mmプレートで細胞を2時間培養し、5 μMの MG132を添加した培地でさらに6時間培養した。実験に用いたASOを以下に示す。

Control GFP ASO

5'- mU\*mC\*mA\*mC\*mC\*T\*T\*C\*A\*C\*C\*C\*T\*C\*T\*mC\*mC\*mA\*mC\*mU-3'

U2 snRNAASO 5'-mA\*mG\*mA\*mA\*mC\*A\*G\*A\*T\*A\*C\*T\*A\*C\*A\*mC\*mU\*mU\*mG\*mA-3'

U13 small nucleolar RNA (snoRNA) ASO 5'-mC\*mG\*mU\*mC\*mG\*T\*A\*A\*C\*A\*A\*G\*G\*T\*T\*mC\*mA\*mA\*mG\*mG-3'

アスタリスクはホスホロチオエート修飾されたバックボーンを、mNは2'-O-メチルリボヌ クレオチドを示す。

#### 統計学的解析

統計学的解析にはPrism 7ソフトウェア (GraphPad) を用いた。3群以上の独立した サンプルの比較には、Kruskal-Wallis検定とDunn's multiple comparison検定を 用いた。2群の独立したサンプルの比較には、Mann-Whitney U検定を用いた。各図 内には、p < 0.05の場合にはアスタリスク(\*)を1つ、p < 0.01の場合にはアスタリス ク(\*\*)を2つ、p < 0.001の場合にはアスタリスク(\*\*\*)を3つ、p < 0.0001の場 合にはアスタリスク(\*\*\*)を3つ、p < 0.0001の場合にはアスタリスク(\*\*\*)を3つ、p < 0.0001の場

### 結果

実験結果 1: mini-NEAT1 変異細胞株における PS は別の MLO である NS の内部に取り込まれる表現型を示す

#### 1.1 NEAT1\_2 変異体により形成される PS は NS に内部に取り込まれる

ヒトー倍体細胞株である HAP1 細胞株において、多数の NEAT1\_2 の部分欠失変 異細胞株が樹立されてきた。その結果、PSの形成や機能において重要な役割を果た す複数の RNA 機能ドメインが同定された (Yamazaki et al., 2018, 2021; Modic et al., 2019)。それぞれの RNA 機能ドメインの欠失は、PS の特定の性質における機能 欠損を引き起こすが、その他の性質へは影響を及ぼさない。多数の NEAT1 部分欠 失変異体を用いた詳細な機能解析の間に、NEAT1\_2の中央領域と 5ドメイン (0-1 kb)、Triple helix 構造のみを持つ mini-NEAT1 変異体 RNA により構築されるパラ スペックル (mini-PS) は、5'側と3'側の RNA 領域を大きく欠失しているのにも関わら ず、規則的なコア・シェル構造を維持することが観察された(図 5A,B) (Yamazaki et al., 2018)。WTのPSは常にNSの近傍に独立したMLOとして存在するが、予想外 なことに、mini-PS は NS のマーカータンパク質である SRRM2 タンパク質と共局在 することを見出した (図 5C-E)。別の mini-NEAT1 変異細胞株クローンにおいても、 PS が NS と共局在するのかを解析した。その結果、別のクローンにおいても、mini-PS は NS と共局在していた (図 5E)。また、NS の別のマーカーである SON タンパク 質とMALAT1 lncRNA によりNSを観察した。その結果、mini-PS はこれらのマーカ ーとも共局在した (図 6A-D)。 mini-PS の NS 内部への取り込みをより詳細に観察す るために、SIM を用いた超解像イメージング解析を行なった。その結果、約 90%の mini-PS は規則的な構造を維持したまま NS の内部に取り込まれていた (図 7A,B)。 また、EMを用いた解析でも同様に、ほとんどの金コロイド標識された mini-PS が微細 構造から定義された NS の内部に存在することが観察された (図 7C)。以上の結果か ら、mini-PS は規則的なコア・シェル構造を維持したまま、完全には混じり合わずに、 NSの内部に取り込まれており、独立した MLOとして存在するための機能が欠損して いることが示された。



#### 図 5. WTとmini-NEAT1 変異細胞株における PSとNSの観察

(A) WT と mini-NEAT1 変異体の遺伝子構造の概略図。RNA-FISH 解析において 用いた RNA プローブの位置を下に示す。(B) WT と mini-NEAT1 変異株の PS の 模式図。WT の PS では、NEAT1\_2 の 5'側がシェルに、中央領域がコアに局 在する。mini-PS では、NEAT1\_2 の 5'側がシェルに、3'側がコアに局在する。(C) NEAT\_2 の発現を誘導するために (Hirose et al., 2014)、5 $\mu$ M の MG132 で 6 時間 処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株において、NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。NS のマーカータンパク質である SRRM2 は蛍光 免疫染色法により検出した (マゼンタ)。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いて染色した (青)。NEAT1 と SRRM2 のラインプロットを右に示す。スケ ールバー: 10  $\mu$ m。(D) MG132 非処理の HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞 株において、NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。SRRM2 を蛍光免 疫染色法により検出した (マゼンタ)。核は DAPI を用いて染色した (青)。スケールバ ー: 500 nm。NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフを右に 示す。WT: n = 167、mini-NEAT1: n = 210。(E) 5 $\mu$ M の MG132 で 6 時間処理し た HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株の別クローンにおいて、NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。 NS のマーカータンパク質である SRRM2 は蛍 光免疫染色法により検出した (マゼンタ)。 核は DAPI を用いて染色した (青)。 スケー ルバー: 10 μm。



図 6. NS の複数のマーカーを用いた WT と mini-NEAT1 変異細胞株における PS とNS の観察

(A) 5  $\mu$ M の MG132 で 6 時間処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞 株において、NEAT1 RNA を smRNA-FISH 法により検出した (マゼンタ)。NS のマ ーカータンパク質である SON は蛍光免疫染色法により検出した (緑)。核は DAPI を 用いて染色した (青)。NEAT1 と SON のラインプロットを右に示す。スケールバー: 10  $\mu$ m。(B) MG132 (5  $\mu$ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異 細胞株における、NEAT1 (マゼンタ) と SON (緑)の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。(C) 5  $\mu$ M の MG132 で 6 時間処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異 細胞株において、NEAT1 RNA (緑) と MALAT1 RNA (マゼンタ) を RNA-FISH 法 により検出した。核は DAPI を用いて染色した (青)。NEAT1 と SON のラインプロット を右に示す。スケールバー: 10  $\mu$ m。(D) MG132 (5  $\mu$ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (マゼンタ) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。



図 7. SIM と EM 用いた WT と mini-NEAT1 変異細胞株における PS と NS の観察 (A) MG132 (5 µM、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞 株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ) の SIM 画像。スケールバー: 500 nm。NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフを右に示す。 WT: n = 370、mini-NEAT1: n = 409。(B) MG132 (5 µM、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マ ゼンタ) の 3D SIM 画像。(C) HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、 PS と NS の EM 画像。NONO タンパク質の局在を金粒子で検出した。赤矢印で PS の位置を示す。破線で NS の位置を示す。スケールバー: 200 nm。

1.2 新規に形成された mini-PS は NS の外部に形成された後に、NS の内部に取り
### 込まれる

新規に形成された mini-PS が NS の内部に形成されるのか、外側に形成されるの かを検証した。可逆的な Pol II 阻害剤である DRB を処理することで、NEAT1\_2 の 転写を阻害し、PSを完全に消失させる。その後、薬剤を培地から取り除くことで転写を 再開させ、新規な PS の形成を観察可能であることが知られている (Fox et al., 2002; Sasaki et al., 2009; Chujo et al., 2017; Yamazaki et al., 2018)。この方法を用い て、新規に形成された mini-PS と NS の局在を解析した。その結果、転写再開後 1-2 時間では、多くの mini-PS は NS の近傍に独立して存在していた (図 8 A, B)。さらに、 転写再開後 4-8 時間では、NS の内部に存在する mini-PS の割合が時間経過ととも に増加した (図 8 A, B)。この観察結果と一致して、HAP1 WT と mini-NEAT1 変異細 胞株において、NEAT1 の転写点は NS の外側に近接して存在していた (図 8 C)。以 上の結果から、mini-PS は NS の外側に形成された後に内部に取り込まれることが示 唆された。



## 図 8. 新規に形成された PS あるいは NEAT1 の転写点とNS の観察

(A) HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、新規に形成された PS の SIM 画像。細胞を 30  $\mu$ M の DRB で 4 時間処理した後に、培地から薬剤を除いてか ら 1、2、4 または 8 時間培養した。NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。NS のマーカータンパク質である SRRM2 は蛍光免疫染色法により検出した (マ ゼンタ)。スケールバー: 500 nm。(B) A において、NS と分離あるいは取り込まれてい た PS の割合を定量したグラフ。WT: n = 64 (DRB, 0 h)、n = 60 (Release, 1 h)、n = 60 (Release, 2 h)、n = 60 (Release, 4 h)、n = 62 (Release, 8 h); mini-NEAT1: n = 67 (DRB, 0 h)、n = 60 (Release, 1 h)、n = 59 (Release, 2 h)、n = 62 (Release, 4 h)、n = 59 (Release, 8 h). (C) MG132 (5  $\mu$ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1変異細胞株における、NEAT1の転写点の SRM 画像。NEAT1 の転写点を NEAT1 の tail probe を用いて RNA-FISH 法により検出した (緑) (Mao

32

et al., 2011; West et al., 2016)。NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (マ ゼンタ)。NS のマーカータンパク質である SON は蛍光免疫染色法により検出した (シ アン)。スケールバー: 500 nm。

## 1.3 NEAT1\_2 の特定の RNAドメインは PS の NS からの分離に必要である

PSがNSから分離するために必要なRNA領域を同定するために、一連のNEAT1 部分欠失変異細胞株を樹立した (図 9A)。これらの変異細胞株において、PSとNSの 局在を解析した。その結果、 $\Delta 1$ -8kb/16.6-20.2kb 変異細胞株において、PS は NS の内部に取り込まれていたが、1-8kb あるいは 16.6-20.2kb 領域のいずれかを欠失 した場合には、PS の NS の近傍への局在には影響を与えなかった (図 9B,C)。以上 の結果から、1-8kb と 16.6-20.2kb 領域は、PS の NS からの分離機能に対して機能 的に重複した RNA サブドメインであることが示唆された。



