



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
Description	配架番号 : 2814
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15685号
Issue Date	2023-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15685
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91351
Type	doctoral thesis
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

目次

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.....	27
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	27
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.....	27
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	30
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	33
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	35
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.....	35
2.2 SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 の mini-PS への人為的な繫留は mini-PS の NS からの分離を誘導する	37
2.3 SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 の mini-PS コアへの人為的な繫留は mini-PS の NS からの分離を誘導しない.....	39
2.4 SFPQ と HNRNPF、BRG1 は WT の PS のシェルに局在する.....	41
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
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
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	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	49

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	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 snRNP 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繫留は PS の NS 内部への取り込みを誘導する	55
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	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.....	66
謝辞.....	67
利益相反	68
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

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 を繫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 上に人為的に繫留することで、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 のシェル領域に繫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 を繫留した場合は、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 を人為的に繫留した結果、SF1 の PS シェル領域への繫留により、PS の NS 内部への取り込みを観察できた。一方で、PS のコア領域へ繫留した場合には、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- β -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

緒言

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与す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)。

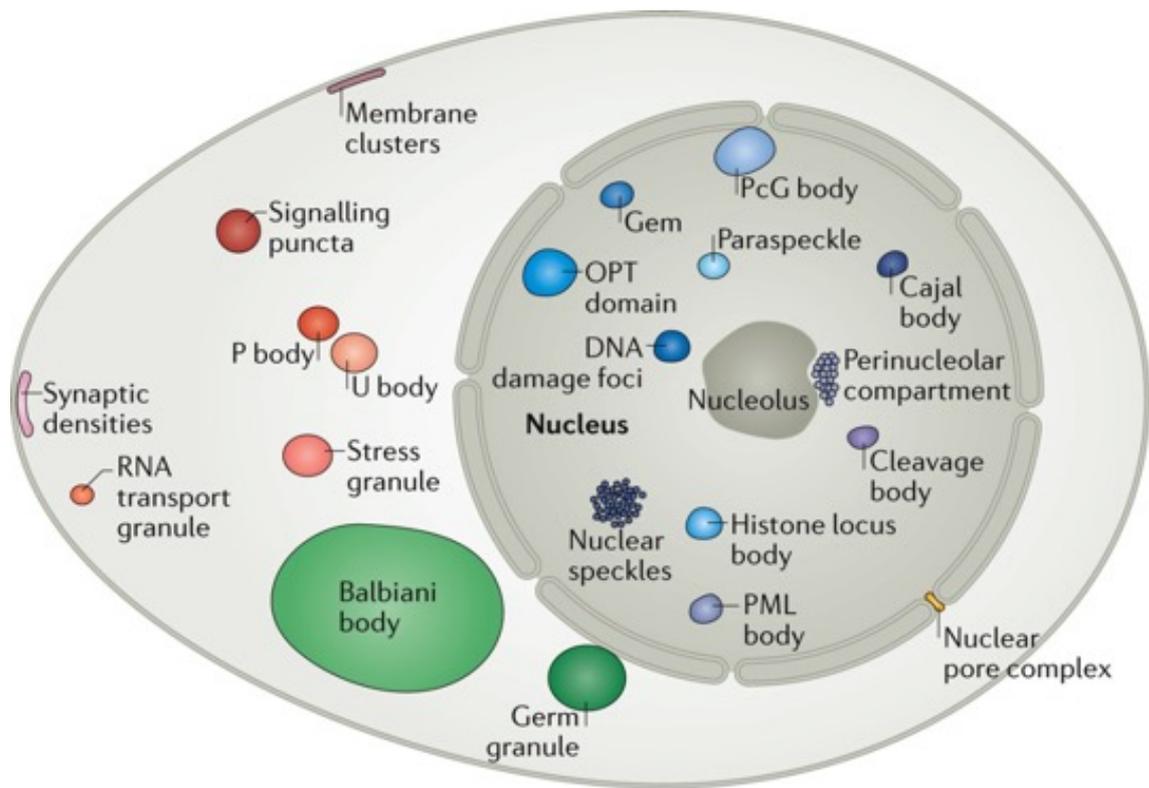


図 1. 真核生物の細胞内に存在する MLO、(Banani et al., 2017) より引用
 これまでに細胞質と核内に存在する MLO が多数同定されている。いくつかの MLO は特定の細胞株においてのみ観察されるが、ここではそれらも含めて示している。

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'末端プロセッ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)。

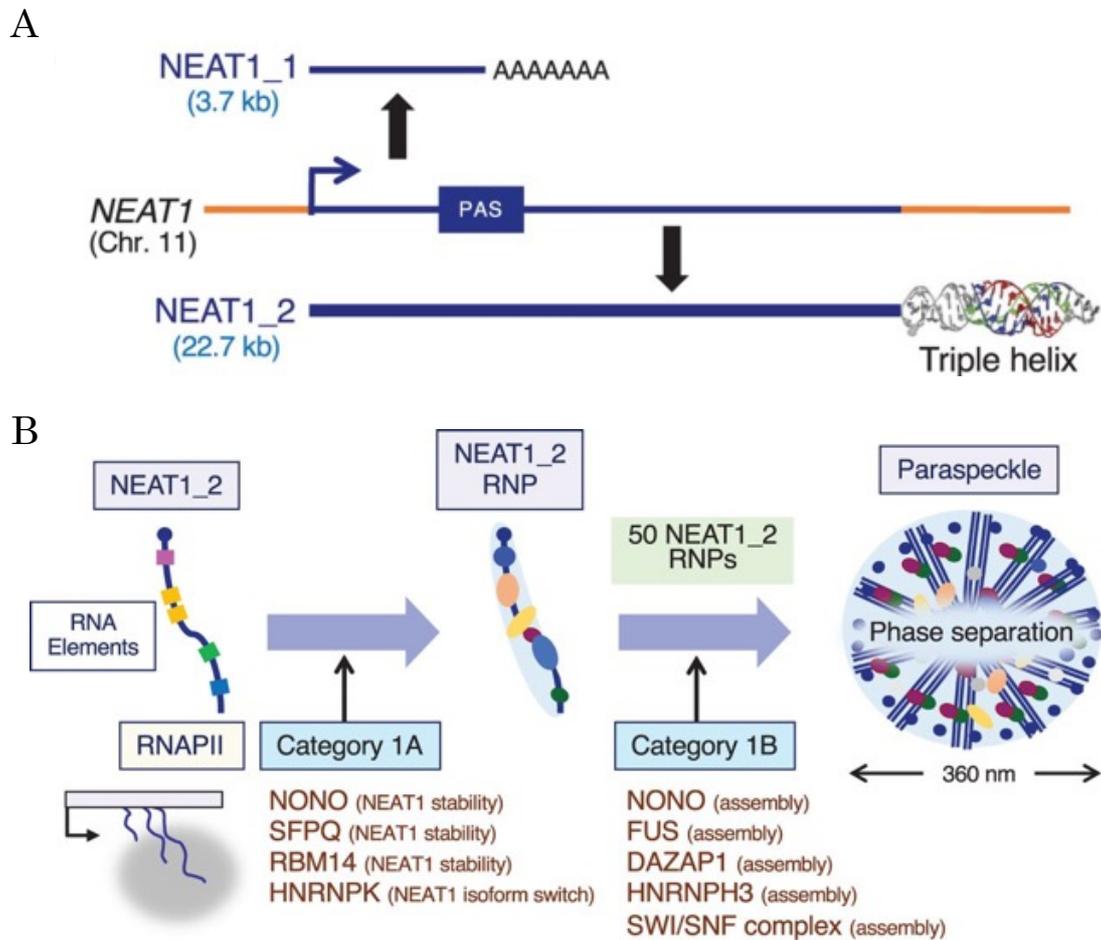


図 2. NEAT1 の選択的 3' 末端プロセシングと NEAT1_2 による PS 形成、(Yamazaki et al., 2019) より引用

(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 の発現に必要な 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)。