図 9. 複数の NEAT1 部分欠失細胞株における PSとNSの局在の観察

(A) WT と mini-NEAT1 変異体、6 種の NEAT1 部分欠失変異体の遺伝子構造の 概略図。RNA-FISH 解析において用いた RNA プローブの位置を下に示す。(B) MG132 (5  $\mu$ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株、 6 種の NEAT1 部分欠失変異細胞株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。(C) B において、NS と分離あるいは取り込ま れていた PS の割合を定量したグラフ。WT: n = 183, mini-NEAT1: n = 198、 $\Delta$ 16.6– 22.6k: n = 188、 $\Delta$ 1–8k: n = 196、 $\Delta$ 4–8k/16.6–22.6k: n = 173、 $\Delta$ 1–4k/16.6– 22.6k: n = 186、 $\Delta$ 1–8k/20.2–22.6k: n = 178、 $\Delta$ 1–8k/16.6–20.2k: n = 194。 実験結果 2: PS のシェルに存在する SFPQ はオリゴマー形成ドメインとダイマー形成ドメイン、PLD を介して NS からの分離を誘導する

## 2.1 一部の PSP の mini-PS への局在量は WT の PS と比較して顕著に減弱する

先行研究において、複数の主要な PSP である NONO や FUS、RBM14 タンパク 質は、WT の PS と同程度に mini-PS への局在を示した。一方で、SFPQ タンパク質 の mini-PS への局在量は、WT の PS と比較して、減弱していた(Yamazaki et al., 2018)。多くの lncRNA は、タンパク質と RNP 複合体を形成することで機能することか ら、SFPQ のように mini-PS への局在量が減弱するタンパク質が PS と NS との分離 に関与している可能性を考えた。そこで mini-PS への局在量の減弱するタンパク質の 探索を行なった結果、SFPQと同様に、TDP-43、HNRNPH1、HNRNPF、BRG1タ ンパク質の mini-PS への局在量が有意に減弱していた(図 10A,B)。一方で、NONO や FUS、RBM14、HNRNPA1、HNRNPH3 タンパク質は、WT の PS と同程度に mini-PS へ局在していた(図 10A,B)。また、これらのタンパク質の発現量は WT と mini-NEAT1 変異細胞株において同程度であった(図 10C)。以上の結果から、 SFPQ と TDP-43、HNRNPH1、HNRNPF、BRG1を PS の NS からの分離を誘導 するための有力な候補因子として同定した。





(A) 5  $\mu$ M の MG132 で 6 時間処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞 株において、NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。それぞれのボック スの上に示している PSP を蛍光免疫染色法で検出した (マゼンタ)。核は DAPI を用 いて染色した (青)。スケールバー: 10  $\mu$ m。(B) A における、PSP と NEAT1 の蛍光強 度比 (PSP/NEAT1) の定量。箱ヒゲ図により、平均値 (中央線)、25–75% (箱の下底 と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端)を示す。Mann-Whitney U-test を用い て、検定を行なった。\*\*\*\*P < 0.0001。3回の独立した実験から同様の結果を得ている。全てのサンプルで n = 30。(C) 5  $\mu$ M の MG132 で 6 時間処理した HAP1 WT および mini-NEAT1、 $\Delta$ 4-8kb/16.6-22.6kb、 $\Delta$ 1-4kb/16.6-22.6kb 変異細胞株における、PSP (BRG1 と SFPQ、PSPC1、NONO、HNRNPH1、HNRNPF、TDP-43、GAPDH) のウエスタンブロット解析。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。

# 2.2 SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 の mini-PS への人為的な繋留は mini-PS の NS からの分離を誘導する

次に、PS の NS からの分離を誘導するための候補因子 (SFPQ と TDP-43、 HNRNPH1、HNRNPF、BRG1)をmini-PS に繋留することによって、mini-PS が、 WTのPSと同様に、NSと独立して存在することができるのかを検証した。この繋留実 験には、MCPとMCPのRNA 結合モチーフであるステムループ構造 (MS2 binding site: MS2BS) によるシステムを利用した。mini-NEAT1 変異細胞株において欠失し ている RNA 領域 (1-8kb および 16.6-22.6kb) は PS のシェルに局在する RNA 領 域であることから、5'側のシェル領域に 6 × MS2BS (MS2BS を 6 回繰り返した RNA 配列) をノックインした mini-NEAT1 変異細胞株を樹立した。このノックイン細胞株に おいて、MCP と候補タンパク質の融合タンパク質を発現させることによって、MCP が 6 × MS2BS に結合して候補タンパク質が mini-NEAT1 RNA 上に繋留される (図 11A)。SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 を mini-PS のシェルに繋留したところ、 mini-PS は、NS から分離し、その近傍に独立して存在することが観察された(図 11B-D)。一方で、TDP-43 や HNRNPH1 を繋留したところ、mini-PS の NS からの 分離を誘導することはできなかった (図 11B-D)。また、親株である mini-NEAT1 変 異細胞株において、これらのタンパク質を過剰発現させただけでは mini-PSの NSか らの分離を誘導しなかった (図 11B-D)。以上の結果から、mini-PS の分離欠損を機 能相補するためには、SFPQや HNRNPF、BRG1と NEAT1 RNAとの相互作用が 必要であることが示唆された。



図 11. mini-PS の NS からの分離欠損の機能相補実験

(A) MCP 融合タンパク質の mini-PS シェル領域への人為的な繋留実験の模式図。 (B) MCP-PSP を mini-NEAT1/6×MS2@8.2kb (左) あるいは mini-NEAT1 (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5  $\mu$ M、6 時間) において PS と NS を 観察した。NEAT1 RNA を smRNA-FISH 法により検出した (マゼンタ)。NS のマー カータンパク質である SRRM2 (緑) と MCP-PSP (シアン) は蛍光免疫染色法により 検出した。白い四角で囲んでいる領域を拡大して示す。スケールバー: 10  $\mu$ m。(C) B において、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフ。データ は 3 回の独立した実験から集計した。mini-NEAT1/6×MS2@8.2 kb: n = 68 (MCP-SFPQ), n = 65 (MCP-HNRNPF), n = 60 (MCP-BRG1), n = 62 (HNRNPH1-MCP), n = 63 (MCP-TDP-43), n = 63 (MCP-FUS), n = 63 (MCP-NONO), n = 61 (MCP-PSPC1); mini-NEAT1: n = 64 (MCP-SFPQ), n = 68 (MCP-HNRNPF), n = 60 (MCP-BRG1), n = 62 (HNRNPH1-MCP), n = 60 (MCP-TDP-43), n = 60 (MCP-FUS). (D) B における、MCP-PSP のウエスタンブロット解析。抗 FLAG 抗体 を用いて、MCP-PSPを検出した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。

# 2.3 SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 の mini-PS コアへの人為的な繋留は mini-PS の NS からの分離を誘導しない

次に、mini-PS は特定の RNA 領域を大きく欠失しているのにもかかわらず規則的 なコア・シェル構造を維持していることから、繋留するタンパク質の PS 内部における局 在が重要であるのかを検証した。mini-NEAT1 の 3'側のコア領域に 6 × MS2BS 配 列をノックインした mini-NEAT1 変異細胞株を樹立し、mini-PS のコア領域への繋留 実験を行った (図 12A)。実際に、mini-NEAT1 の 5'側に SFPQ を繋留すると mini-PS のシェルに、3'側に繋留すると mini-PS のコアに局在することが観察された (図 12B)。SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 を mini-PS のコアに繋留したところ、NS と の分離機能欠損を相補することができなかった (図 12C-F)。以上の結果から、SFPQ や BRG1、HNRNPF の mini-PS シェルへの繋留は NS からの mini-PS の分離を 促進するが、mini-PS コアへの繋留では分離を促進しないことが示された。



## 図 12. mini-PS のシェルあるいはコア領域へのタンパク質の繋留による NS からの 分離欠損の機能相補実験

(A) MCP 融合タンパク質の mini-PS シェルあるいはコア領域への人為的な繋留実験の模式図。(B) MCP-SFPQ と PS の SRM 画像。MCP-SFPQ を mini-NEAT1/6 × MS2@8.2kb (上) あるいは mini-NEAT1/6 × MS2@16.2kb (下) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5 μM、6 時間) において、NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。MCP-SFPQ は抗 FLAG 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検出した (マゼンタ)。スケールバー: 500 nm。(C) MCP-PSP を mini-

NEAT1 (左) あるいは mini-NEAT1/6×MS2@8.2kb (中央)、mini-NEAT1/6 × MS2@16.2kb (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5 µM、6 時間) において PS と NS を観察した。 NEAT1 RNA を smRNA-FISH 法により検出した (マゼンタ)。NSのマーカータンパク質であるSRRM2(緑)とMCP-PSP(シアン)は 蛍光免疫染色法により検出した。白い四角で囲んでいる領域を拡大して示す。スケー ルバー: 10 µm。(D) C における、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を 定量したグラフ。データは3回の独立した実験から集計した。全てのサンプルでn= 60。(E) C における、MCP-PSP のウエスタンブロット解析。抗 FLAG 抗体を用いて、 MCP-PSP を検出した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。mini-NEAT1/6×MS2@8.2kbとmini-NEAT1/6×MS2@16.2kb変異細胞株間で、 トランスフェクションした MCP-PSP の発現量に顕著な差は観察されなかった。(F) C における、FLAGとNEAT1の蛍光強度比(FLAG/NEAT1)の定量。mini-NEAT1/ 6×MS2@8.2kbとmini-NEAT1/6×MS2@16.2kb変異細胞株間で、MCP-PSP のリクルート効率に顕著な差は観察されなかった。箱ヒゲ図により、平均値(中央線)、 25-75% (箱の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端)を示す。データは、 Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn multiple comparison test を用いて 検定を行った。全てのサンプルで n = 20。\*\*\*\*P < 0.0001、\*\*\*P < 0.001、\*\*P <  $0.01, *P < 0.05_{\circ}$ 

### 2.4 SFPQとHNRNPF、BRG1はWTのPSのシェルに局在する

SFPQ、HNRNPF、BRG1 の WT の PS 内部における局在を調べた。EM を用い た局在解析により、SFPQ は PS のコア領域のみではなく、シェル領域にも同程度に 局在することが観察された (図 13A)。SIM を用いた局在解析により、HNRNPF は、 専ら PS のシェルに局在することが観察された (図 13B)。過去の知見から、BRG1 は PS 内部にパッチ状に局在することが知られており、一部の BRG1 はシェルに局在す る (Kawaguchi et al., 2015; Yamazaki et al., 2018)。これらの結果から、シェルに 局在する SFPQ と HNRNPF、BRG1 は PS の NS からの分離に寄与していることが 示唆された。



## 図 13. EMとSIMを用いた SFPQとHNRNPFの局在解析

(A) HAP1 WT における、PSとSFPQのEM画像(左)。SFPQの局在は金粒子によって検出した。破線はそれぞれPSの外側、中間、内側の領域を示す。グラフは外側、中間、内側のそれぞれの領域に局在するSFPQの割合を示す(右)。合計で492の金粒子をカウントした。(B) HAP1 WT における、PSとHNRNPFのSIM 画像。 NEAT1をNEAT1\_5'とNEAT1\_3'プローブの両方を用いたRNA-FISHにより検出した(緑)。HNRNPFは蛍光免疫染色法により検出した(マゼンタ)。スケールバー:500 nm。

2.5 SFPQとHNRNPF、BRG1は協調的に mini-PSのNSからの分離を誘導する mini-PSの分離欠損の機能相補における、SFPQとHNRNPF、BRG1の関係性を 明らかにするために、これらの因子を繋留した際に、他の因子が相互に mini-PS ヘリ クルートされるのかを検証した。HNRNPFを mini-PS へ繋留したところ、SFPQの mini-PS へのリクルートが促進された(図 14A)。同様に、SFPQとヘテロダイマーを形 成する NONO や PSPC1の mini-PS への繋留により、SFPQの mini-PS へのリク ルートが促進された(図 14A)。さらに、BRG1を mini-PS へ繁留した場合には HNRNPFの mini-PS へのリクルートが観察された(図 14B)。一方で、これ以外のタ ンパク質を繋留した際には、その他の因子の mini-PS へのリクルートは促進されなか った(図 14A-C)。このことから、SFPQとHNRNPF、BRG1は同一の分子機構を介 して協調的に mini-PSの NSからの分離を誘導する可能性が示唆された。



図 14. PSP を mini-PS へ繋留した際の、SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 のリク ルート量の評価

(A-C) PSP と NEAT1 の蛍光強度比 (PSP/NEAT1) の定量。mini-NEAT1/ 6 × MS2@8.2kb 変異細胞株に MCP-PSP をトランスフェクションし、MG132 (5  $\mu$ M、6 時間) で処理した。NEAT1 RNA を RNA-FISH 法で検出した。それぞれの PSP を蛍光免疫染色法で検出した。箱ヒゲ図により、平均値 (中央線)、25-75% (箱の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端) を示す。データは、Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn multiple comparison test を用いて検定を行った。 \*\*\*\**P* < 0.0001、\*\**P* < 0.01、\**P* < 0.05。(A) SFPQ と NEAT1 の蛍光強度比 (SFPQ/NEAT1)の定量。SFPQ recruitment: n = 30 (MCP-GFP-NLS), n = 30 (MCP-HNRNPF), n = 25 (MCP-BRG1), n = 30 (MCP-NONO), n = 30 (MCP-PSPC1)。(B) HNRNPF と NEAT1 の蛍光強度比 (HNRNPF/NEAT1)の定量。HNRNPF recruitment: n = 30 (MCP-GFPNLS), n = 30 (MCP-SFPQ), n = 30 (MCP-BRG1) (C) BRG1 と NEAT1 の蛍光強度比 (BRG1/NEAT1)の定量。BRG1 recruitment: n = 30 (MCP-GFPNLS), n = 30 (MCP-SFPQ), n = 30 (MCP-HNRNPF)。

2.6 SFPQ のダイマー形成ドメインおよびオリゴマー形成ドメイン、PLD は PS の NS からの分離に必要である

PSのNSからの分離プロセスを理解する上でSFPQが重要な因子の1つであると 考え、mini-PSのNSからの分離を促進するために必要なSFPQのドメインを探索し た。SFPQはDBHS family タンパク質とのダイマー形成に必要なRRM2/NOPS、 DBHS family タンパク質とのオリゴマー形成に必要なCCドメイン、DNA 結合ドメイ ン (DNA binding domain; DBD)、PLD を含む複数のモチーフを含んでいる (図 15A-E)。そこで、SFPQ のドメイン欠失変異体を用いた mini-PS のシェルへの人為 的な繋留実験を行い、どのドメインが mini-PS の分離欠損の機能相補に必要である のかを検証した (図 15A)。その結果、RRM2/NOPS の欠失 (ΔRRM2/NOPS) は完 全にmini-PSの分離機能の欠損を相補する機能が損なわれていた(図16A-C)。CC あるいは PLD の欠失はその相補機能が顕著に減弱していた (図 16A-C)。一方で、 DBD あるいは G-rich ドメインの欠失は、WT の MCP-SFPQ と同様に、分離機能の 欠損を相補することができた(図 16A-C)。この分子メカニズムをより詳細に理解するた めに、これらの SFPQ 変異体を用いて共免疫沈降を行った。予想通り、SFPQ ΔRRM2/NOPS 変異体は SFPQ および NONO、PSPC1 との相互作用が完全に失 われていた (図 16D,E)。また、SFPQ ΔCC は SFPQ および NONO との相互作用は 損なわれていたが、PSPC1との弱い相互作用が観察された (図 16D,E) (Lee et al., 2015; Huang et al., 2018)。対照的に SFPQ ΔPLD は、WT の SFPQ と同程度に、 SFPQ および NONO、PSPC1 と相互作用した (図 16D,E)。 以上の結果から、 SFPQ の RRM2/NOPS ドメインと CC ドメインの欠失変異体は、おそらく DBHS family タン パク質との相互作用が損なわれたことにより、分離機能の欠損を相補できなかったこと が示唆された。一方で、PLDの欠失変異体は異なるメカニズムによりmini-PSの分離 欠損の機能相補ができなかった可能性が考えられた。

# 2.7 SFPQ の PLD に濃縮して存在するプロリンとグルタミンは mini-PS の分離欠損の効率的な機能相補に必要である

SFPQ の PLD (33–265 アミノ酸) は効率的な分離欠損の機能相補に必要であった。 SFPQ の PLD には、プロリンとグルタミン、グリシン、ヒスチジンが濃縮して存在してい る (図 15A–E)。これらのアミノ酸の機能的な重要性を調べるために、PLD に存在する プロリンを部分的にアラニンに置換した変異体 (P to A partial) とグルタミンをグリシン に置換した変異体 (Q to G) をそれぞれ作成した (図 15A)。これらの PLD アミノ酸置 換変異体は、 $\Delta$ PLD と同様に、mini-PS の分離欠損を効率的に機能相補することが できなかった (図 16A–C)。これらの PLD アミノ酸置換変異体は、MCP-SFPQ WT と 同様に、DBHS family タンパク質と相互作用することができた (図 16D,E)。以上の結 果から、SFPQ の PLD に存在するプロリンとグルタミンは、PS の分離プロセスに必要 であることが示唆された。また、SFPQ と DBHS family タンパク質との相互作用は mini-PS の分離欠損の機能相補には十分でないことが示された。





Β

#### SFPQ (707 aa)

С

MSRDRFRSRGGGGGGGFHRRGGGGGGGGGGLHDFRSPPPGMGL NQNRGPMGPGPGQSGPKPPIPPPPHQQQQQPPPQQPPPQ QPPPHQPPPHPQPHQQQQPPPPPQDSSKPVVAQGPGPAPG ŇGSAPPASSSAPPAŤPPŤSGAPPGSGPGPTPTPPPAVTSA PPGAPPPTPPSSGVPTTPPQAGGPPPPPAAVPGPGPGPKQ GPGPGGPKGGKMPGGPKPGGGPGLSTPGGHPKPPHRGGGE PRGGRQHHPPYHQQHHQGPPPGGPGGRSEEKISDSEGFKA NLSLLRRPGEKTYTQRCRLFVGNLPADITEDEFKRLFAKY GEPGEVFINKGKGFGFIKLESRALAEIAKAELDDTPMRGR QLRVRFATHAAALSVRNLSPYVSNELLEEAFSQFGPIERA **VVIVDDRGRSTGKGIVEFASKPAARKAFERCSEGVFLLTT** TPRPVIVEPLEQLDDEDGLPEKLAQKNPMYQKERETPPRF AQHGTFEYEYSQRWKSLDEMEKQQREQVEKNMKDAKDKLE SEMEDAYHEHOANLLRODLMRROEELRRMEELHNOEMOKR KEMQLRQEEERRRREEEMMIRQREMEEQMRRQREESYSRM GYMDPRERDMRMGGGGAMNMGDPYGSGGQKFPPLGGGGGGI GYEANPGVPPATMSGSMMGSDMRTERFGQGGAGPVGGQGP RGMGPGTPAGYGRGREEYEGPNKKPRF



## 図 15. 人為的繋留実験に用いた MCP-SFPQ WT と変異体の模式図と SFPQ PLD のアミノ酸配列の特徴

(A) 人為的繁留実験に用いた MCP-SFPQ WT と変異体の模式図。SFPQ の PLD におけるプロリンとグルタミンの位置をそれぞれオレンジと青で示す。(B) PLAAC (上) と PONDR (下)を用いた、SFPQ の PLD と天然変性領域の予測を示したグラフ。(C) SFPQ のアミノ酸配列。PLD を赤字で示す。(D,E) COMPOSITION PROFILER

(http://www.cprofiler.org/cgi-bin/profiler.cgi) を用いて検出した、SFPQ PLD に おける各アミノ酸の濃縮・欠乏パターンを示したグラフ。