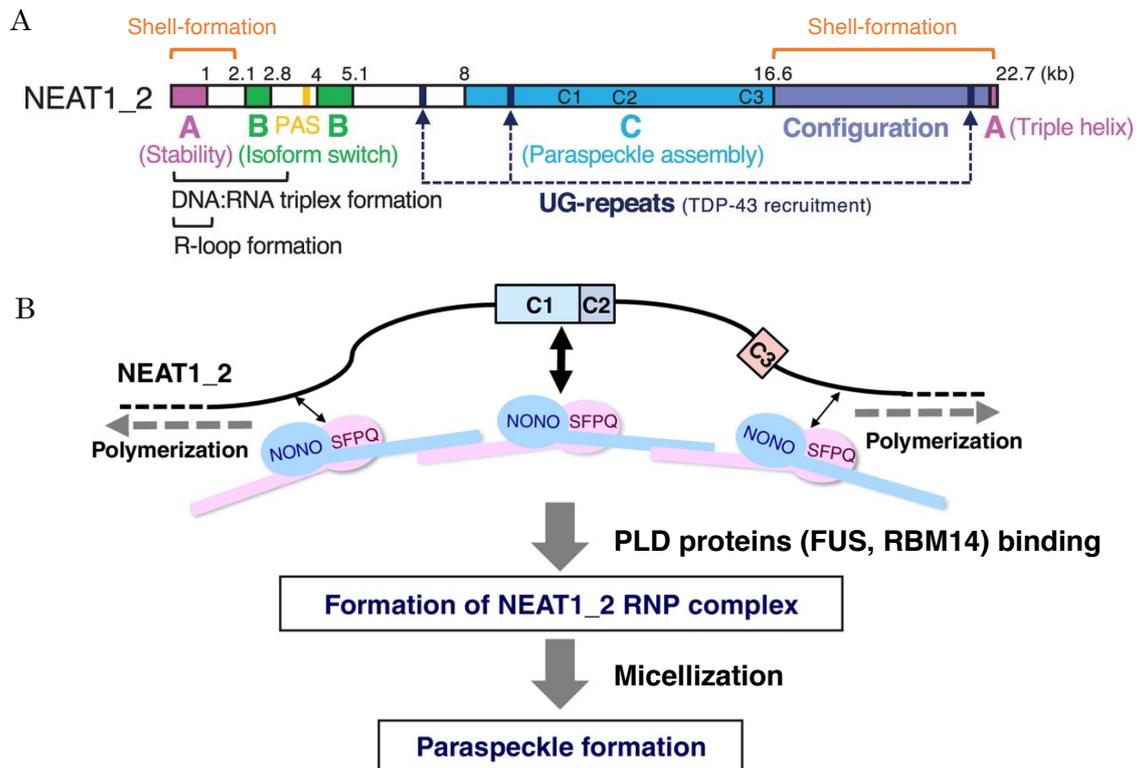


図 3. NEAT1_2 の RNA 機能ドメインと NEAT1_2 中央領域を介した PS 形成

(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。

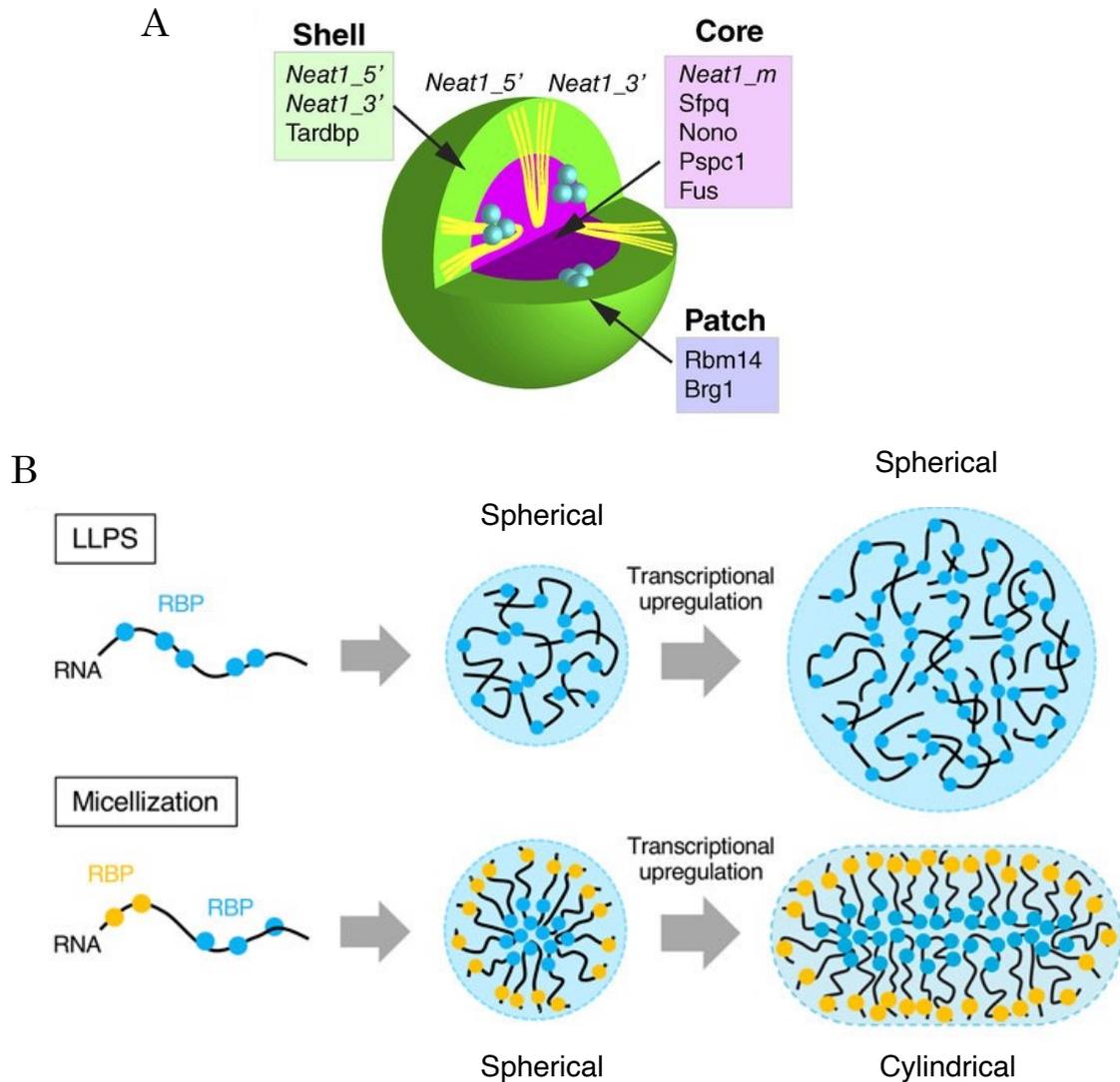


図 4. ミセル化により形成される PS のコア-シェル構造

(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-β-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 (1.5×10^6 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シーケンスにより目的の欠失が導入されているのを確認した。

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シーケ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変異細胞株	NEAT1 (22743 nt) における挿入/欠失領域	参照	sgRNA#1 (5' から 3')	sgRNA#2 (5' から 3')	sgRNA#2	改変した細胞株
HAP1 mini-NEAT1 (Δ 1-8k/16.6-22.6k)	1034-8006/16613-22647	Yamazaki et al., 2017				
NEAT1 Δ 16.6-22.6k	16613-22647	Yamazaki et al., 2017				
NEAT1 Δ 1-8k	1034-8006	Yamazaki et al., 2017				
NEAT1 Δ 4-8k/16.6-22.6k	4054-8005/16613-22647	This study	TACCACTTAGAACTCTAACC	GGATATCATATACTCACAAC		HAP1 NEAT1 Δ 16.6-22.6k
NEAT1 Δ 1-4k/16.6-22.6k	1034-4053/16613-22647	This study	AGAGGCTTCCCGCTGAGGC	TACCACTTAGAACTCTAACC		HAP1 NEAT1 Δ 16.6-22.6k
NEAT1 Δ 20.1-22.6k	20157-22647	This study	GGGAGGCGCGGAGCCGCCGC	TCAGATAACCATTCTAACTA		HAP1 WT
NEAT1 Δ 1-8k/20.1-22.6k	1034-8005/20157-22647	This study	AGAGGCTTCCCGCTGAGGC	GGATATCATATACTCACAAC		HAP1 NEAT1 Δ 20.1-22.6k
NEAT1 Δ 1-8k/16.6-20.1k	1034-8006/16613-20156	This study	TGACTTGATTGGCTGTGCA	TCAGATAACCATTCTAACTA		HAP1 NEAT1 Δ 1-8k
m9.8-16.6k (Δ 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	参照	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	GCATCGTACGCGTACGTGT	GGAGATTGGTTGTACAACAA		HAP1 mini-NEAT1
mini-NEAT1/6xMS2BS@16.2kb	16204-(6xMS2BS insertion)-16205	This study	GCATCGTACGCGTACGTGT	GGAAACCCTTACTTACTGG		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	GCATCGTACGCGTACGTGT	AGCAGATGCATCCGGCTCGA		HAP1 WT
NEAT1/6xMS2BS@14kb	14020-(6xMS2BS insertion)-14021	This study	GCATCGTACGCGTACGTGT	TACCGCATATCTGTGTACAT		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 μ g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 μ g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 μ g/mlで添加した培地中でセクションした。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 μ g/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 5.0×10^4 の細胞密度で播種した。24時間培養した後に、1.5 μg のプラスミドを3 μL 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、 9.0×10^5 の細胞密度で播種した。24時間培養した後に、15 μg のプラスミドを45 μL 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。