図 16. MCP-SFPQ WT と変異体を用いた mini-PS の NS からの分離欠損の機能 相補実験

(A) MCP-SFPQ WT あるいは変異体を mini-NEAT1/6×MS2@8.2kb (左) ある

いは mini-NEAT1 (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5 µM、6 時 間) において PSとNSを観察した。NEAT1 RNAを smRNA-FISH 法により検出し た (マゼンタ)。 NS のマーカータンパク質である SRRM2 (緑) と MCP-PSP (シアン) は蛍光免疫染色法により検出した。白い四角で囲んでいる領域を拡大して示す。スケ ールバー: 10 μm。(B) A において、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合 を定量したグラフ。データは3回の独立した実験から集計した。mini-NEAT1/6×MS2@8.2 kb: n = 61 (WT), n = 62 ( $\Delta RRM2/NOPS$ ), n = 67 ( $\Delta CC$ ), n= 66 ( $\Delta$ PLD), n = 76 ( $\Delta$ DBD), n = 61 ( $\Delta$ G-rich), n = 60 (Q to G), n = 64 (P to A partial); mini-NEAT1: n = 59 (WT), n = 63 ( $\Delta RRM2/NOPS$ ), n = 62 ( $\Delta CC$ ), n =67 ( $\Delta$ PLD), n = 66 ( $\Delta$ DBD), n = 60 ( $\Delta$ G-rich), n = 61 (Q to G), n = 58 (P to A partial)。(C) A における、MCP-SFPQ WT と変異体のウエスタンブロット解析。抗 FLAG 抗体を用いて、MCP-SFPQ WT と変異体を検出した。GAPDH はローディン グコントロールとして用いた。(D) MCP-SFPQ WT と変異体を用いた共免疫沈降実験。 ウエスタンブロットにより、サンプル中の NONO と PSPC1 を検出した。GAPDH はロ ーディングコントロールとして用いた。(E) MCP-SFPQ WT あるいは変異体と HA タグ を付加した SFPQ との共免疫沈降実験。ウエスタンブロットにより、サンプル中の HA タグを付加した SFPQ を抗 HA 抗体を用いて検出した。GAPDH はローディングコン トロールとして用いた。

# 2.8 SFPQ による PS のアセンブリー機能は mini-PS の NS との分離誘導には不十分である

mini-NEAT1 変異体からさらに RNA 領域を欠失した、m13–16.6k 変異細胞株で は、PS のアセンブリー機能が損なわれていた。この変異体 RNA への SFPQ の繋留 は、PS のアセンブリー欠損の機能相補が可能であった (Yamazaki et al., 2018)。 そこで、アセンブリーを誘導する機能と PS と NS の分離を誘導する機能との関係性を 調べた。その結果、ほとんどの SFPQ 変異体では PS のアセンブリー機能が損なわれ ていたが、mini-PS の NS からの分離誘導機能が損なわれていた Q to G 変異体は WT と同様に、PS のアセンブリー欠損の機能相補が可能であった (図 17A,B)。以上 のことから、これら 2 つの機能は区別可能であり、PS のアセンブリー機能は mini-PS の分離欠損の機能相補には十分ではないことが示された。



図 17. MCP-SFPQ WT と変異体を用いた PS のアセンブリー欠損の機能相補実験 (A) MCP-SFPQ WT あるいは変異体を m13–16.6k / 6 × MS2BS (左) あるいは m13–16.6k (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5  $\mu$ M、6 時間) にお いて PS を観察した。NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。MCP-SFPQ WT あるいは変異体 は抗 FLAG 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検出し た (マゼンタ)。核は DAPI を用いて染色した (青)。スケールバー: 10  $\mu$ m。(B) A にお いて、核内の PS の面積を定量した。箱ヒゲ図により、平均値 (中央線)、25–75% (箱 の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端) を示す。データは、Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn multiple comparison test を用いて検定を行 った。\*\*\*\*P< 0.0001、\*\*\*P< 0.001、\*\*P< 0.01。m13–16.6k/6×MS2BS: n = 78 (WT), n = 54 ( $\Delta$ RRM2/NOPS), n = 65 ( $\Delta$ CC), n = 62 ( $\Delta$ PLD), n = 78 (Q to G), n = 66 (P to A partial); m13–16.6k: n = 58 (WT), n = 56 (P to A partial)。 実験結果 3: PS のシェルに局在する U2 snRNP の因子は NS への取り 込みを誘導する

## 3.1 m9.8-16.6k 変異細胞株における PS は NS から独立して存在する

mini-PS は NS の内部に取り込まれるが、別の MLO には取り込まれない。そこで、 特定の因子がこの特定の MLO への取り込みを制御しているのではないかと考えた。 この分子メカニズムを明らかにするために、mini-PS の NS への取り込みに必要な RNA サブドメインを探索した。先行研究において樹立した mini-NEAT1 から更に RNA を欠失した m9.8–16.6k 変異細胞株において (図 18A) (Yamazaki et al., 2018)、PS は NS とは独立して存在していた (図 18B,C)。加えて、m9.8–16.6k 変異 細胞株では、NS からの分離を誘導する因子である SFPQ や BRG1 の局在量が回復 していないことも確認した (図 18D,E)。以上の結果から、8–9.8 kb 領域の RNA サブ ドメインは、mini-PS の NS への取り込みを促進することが示唆された。



図 18. m9.8-16.6k 変異細胞株における PSとNSの観察

(A) WT と mini-NEAT1 変異体、m9.8–16.6k 変異体の遺伝子構造の概略図。
RNA-FISH 解析において用いた RNA プローブの位置を下に示す。(B) MG132
(5µM、6時間)で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1、m9.8-16.6k 変異細胞
株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ)の SRM 画像。スケールバー: 500

nm。(C) B において、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラ フ。WT: n = 104, mini-NEAT1: n = 100、m9.8-16.6k: n = 110。(D) MG132 (5  $\mu$ M、6時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1、m9.8-16.6k 変異細胞株 における、NEAT1 (白) と BRG1 (緑)、SFPQ (マゼンタ) の観察。核は DAPI を用い て染色した (青)。スケールバー: 10  $\mu$ m。(E) D における、SFPQ あるいは BRG1 と NEAT1 の蛍光強度比 (PSP/NEAT1) の定量。箱ヒゲ図により、平均値 (中央線)、 25–75% (箱の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端) を示す。データは、 Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn multiple comparison test を用いて 検定を行った。\*\*\*\**P*< 0.0001。全てのサンプルで n = 30。

## 3.2 mini-PSのNSへの取り込みに必要なNEAT1の8-9.8kb領域にはU2 snRNP に関連するタンパク質が相互作用する

次に、NEAT1の8-9.8 kb 領域に相互作用するタンパク質が mini-PSのNSへの 取り込みに寄与しているという仮説を立てた。NEAT1の8-9.8 kb 領域に結合するタ ンパク質を網羅的に同定するために、NEAT1の8-9.8kbのRNA領域をカバーする 2 種類の RNA プローブを用いて in vitro RNA プルダウン実験とそれに続く MS 解 析を行った。その結果、既知の PSP のみではなく、スプライソソームの U2 snRNP に 関連するタンパク質である SF3B 複合体の構成因子や SF1 を含む 100 種類以上の タンパク質を同定した (図 19A,B、表 5)。以前に報告された TSA-MS 解析により同定 された NS の構成因子と今回同定された NEAT1 2の 8-9.8 kb 領域と相互作用す るタンパク質を比較したところ、顕著なオーバーラップが確認できた(図 19C)(Dopie et al., 2020)。さらに、近位依存性ビオチン標識技術を用いた HyPro-MS 解析により 同定された PSPとTSA-MS 解析により同定された NS の構成因子の間においても類 似したオーバーラップが確認され、オーバーラップするタンパク質群には U2 snRNP に関連するタンパク質が多く含まれていた (図 19D,E) (Dopie et al., 2020; Yap et al., 2022)。このようにオーバーラップするタンパク質間相互作用ネットワークは、独立 した MLO 間の相互作用にも重要であることが示唆されている (Sanders et al., 2020)。 以上の結果から、U2 snRNP に関連するタンパク質が PS と NS 間の相互作用に寄 与する可能性が示唆された。