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ガ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。カバーガラスを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、カバーガラスを4°C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、カバーガラスを室温で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°C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°Cで16時間反応させた。カバーガラスをStellaris Wash bufferを用いて37°C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。カバーガラスをProLong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific) あるいは VECTASHIELD Hard Set Mounting Medium with DAPI (Vector) でスライドガ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 EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) に懸濁し、5秒間の超音波破碎処理を氷上で3回行なった。細胞破碎液を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°C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 anti-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 protein	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って行なった (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°C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) とランダムヘ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'-TGTGCCACGTCGTAACAAG-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°C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°Cで48時間、その後20°C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 Megaview III 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°C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°C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秒間の超音波破碎処理を氷上で5回行なった。細胞破碎液を遠心し、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で細胞破碎液を希釈して(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°Cで1時間処理した。その後、細胞破碎液とanti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich) と4°C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 µlの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°C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 [Thermo Scientific] でTotal 10 µlにした) を90°C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 MgCl₂) 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°C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°C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°C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。

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 (1.0×10^6 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 μ M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 snRNA ASO

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4つ付与した。

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

ヒト一倍体細胞株である 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。

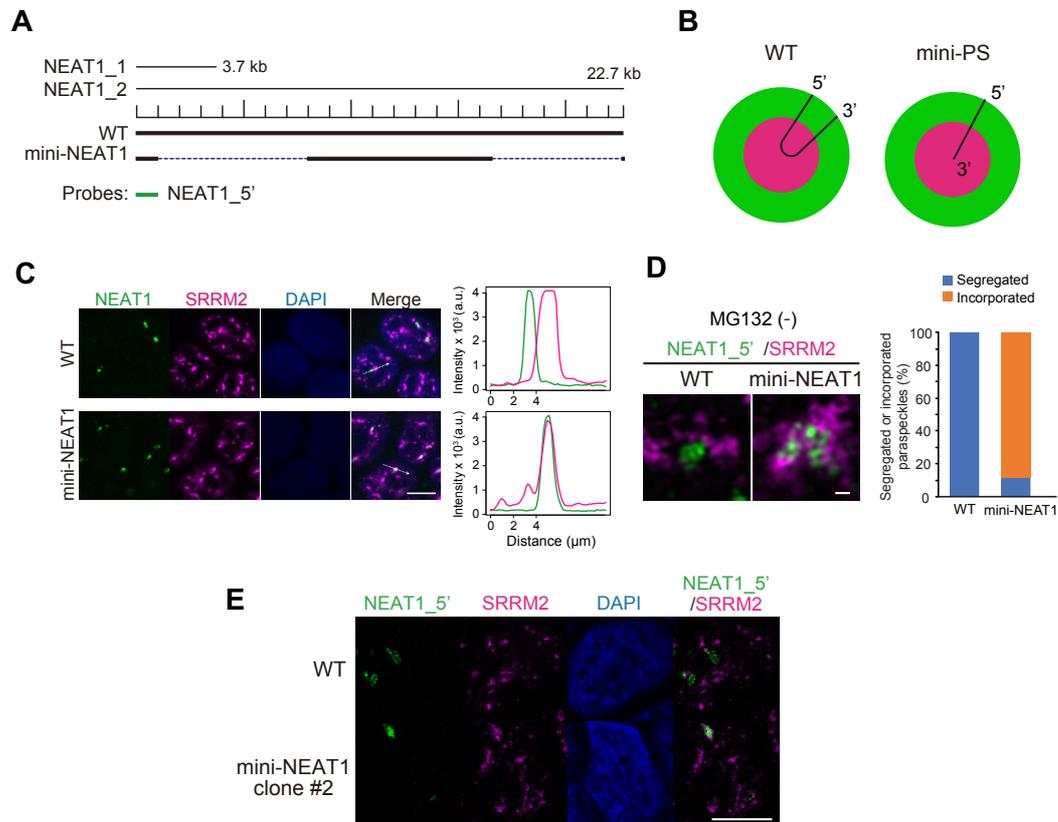


図 5. WT と mini-NEAT1 変異細胞株における PS と NS の観察

(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'側と 3'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 μ 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 μ 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 μ 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 。

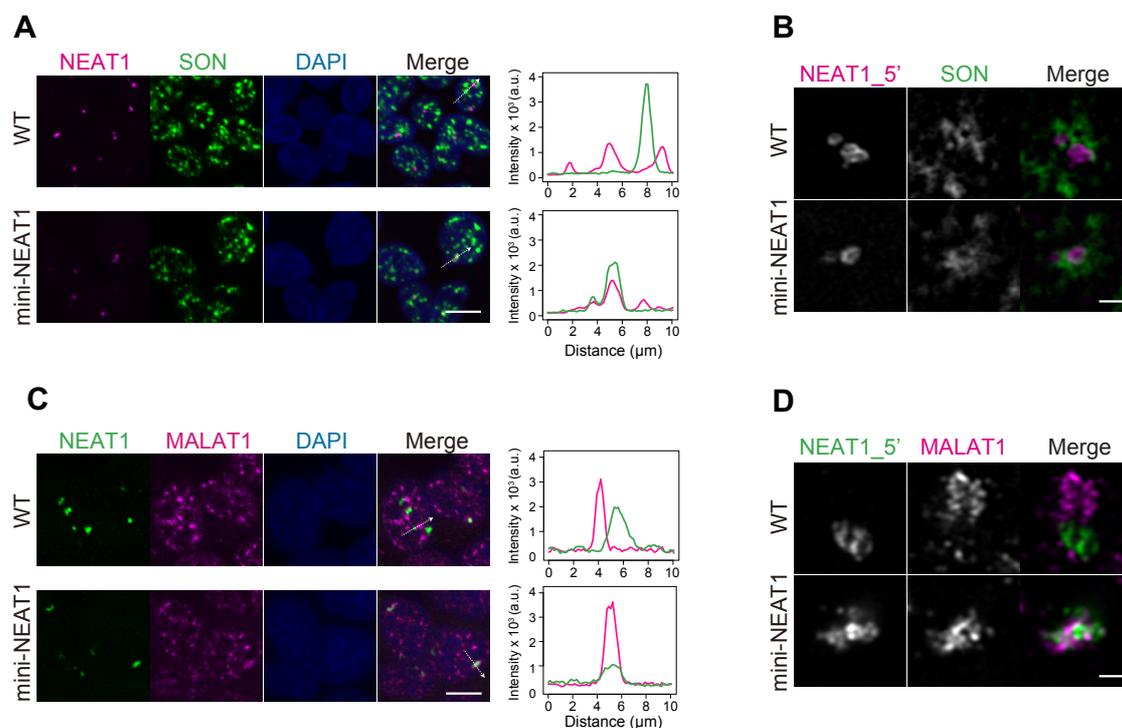


図 6. NS の複数のマーカーを用いた WT と mini-NEAT1 変異細胞株における PS と NS の観察

(A) 5 μM 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 μm 。(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 (マゼンタ) と SON (緑) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。(C) 5 μM 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 μm 。(D) 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 MALAT1 (マゼンタ) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。