## 表 5. NEAT1 の 8–9.2 kb と 9.2–9.8kb の RNA プローブを用いた RNA プルダウン と MS 解析により同定されたタンパク質の一覧

	initial_alias	converted_alias	name	description	unique peptide #
1	SF3B1	ENSG00000115524	SF3B1	splicing factor 3b subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10768]	215
2	DHX15	ENSG00000109606	DHX15	DEAH-box helicase 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2738]	183
3	SF3B3	ENSG00000189091	SF3B3	splicing factor 3b subunit 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10770]	162
4	CCAR1	ENSG0000060339	CCAR1	cell division cycle and apoptosis regulator 1 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:24236]	128
5	U2SURP	ENSG00000163714	U2SURP	U2 snRNP associated SURP domain containing [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:30855]	121
6	SE3B2	ENSG0000087365	SE3B2	splicing factor 3b subunit 2 [Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:10769]	114
7	HNBNPI	ENSG00000104824	HNRNPI	heterogeneous nuclear ribonucleonrotein L. (Source:HGNC:Svmbol:Acc:HGNC:5045)	100
		ENSG00000105323	HNRNPLII 1	heteroneneous nuclear ribonucleonrotein 11 like 1 (Source:HGNC Symbol: Acc:HGNC:17011)	99
0		ENEC0000011304		neterogeneous nuclear monacleopholem o me i [Source: I circo Symbol; Acc: I circo Tro Trj	55
9	PIEPO	ENGG00000011304	PIBPI	polypyinniane raci binang poten i [obuce.nano symbol,Acc.nano.ssss]	31
10	PUF60	ENSG00000179950	P0F60	poly(o) binding splicing ractor to [Source:Highe Symbol;Acc:Highe:17042]	95
11	SF3A3	ENSG00000183431	SF3A3	splicing factor 3a subunit 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10767]	93
12	SNRNP200	ENSG00000144028	SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein U5 subunit 200 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30859]	91
13	SF3A1	ENSG00000099995	SF3A1	splicing factor 3a subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10765]	91
14	KHSRP	ENSG0000088247	KHSRP	KH-type splicing regulatory protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6316]	90
15	HNRNPA2B1	ENSG00000122566	HNRNPA2B1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5033]	87
16	U2AF2	ENSG0000063244	U2AF2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23156]	82
17	DDX5	ENSG00000108654	DDX5	DEAD-box helicase 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2746]	79
18	DHX9	ENSG00000135829	DHX9	DExH-box helicase 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2750]	79
19	CHERP	ENSG0000085872	CHERP	calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16930]	74
20	FUBP1	ENSG00000162613	FUBP1	far upstream element binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4004]	71
21	RBM17	ENSG00000134453	RBM17	RNA binding motif protein 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16944]	70
22	PRPF8	ENSG00000174231	PRPF8	pre-mRNA processing factor 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17340]	69
23	SF1	ENSG00000168066	SF1	splicing factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12950]	69
24	ELAVL1	ENSG0000066044	ELAVL1	ELAV like RNA binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3312]	61
25	RBM25	ENSG00000119707	RBM25	RNA binding motif protein 25 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:23244]	03
25	DAZAP1	ENSG0000071626	DAZAP1	DAZ associated protein 1 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:2683]	50
20	MATR3	ENSG0000015479	MATR3	matrin 3 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:6912]	58
20		ENEC00000125044		hatemaanaaua sudaar iibanudaanatain B.Rausa iHONC Sumbali AasiHONC/50471	50
28		EN3G00000123944			54
29	HBM39	ENSG00000131051	HBM39	HNA binding motif protein 39 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15923]	54
30	HNRNPA3	ENSG00000170144	HNRNPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24941]	54
31	EFTUD2	ENSG00000108883	EFTUD2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30858]	54
32	SRSF1	ENSG00000136450	SRSF1	serine and arginine rich splicing factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10780]	53
33	RBM10	ENSG00000182872	RBM10	RNA binding motif protein 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9896]	52
34	EIF4A3	ENSG00000141543	EIF4A3	eukaryotic translation initiation factor 4A3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18683]	51
35	CPSF1	ENSG0000071894	CPSF1	cleavage and polyadenylation specific factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2324]	50
36	HNRNPK	ENSG00000165119	HNRNPK	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5044]	49
37	HNRNPM	ENSG0000099783	HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5046]	48
38	SNRPA1	ENSG00000131876	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A' [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11152]	48
39	SNRNP70	ENSG00000104852	SNRNP70	small nuclear ribonucleoprotein U1 subunit 70 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11150]	47
40	HNRNPH1	ENSG00000169045	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5041]	44
41	PCBP1	ENSG00000169564	PCBP1	polv/rC) binding protein 1 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:8647]	42
42	SF3B6	ENSG00000115128	SF3B6	splicing factor 3b subunit 6 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:30096]	37
43	CPSE2	ENSG00000165934	CPSE2	cleavage and polyadenviation specific factor 2 [Source HGNC Symbol: Acc: HGNC 2325]	36
40		ENSG00000152795		haterogeneous puckers ribonucleoprotein Dilke (Source:HGNC Symbol; Acc:HGNC:5037)	36
44		ENEC000000132733	ELIC	ELIC BMA hinding protein Reuros/HONC Symbol: AcatHONC 40101	25
45	PRPE40A	ENSC000001069280	PPPE40A	n oo niiva oinoinig protein jaaanaa aa isaanaa aa isaanaa ka isaa ka ahaa ka ahaa ka ahaa ka ahaa ka ahaa ahaa ka ah	35
46	CT040	ENG00000196504	C 112740A	preminina processing factor 40 nomolog A (Source: Holino Symbol;Acc:HGNG:16463)	34
47	5F3A2	ENSG0000104897	5F3A2	spiicing ractor sa subunit 2 [Source:HGNU Symbol;Acc:HGNU:10766]	34
48	ACIN1	ENSG00000100813	ACIN1	apoptotic chromatin condensation inducer 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17066]	34
49	HNRNPA0	ENSG00000177733	HNRNPA0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5030]	33
50	SF3B4	ENSG00000143368	SF3B4	splicing factor 3b subunit 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10771]	32
51	SYNCRIP	ENSG00000135316	SYNCRIP	synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16918]	32
52	ALYREF	ENSG00000183684	ALYREF	Aly/REF export factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19071]	31
53	DDX3X	ENSG00000215301	DDX3X	DEAD-box helicase 3 X-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2745]	31
54	RBMX	ENSG00000147274	RBMX	RNA binding motif protein X-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9910]	31
55	SNRPD3	ENSG00000100028	SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11160]	30
56	THRAP3	ENSG0000054118	THRAP3	thyroid hormone receptor associated protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22964]	30
57	CPSF7	ENSG00000149532	CPSF7	cleavage and polyadenylation specific factor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30098]	27
58	SRSF7	ENSG00000115875	SRSF7	serine and arginine rich splicing factor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10789]	27
59	LUC7L3	ENSG00000108848	LUC7L3	LUC7 like 3 pre-mRNA splicing factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24309]	27
60	NUDT21	ENSG00000167005	NUDT21	nudix hydrolase 21 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13870]	25
61	HNRNPAB	ENSG00000197451	HNRNPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5034]	25
62	HNRNPD	ENSG00000138668	HNRNPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:5036]	25
63	SRSF11	ENSG00000116754	SRSF11	serine and arginine rich solicing factor 11 [Source:HGNC Symbol:Acc:HGNC:10782]	25
64	BPS7	ENSG00000171862	BPS7	ribosomal protein S7 [Source:HGNC Symbol: 4co:HGNC:10440]	23
04	SNEPR2	ENSG00000105070	SNEPB2	email nuclear ribonucleanratein natureantide 82 [Source:HGNC Sumbal: Ass:HGNC:444551	23
65	EID111	ENS00000125870		amaii nuulear nuunuuleen putypepitue oo joutue.nuno Symbol Acc.nuno.11155j	23
66		ENG000000145216		nacion interación y mili FAFOLA and CFOFT (Jourios, Indive Symbol, ACC, Marko, 19124)	22
67	SHHM2	ENSG00000167978	SHHM2	semie/arginine repetitive matrix 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16639]	22
68	EWSR1	ENSG00000182944	EWSR1	EWS HNA binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3508]	21
69	HPS4X	ENSG00000198034	HPS4X	nbosomal protein S4 X-linked [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10424]	21
70	RPL31	ENSG00000071082	RPL31	ribosomal protein L31 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10334]	20

71	DDX17	ENSG00000100201	DDX17	DEAD-box helicase 17 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2740]	20
72	SNRPD1	ENSG00000167088	SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11158]	20
73	TIAL1	ENSG00000151923	TIAL1	TIA1 cytotoxic granule associated RNA binding protein like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11804]	20
74	KHDRBS1	ENSG00000121774	KHDRBS1	KH RNA binding domain containing, signal transduction associated 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18116]	19
75	BUB3	ENSG00000154473	BUB3	BUB3 mitotic checkpoint protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1151]	18
76	DDX42	ENSG00000198231	DDX42	DEAD-box helicase 42 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18676]	18
77	WDR33	ENSG00000136709	WDR33	WD repeat domain 33 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25651]	17
78	CSTF3	ENSG00000176102	CSTF3	cleavage stimulation factor subunit 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2485]	17
79	PNN	ENSG00000100941	PNN	pinin, desmosome associated protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9162]	17
80	CPSF6	ENSG00000111605	CPSF6	cleavage and polyadenylation specific factor 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13871]	17
81	SAP18	ENSG00000150459	SAP18	Sin3A associated protein 18 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10530]	17
82	SRSF3	ENSG00000112081	SRSF3	serine and arginine rich splicing factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10785]	17
83	THOC2	ENSG00000125676	THOC2	THO complex 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19073]	17
84	DHX36	ENSG00000174953	DHX36	DEAH-box helicase 36 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14410]	16
85	IGF2BP1	ENSG00000159217	IGF2BP1	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28866]	16
86	HNRNPU	ENSG00000153187	HNRNPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5048]	15
87	PRPF4B	ENSG00000112739	PRPF4B	pre-mRNA processing factor 4B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17346]	15
88	ILF2	ENSG00000143621	ILF2	interleukin enhancer binding factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6037]	14
89	CIRBP	ENSG00000099622	CIRBP	cold inducible RNA binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1982]	14
90	NONO	ENSG00000147140	NONO	non-POU domain containing octamer binding [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7871]	13
91	SFPQ	ENSG00000116560	SFPQ	splicing factor proline and glutamine rich [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10774]	13
92	SRRM1	ENSG00000133226	SRRM1	serine and arginine repetitive matrix 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16638]	13
93	SNRPD2	ENSG00000125743	SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11159]	13
94	SMU1	ENSG00000122692	SMU1	SMU1 DNA replication regulator and spliceosomal factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18247]	12
95	TRA2B	ENSG00000136527	TRA2B	transformer 2 beta homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10781]	12
96	SREK1	ENSG00000153914	SREK1	splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17882]	12
97	CPSF3	ENSG00000119203	CPSF3	cleavage and polyadenylation specific factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2326]	11
98	POLDIP3	ENSG00000100227	POLDIP3	DNA polymerase delta interacting protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23782]	11
99	HNRNPC	ENSG00000092199	HNRNPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5035]	10
100	HNRNPF	ENSG00000169813	HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5039]	10
101	TRIR	ENSG00000123144	TRIR	telomerase RNA component interacting RNase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28424]	10



## 図 19. *in vitro* RNA プルダウンと MS 解析による NEAT1 の 8–9.8 kb 領域と相互 作用するタンパク質の探索

(A) 8–9.2 kb と 9.2–9.8 kb の 2 種類の RNA probe を用いて行った *in vitro* RNA プルダウンと MS 解析により同定したタンパク質に対して GO:CC 解析を行った。上位 10 種類の GO term を図に示す。(B) 8–9.2 kb あるいは 9.2–9.8 kb の RNA probe

を用いた *in vitro* RNA プルダウンと MS 解析により同定したタンパク質の比較を示し たベン図。2 種類の RNA プローブから得られたタンパク質はほとんどがオーバーラッ プしていた。(C) RNA プルダウン (8–9.2 kb と 9.2–9.8 kb) と SC35 TSA-MS の結 果の比較を示したベン図 (Dopie et al., 2020)。(D) HyPro-MS と SC35 TSA MS の 結果の比較を示したベン図 (Dopie et al., 2020; Yap et al., 2022)。(E) D おいて、 オーバーラップしていた 31 種類のタンパク質に対して GO:CC 解析を行った。上位 10 種類の GO term を図に示す。

# 3.3 U2 snRNP に関連するタンパク質の PS のシェルへの人為的な繋留は PS の NS 内部への取り込みを誘導する

同定した U2 snRNP に関連するスプライソソームタンパク質が PS の NS への内在 化に寄与するのかを解析するために、WT の NEAT1\_2 に 6 × MS2BS をノックイン した細胞株において、MS 解析により同定されたタンパク質 (SF1、SF3B4、U2AF2、 SF3A3、PTBP1) を PS に繋留した (図 20A)。まず、WT の NEAT1\_2 の 5'側 (1.4 kb) に 6 × MS2BS をノックインした細胞株を用いて、PS のシェルにタンパク質を繋 留した。その結果、SF1 あるいは SF3B4、SF3A3 を PS のシェルに繋留した場合、 WT の PS が NS の内部に取り込まれる様子が観察された (図 20A–D)。一方で、 U2AF2 や PTBP1 の繋留では、PS は NS とは分離していた (図 20A–D)。次に、WT の NEAT1\_2 の中央領域 (14 kb) に 6 × MS2BS をノックインした細胞株を用いて、 PS のコアにタンパク質を繋留した。その結果、SF1 あるいは SF3B4、SF3A3、 U2AF2、PTBP1 を PS のコアに繋留した場合、PS の NS への内在化は観察されな かった (図 20A–D)。



#### 図 20. U2 snRNP 関連タンパク質の PS への繋留実験

(A) WTの NEAT1 2の5'側 (1.4 kb) あるいは中央領域 (14 kb) に 6 × MS2BS をノックインした細胞株の模式図。(B) MCP 融合タンパク質を NEAT1/6×MS2@1.4 kb (左)、NEAT1/6×MS2@14 kb (中央)、WT (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5 µM、6 時間) において PS と NS を観察した。 NEAT1 RNA を smRNA-FISH 法により検出した (マゼンタ)。NS のマーカータンパク質である SON (緑)とMCP融合タンパク質(シアン)は蛍光免疫染色法により検出した。白い四角で 囲んでいる領域を拡大して示す。スケールバー: 5 μm。(C) B において、NS と分離あ るいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフ。データは 3 回の独立した実験 から集計した。NEAT1/6 x MS2BS@1.4 kb; n = 62 (MCP-SF1), n = 63 (SF3B4-MCP), n = 60 (SF3A3-MCP), n = 63 (MCP-U2AF2), n = 59 (MCP-PTBP1), NEAT1/6 x MS2BS@14 kb; n = 62 (MCP-SF1), n = 63 (SF3B4-MCP), n = 61 (SF3A3-MCP), n = 61 (MCP-U2AF2), n = 59 (MCP-PTBP1), WT; n = 63 (MCP-SF1), n = 62 (SF3B4-MCP), n = 62 (SF3A3-MCP), n = 62 (MCP-U2AF2), n =64 (MCP-PTBP1). (D) B における、MCP 融合タンパク質のウエスタンブロット解析。 抗 FLAG 抗体を用いて、MCP-タンパク質を検出した。GAPDH はローディングコント ロールとして用いた。

## 3.4 U2 snRNP の主要な構成因子である SF3B1 は PS のシェルに局在する

U2 snRNP 関連因子の PS シェルへの局在がその核内における局在を決めるのに 重要であることと一致して、SF3B 複合体の主要な構成因子である SF3B1 は、特に mini-PS において、PS のシェルに局在することが観察された(図 21A,B)。この結果 から、SFPQ や BRG1、HNRNPF の PS へのリクルートと SF3B1 のリクルートが WT とmini-NEAT1変異細胞株間で逆相関していることが観察された(図 10A,B, 21A,B)。 以上の結果から、PS のシェルに局在する U2 snRNP 関連因子が PS の NS への取 り込みを誘導することが示唆された。



図 21. U2 snRNP の主要な構成因子である SF3B1 は PS のシェルに局在する (A) MG132 (5 $\mu$ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞 株における、NEAT1 (緑) と SF3B1 (マゼンタ) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。(B) PS のシェルあるいはコアにおける SF3B1 の平均蛍光強度の定量。箱ヒゲ 図により、平均値 (中央線)、25–75% (箱の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端 と上端) を示す。データは、Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn multiple comparison test を用いて検定を行った。\*\*\*\*P< 0.0001, \*\*P< 0.01。全てのサン プルで n = 31。

## 3.5 U2 snRNP の阻害剤と U2 snRNA のノックダウンにより mini-PS の NS からの 分離を誘導された

最後に、mini-PSのNSへの取り込みにおいて、U2 snRNPが複合体として寄与しているのかについての知見を得ることを試みた。まず、U2 snRNPのアセンブリーを阻害する SSA と PlaB をそれぞれ mini-NEAT1 変異細胞株に処理した (Kaida et al., 2007; Kotake et al., 2007)。その結果、これらの薬剤の処理により、mini-PSのNSからの顕著な分離が観察された (図 22A,B)。さらに、ASOを用いた U2 snRNAのノックダウン実験を行った。これまでの結果と一致して、U2 snRNAのノックダウンによりmini-PSのNSからの分離が観察された (図 22C-D)。これらの観察結果は、U2 snRNP が複合体として mini-PSのNSへの取り込みに寄与している仮説をサポートするものであると考えられた。





(A) SSA (100 ng/ml) あるいは PlaB (1 μM) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) とSRRM2 (マゼンタ) の SRM 画像。 MeOH はメタノールを示し、ネガティブコントロールとして用いた。スケールバー: 500 nm。(B) A における、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量 したグラフ。30min 処理: n = 208 (MeOH)、n = 131 (SSA)、n = 125 (PlaB)、 60min 処理: n = 196 (MeOH)、n = 115 (SSA)、n = 133 (PlaB)。(C)ASO を トランスフェクションし、その後 MG132 (5 μM、6 時間) で処理した mini-NEAT1 変異細胞株における NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ) の SRM 画像。GFP と U13 snoRNA に対する ASO をネガティブコントロールとして用いた。スケールバ ー: 500 nm。(D) C における、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を 定量したグラフ。GFP ASO: n = 185, U2 ASO: n = 131, U13 ASO: n = 185。
(E) C,D における、RT-qPCR 法を用いた U2 snRNA の発現量の定量。データ は 18S RNA によりノーマライズした。n = 3。エラーバーは平均値±標準偏差を 示す。

## 考察

これまでに PS の形成や機能に関連する NEAT1 の複数の機能ドメインが同定され てきた (Yamazaki et al., 2018, 2021; Modic et al., 2019)。本研究は、PS が独立し た MLO として形成されるために必要不可欠な新規の RNA 機能ドメイン (1-8 kb と 16.6-20.2kbドメイン)を同定した。これら 2 つの RNA 機能ドメインは PS のシェル局 在することが報告されている (Souquere et al., 2010; Yamazaki et al., 2018, 2021)。 また、これらの NEAT1 機能ドメインは SFPQ や BRG1、HNRNPF などの PS の NS からの分離に必要な PSP のリクルートを促進する。これらの観察結果と一致して、 SFPQ や BRG1、HNRNPF タンパク質の PS のシェルへの繋留により、mini-PS が NSと分離し、隣接した。この分離誘導は、PS のコアへの繋留では観察されなかった。 本研究は arcRNA の異なる領域にタンパク質を繋留することによりメゾスコピックなス ケールの MLO の特定の領域の性質を調節することが可能であることを示した点で非 常に画期的な成果であると言える。RNP がブロック共重合体ミセルとして機能する分 子基盤を解明することにより、人工的にデザインすることが可能な、特定の構造や機 能、性質を持つ人工凝集体の創出に期待ができる。

本研究では、PSのNSからの分離に寄与する主要な因子としてSFPQタンパク質を 同定した。SFPQ は NEAT1\_2 の発現と PS のアセンブリーに必要不可欠である (Naganuma et al., 2012; Yamazaki et al., 2018)。本研究における SFPQ の変異 体を用いた解析により、SFPQ の PLD やダイマー形成、オリゴマー形成ドメインが mini-PS の NS からの分離と PS のアセンブリーに必要であることが示された。SFPQ の PLD におけるグルタミンをグリシンに置換した変異体は、mini-PS の NS からの分 離は誘導できないが、PS のアセンブリーを誘導することができた。つまり、SFPQ は PS の分離とアセンブリーという 2 つの区別可能な機能を有していると考えられる。 SFPQ は PS のコアとシェルの両方に局在することから、PS のコア領域に結合する SFPQ が PS のアセンブリーの機能の役割を果たすことが考えられる。一方で、PS の NS からの分離に必要な NEAT1\_2 の機能ドメインは PS のシェルに局在することから、 シェルに局在する SFPQ が PS の NS からの分離の機能を果たしていることが予 想される。多機能分子である SFPQ に関する今後の研究成果が、PS シェルの機能的 な分子基盤を理解する上で重要であると考えている。

本研究では、SFPQ のような PS の NS からの分離を促進する因子だけではなく、通常では観察されない、PS の NS への取り込みに寄与するタンパク質として U2 snRNP に関連するタンパク質を同定した (図 23)。これらの観察結果は、PS がどのようにして

独立した MLO としての形成されるのかについての理解につながると考えられる。 NEAT1\_2 lncRNA は、mRNA と同様に Pol II により転写される。一般的に mRNA は NS に局在し、翻訳のために核から細胞質に輸送される (Dias et al., 2010)。 対照 的に、NEAT1\_2 lncRNA は Pol Ⅱによる転写後に核内に保持され、RNA の安定化 のために 3'末端には、polyA 鎖ではなく、Triple helix 構造を持つ (Brown et al., 2012; Wilusz et al., 2012)。そのため NEAT1\_2 は、スプライシングや poly A 付加、 核外輸送を含む一般的な mRNA の生合成経路からは逸脱した経路を介して成熟す ると言える。一方で NEAT1\_2 はスプライシングを受けないにもかかわらず、 NEAT1\_2 lncRNA の配列上には多数の SF1 が結合する可能性のあるブランチポイ ント配列が存在する (図 24)。 以上のことから、NEAT1\_2 は mRNA の生合成経路に 関連する因子の結合を阻害することにより、PSのアセンブリーを担うarcRNAとしての 機能を果たしていることが考えられた。このような分子メカニズムは、NEAT1\_2の正常 な成熟とそれに続く MLO の独立性維持に必要なコア・シェル構造を持つ PS のアセ ンブリーに重要であるのかもしれない。さらに、これまでに同定された arcRNA は基本 的にはスプライシングを受けないことが報告されている (Watanabe and Yamamoto, 1994; Prasanth et al., 2000; Sasaki et al., 2009; Biamonti and Vourc'h, 2010; Chujo et al., 2017)。また、SFPQ や HNRNPF、BRG1 はスプライシングを阻害する 機能がこれまでに報告されている (Huelga et al., 2012; Gordon et al., 2021; Stagsted et al., 2021; Gañez-Zapater et al., 2022)。このことは本研究において、 SFPQ/HNRNPF/BRG1のリクルートとU2 snRNPの主要な構成因子であるSF3B1 のリクルートとの間に逆相関の関係性が観察されたことと一致する。以上のことから、 PS が独立した MLO として形成されるために、転写と協調した NEAT1\_2 RNP 形成 が U2 snRNP のようなスプライシング因子との相互作用に拮抗的に作用している可能 性を考えている (図 25)。



図 23. シェルに局在するタンパク質が WT の PS と mini-PS の NS あるいは核質への局在を決定する

WTのPS(上)とmini-PS(下)におけるシェルあるいはコア領域への繋留実験結果の概略図



## 図 24. PSP と U2 snRNP 複合体の構成因子の eCLIP データと SF1 が結合するコ ンセンサス配列のマッピング図

NEAT1\_2 上にマッピングされた SF3B4 (HepG2 と K562 細胞株)、SF3B1 (K562 細胞株)、SF3A3 (HepG2 細胞株)、U2AF2 (HepG2 細胞株)、U2AF2 (K562 細胞 株)、SFPQ (HepG2 細胞株)、NONO (K562 細胞株) の eCLIP データ。SF1 が結 合するコンセンサス配列 (YNYURAY; Y = U or C, R = A or G, N = any nucleotide) の数と位置をスケールとともに上に示す。



図 25. PS のシェルに局在するタンパク質が NS との独立性を決定する分子機構を 示したモデル図

WT の NEAT1\_2 は、SFPQ や HNRNPF、BRG1 などの因子と転写と協調して NEAT1\_2 RNP を形成する。これにより、U2 snRNP 複合体などのスプライシングに 関連する因子のリクルートを阻害することが予想される。その結果として、WT の PS が NS とは独立した構造体として形成される。一方で、mini-NEAT1 RNA においては、 SFPQ などの分離を誘導するために必要なシェルに局在する RNA 領域が欠失して いる。このため、mini-NEAT1 RNA 上には SF3B1 のような U2 snRNP の構成因子 がリクルートされ、mini-PS の NS への取り込みが誘導されるモデルを考えている。 本研究により、ミセル化により形成される PS の特徴の 1 つであるコア・シェル構造の 重要性への理解が深まったと考えられる (Souquere et al., 2010; West et al., 2016; Yamazaki et al., 2021)。新規に形成された mini-PS は、NS の外に形成された後に コア・シェル構造を維持した状態で NS 内部に取り込まれる。本研究において同定した PS のシェルに局在するタンパク質は核質への局在あるいは NS への局在を制御する。 しかしながら、タンパク質のシェルへの局在というよりはむしろ NEAT1\_2 lncRNA の 5'側にタンパク質が結合することが重要である可能性を排除することはできない。その ため今後は、より詳細な分子機構の解明が必要である。

特定の MLO の構成因子の相互作用が LLPS により形成されるストレス顆粒と P ボ ディやカハール体と Gem のような MLO の近接性を制御していることが報告されてい る (Sanders et al., 2020; Courchaine et al., 2021)。NS では、U2 snRNA がその 表面領域に局在することが報告されている (Fei et al., 2017)。以上の先行研究と本 研究結果から、NS の表面に局在する U2 snRNP 関連因子の相互作用によって WT の PSの NS 近傍への局在が規定されているのではないかという可能性を考えている。 この考えは、U2 snRNP 関連のタンパク質が PS のシェルに局在する NEAT1\_5'末 端領域に優先的に相互作用することを示す eCLIP のデータからも支持されている (図 24)。また、U2 snRNA のノックダウンにより、U2 snRNA だけではなく、NEAT1\_2 の 発現量の減少が観察された (図 22E)。以上のことから、本研究で明らかになった分子 メカニズムは、PS と NS に局在する分子間の繋がりをとらえたものであると考えられ、こ れらの構造体同士が近接して存在する仕組みやその生理学的意義の解明に期待で きる。

## 結論

### 本研究全体から得られた知見

- NEAT1\_2 の 22.7 kb にも及ぶ RNA 領域の中から PS が NS と独立して存在す るために必要な新規の RNA 機能ドメインを同定した。
- PSのNSからの分離を促進する因子としてPSのシェルに局在するSFPQおよびHNRNPF、BRG1を同定した。
- mini-PSのNSの取り込みを誘導する因子としてU2 snRNPに関連する因子を 同定し、これらの因子のWTのPSのシェルへの局在はNSへの内在化を誘導した。

## 新知見の意義

本研究成果は、細胞内相分離の根源的なメカニズムの 1 つであるミセル化により形成される PS が核内に存在する他の相分離構造体と独立して存在する分子メカニズムを示した点で非常に画期的な成果であると言える。今後は、細胞内相分離が関係する様々な神経変性疾患などの発症メカニズムの解明に貢献することが期待される。

## 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか

人工的にデザインすることが可能な、特定の構造や機能、性質を持つ人工凝集体の 創出に展開されうる。

NEAT1\_2 lncRNA の機能解析の手法や知見をモデルとして、未だ明らかとなって いない arcRNA による MLO の形成機構やその生理的機能の解明に展開されうる。

### 今後の課題

本研究では、PS の NS からの分離機構に寄与するタンパク質として SFPQ や HNRNPF、BRG1 タンパク質を同定した。しかしながら、この分子機構に寄与する未 同定のタンパク質が存在する可能性もある。また、SFPQ などの因子が直接的に機能 するのか、それらの相互作用因子を介して間接的に寄与しているのかについても明ら かにする必要がある。NEAT1\_2 lncRNA の特定の RNA 領域が PS と他の MLO と の独立性を決定していることは驚くべき結果であった。今後は、この機能ドメインに存 在する特定の配列や RNA の 2 次構造を明らかにする必要がある。このことにより、 lncRNA 配列上に隠された、mRNA とは異なる様式の遺伝暗号解読につながること が期待できる。
## 謝辞

本研究の実施にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました、大阪大学生命機能研究 科 RNA 生体機能研究室の廣瀬哲郎教授に心より御礼を申し上げます。また、研究 の進め方や実験に対する考え方など懇切丁寧に指導してくださいました、大阪大学生 命機能研究科 特任講師の山崎智弘博士に心より感謝を致します。

北海道大学で博士課程の大学院生として、学位取得に取り組む機会を与えてくださいました、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学教室の村上正晃教授に 心より御礼申し上げます。

電子顕微鏡を用いた解析や論文の作成にあたり多大なるご協力とご助言を頂きました、フランス国立科学研究センターの Gerard Pierron 博士、Sylvie Souquere 氏に 心より御礼を申し上げます。国立研究開発法人産業技術総合研究所の夏目徹主席 研究員、足達俊吾主任研究員には、マススペクトロメトリー解析につきまして多大なる ご協力とご助言を頂きました。心より感謝を致します。北海道大学化学反応創成研究 拠点の山本哲也特任准教授には、実験結果の理論的な解釈にあたり多大なるご協力 とご助言を頂きました。深く感謝致します。北海道大学大学院薬学研究院の中川真一 教授には、超解像度顕微鏡を用いた解析にあたり多大なるご協力とご助言を頂きまし

本研究にご協力ならびに有意義な議論を頂きました、大阪大学生命機能研究科 RNA 生体機能研究室の皆様に深く感謝いたします。特に、特任講師の二宮賢介博 士、吉野彪羅さんには有意義な議論や実験にご協力いただきました。心よりお礼申し 上げます。秘書の藤田淳子さん、安井浩子さんには大阪大学での事務手続きや日々 の実験のサポートを行っていただきました。厚く御礼申し上げます。また、北海道大学 での事務手続きなどを行っていただいている北海道大学遺伝子病制御研究所分子 神経免疫学教室の秘書の皆様にも深く感謝いたします。

67

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Adriaens, C., Standaert, L., Barra, J., Latil, M., Verfaillie, A., Kalev, P., Boeckx, B., Wijnhoven, P.W.G., Radaelli, E., Vermi, W., et al. (2016). p53 induces formation of NEAT1 lncRNA-containing paraspeckles that modulate replication stress response and chemosensitivity. Nat. Med. *22*, 861–868.

Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. Cell. *176*, 419–434.

Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *18*, 285–298.

Biamonti, G. and Vourc'h, C. (2010). Nuclear Stress Bodies. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a000695–a000695.

Brown, J.A., Valenstein, M.L., Yario, T.A., Tycowski, K.T., and Steitz, J.A. (2012). Formation of triple-helical structures by the 3'-end sequences of MALAT1 and MENß noncoding RNAs. Proceedings of the National Academy of Sciences. *109*, 19202–19207.

Chen, L.-L. and Carmichael, G.G. (2009). Altered Nuclear Retention of mRNAs Containing Inverted Repeats in Human Embryonic Stem Cells: Functional Role of a Nuclear Noncoding RNA. Mol. Cell. *35*, 467–478.

Chujo, T., Yamazaki, T., Kawaguchi, T., Kurosaka, S., Takumi, T., Nakagawa, S., and Hirose, T. (2017). Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs. EMBO J. *36*, 1447–1462.

Chujo, T. and Hirose, T. (2017). Nuclear Bodies Built on Architectural Long Noncoding RNAs: Unifying Principles of Their Construction and Function. Mol. Cells. *40*, 889–896. Clemson, C.M., Hutchinson, J.N., Sara, S.A., Ensminger, A.W., Fox, A.H., Chess, A., and Lawrence, J.B. (2009). An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. Mol. Cell. *33*, 717–726.

Courchaine, E.M., Barentine, A.E.S., Straube, K., Lee, D.-R., Bewersdorf, J., and Neugebauer, K.M. (2021). DMA-tudor interaction modules control the specificity of in vivo condensates. Cell. *184*, 3612-3625.e17.

Dias, A.P., Dufu, K., Lei, H., and Reed, R. (2010). A role for TREX components in the release of spliced mRNA from nuclear speckle domains. Nat. Commun. *1*, 97.

Dopie, J., Sweredoski, M.J., Moradian, A., and Belmont, A.S. (2020). Tyramide signal amplification mass spectrometry (TSA-MS) ratio identifies nuclear speckle proteins. Journal of Cell Biology. *219*, e201910207.

Fei, J., Jadaliha, M., Harmon, T.S., Li, I.T.S., Hua, B., Hao, Q., Holehouse, A.S., Reyer, M., Sun, Q., Freier, S.M., et al. (2017). Quantitative analysis of multilayer organization of proteins and RNA in nuclear speckles at super resolution. J. Cell Sci. *130*, 4180–4192.

Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Lyon, C.E., Andersen, J., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002). Paraspeckles: A Novel Nuclear Domain. Current Biology. *12*, 13–25.

Fox, A.H., Bond, C.S., and Lamond, A.I. (2005). P54nrb Forms a Heterodimer with PSP1 That Localizes to Paraspeckles in an RNA-dependent Manner. Mol. Biol. Cell. *16*, 5304–5315.

Gañez-Zapater, A., Mackowiak, S.D., Guo, Y., Tarbier, M., Jordán-Pla, A., Friedländer, M.R., Visa, N., and Östlund Farrants, A.-K. (2022). The SWI/SNF subunit BRG1 affects alternative splicing by changing RNA binding factor interactions with nascent RNA. Molecular Genetics and Genomics. *297*, 463 - 484.

Gordon, P.M., Hamid, F., Makeyev, E.V., and Houart, C. (2021). A conserved role for the ALS-linked splicing factor SFPQ in repression of pathogenic cryptic last exons. Nat. Commun. *12*, 1918.

Hirose, T., Virnicchi, G., Tanigawa, A., Naganuma, T., Li, R., Kimura, H., Yokoi, T., Nakagawa, S., Bénard, M., Fox, A.H., et al. (2014). NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. Mol. Biol. Cell. *25*, 169–183.

Hirose, T., Yamazaki, T., and Nakagawa, S. (2019). Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. WIREs RNA *10*.

Huang, J., Casas Garcia, G.P., Perugini, M.A., Fox, A.H., Bond, C.S., and Lee, M. (2018). Crystal structure of a SFPQ/PSPC1 heterodimer provides insights into preferential heterodimerization of human DBHS family proteins. Journal of Biological Chemistry. *293*, 6593–6602.

Huelga, S.C., Vu, A.Q., Arnold, J.D., Liang, T.Y., Liu, P.P., Yan, B.Y., Donohue, J.P., Shiue, L., Hoon, S., Brenner, S., et al. (2012). Integrative Genome-wide Analysis Reveals Cooperative Regulation of Alternative Splicing by hnRNP Proteins. Cell Rep. *1*, 167–178.

Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Sato, H., Yoneda, M., et al. (2014). Long Noncoding RNA NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. Mol. Cell. *53*, 393–406.

Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., et al. (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. Nat. Chem Biol. 3, 576–583.

Kawaguchi, T., Tanigawa, A., Naganuma, T., Ohkawa, Y., Souquere, S., Pierron, G., and Hirose, T. (2015). SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. Proceedings of the National Academy of Sciences. *112*, 4304–4309.

Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., and Mizui, Y. (2007). Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. Nat. Chem. Biol. *3*, 570–575.

Lee, M., Sadowska, A., Bekere, I., Ho, D., Gully, B.S., Lu, Y., Iyer, K.S., Trewhella, J., Fox, A.H., and Bond, C.S. (2015). The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. Nucleic Acids Res. *43*, 3826–3840.

Lyon, A.S., Peeples, W.B., and Rosen, M.K. (2021). A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *22*, 215–235.

Mao, Y.S., Sunwoo, H., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. Nat. Cell Biol. *13*, 95–101.

Mello, S.S., Sinow, C., Raj, N., Mazur, P.K., Bieging-Rolett, K., Broz, D.K., Imam, J.F.C., Vogel, H., Wood, L.D., Sage, J., et al. (2017). *Neat1* is a p53inducible lincRNA essential for transformation suppression. Genes Dev. *31*, 1095–1108.

Modic, M., Grosch, M., Rot, G., Schirge, S., Lepko, T., Yamazaki, T., Lee, F.C.Y., Rusha, E., Shaposhnikov, D., Palo, M., et al. (2019). Cross-Regulation between TDP-43 and Paraspeckles Promotes Pluripotency-Differentiation Transition. Mol. Cell *74*, 951-965.e13.

Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y.F., Goshima, N., and

Hirose, T. (2012). Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles. EMBO J. *31*, 4020–4034.

Nakagawa, S., Shimada, M., Yanaka, K., Mito, M., Arai, T., Takahashi, E., Fujita, Y., Fujimori, T., Standaert, L., Marine, J.-C., et al. (2014). The lncRNA *Neat1* is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice. Development *141*, 4618–4627.

Perez, C.A.G., Adachi, S., Nong, Q.D., Adhitama, N., Matsuura, T., Natsume, T., Wada, T., Kato, Y., and Watanabe, H. (2021). Sense-overlapping lncRNA as a decoy of translational repressor protein for dimorphic gene expression. PLoS Genet. *17*, e1009683.

Prasanth, K.V., Rajendra, T.K., Lal, A.K., and Lakhotia, S.C. (2000). Omega speckles - a novel class of nuclear speckles containing hnRNPs associated with noncoding hsr-omega RNA in Drosophila. J. Cell Sci. *113*, 3485–3497.

Roden, C. and Gladfelter, A.S. (2021). RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *22*, 183–195.

Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., and Young, R.A. (2020). Biomolecular Condensates in the Nucleus. Trends Biochem. Sci. *45*, 961–977.

Sanders, D.W., Kedersha, N., Lee, D.S.W., Strom, A.R., Drake, V., Riback, J.A., Bracha, D., Eeftens, J.M., Iwanicki, A., Wang, A., et al. (2020). Competing Protein-RNA Interaction Networks Control Multiphase Intracellular Organization. Cell. *181*, 306-324.e28.

Sasaki, Y.T.F., Ideue, T., Sano, M., Mituyama, T., and Hirose, T. (2009). MENε/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. Proceedings of the National Academy of Sciences. *106*, 2525– 2530.

Shin, Y. and Brangwynne, C.P. (2017). Liquid phase condensation in cell physiology and disease. Science. *357*, eaaf4382.

Souquere, S., Beauclair, G., Harper, F., Fox, A., and Pierron, G. (2010). Highly Ordered Spatial Organization of the Structural Long Noncoding NEAT1 RNAs within Paraspeckle Nuclear Bodies. Mol. Biol. Cell. *21*, 4020–4027.

Stagsted, L.V.W., O'Leary, E.T., Ebbesen, K.K., and Hansen, T.B. (2021). The RNA-binding protein SFPQ preserves long-intron splicing and regulates circRNA biogenesis in mammals. Elife *10*, e63088.

Sunwoo, H., Dinger, M.E., Wilusz, J.E., Amaral, P.P., Mattick, J.S., and Spector, D.L. (2009). *MEN e/B* nuclear-retained non-coding RNAs are upregulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. Genome Res. *19*, 347–359.

Van Treeck, B., and Parker, R. (2018). Emerging Roles for Intermolecular RNA-RNA Interactions in RNP Assemblies. Cell. *174*, 791–802.

Visa, N., Puvion-Dutilleul, F., Bachellerie, J.P., and Puvion, E. (1993). Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution in situ hybridization: Revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells. Eur. J. Cell Biol. *60*, 308–321.

Watanabe, Y. and Yamamoto, M. (1994). S. pombe mei2+ encodes an RNAbinding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA. Cell. *78*, 487–498.

West, J.A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T., Yanaka, K., Kingston, R.E., Hirose, T., Bond, C., et al. (2016). Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. Journal of Cell Biology. *214*, 817–830.

Wilusz, J.E., JnBaptiste, C.K., Lu, L.Y., Kuhn, C.D., Joshua-Tor, L., and Sharp, P.A. (2012). A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. Genes Dev. *26*, 2392–2407.

Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y.S., Fox, A.H., Bond, C.S., Nakagawa, S., Pierron, G. and Hirose, T. (2018). Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. Mol. Cell. *70*, 1038-1053.e7.

Yamazaki, T., Yamamoto, T., Yoshino, H., Souquere, S., Nakagawa, S., Pierron, G., and Hirose, T. (2021). Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles. EMBO J. *40*, e107270.

Yamazaki, T. and Hirose, T. (2015). The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs. Frontiers in Bioscience *7*, 715.

Yamazaki, T. and Hirose, T. (2021a). Control of condensates dictates nucleolar architecture. Science. *373*, 486–487.

Yamazaki, T. and Hirose, T. (2021b). CRISPR-Mediated Mutagenesis of Long Noncoding RNAs. Methods in Molecular Biology 283–303.

Yamazaki, T., Nakagawa, S., and Hirose, T. (2019). Architectural RNAs for Membraneless Nuclear Body Formation. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *84*, 227–237.

Yamazaki, T., Yamamoto, T., and Hirose, T. (2022). Micellization: A new principle in the formation of biomolecular condensates. Front. Mol. Biosci. 9.

Yap, K., Chung, T.H. and Makeyev, E.V. (2022). Hybridization-proximity labeling reveals spatially ordered interactions of nuclear RNA compartments. Mol. Cell. *82*, 463-478.e11.