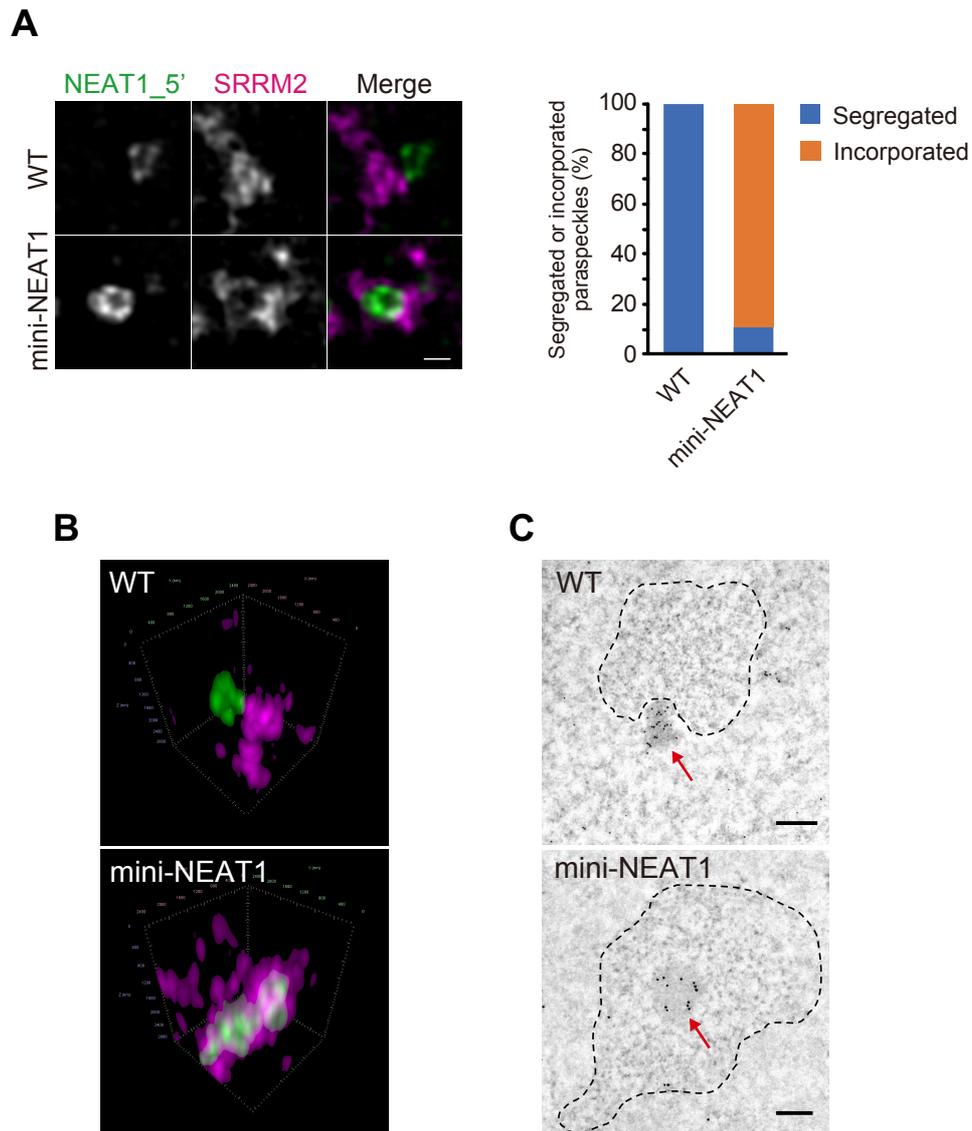


図 7. SIM と EM 用いた WT と mini-NEAT1 変異細胞株における PS と NS の観察 (A) MG132 (5 μ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ) の SIM 画像。スケールバー: 500 nm。NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフを右に示す。WT: n = 370、mini-NEAT1: n = 409。 (B) MG132 (5 μ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) と 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 8A,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 8C)。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。

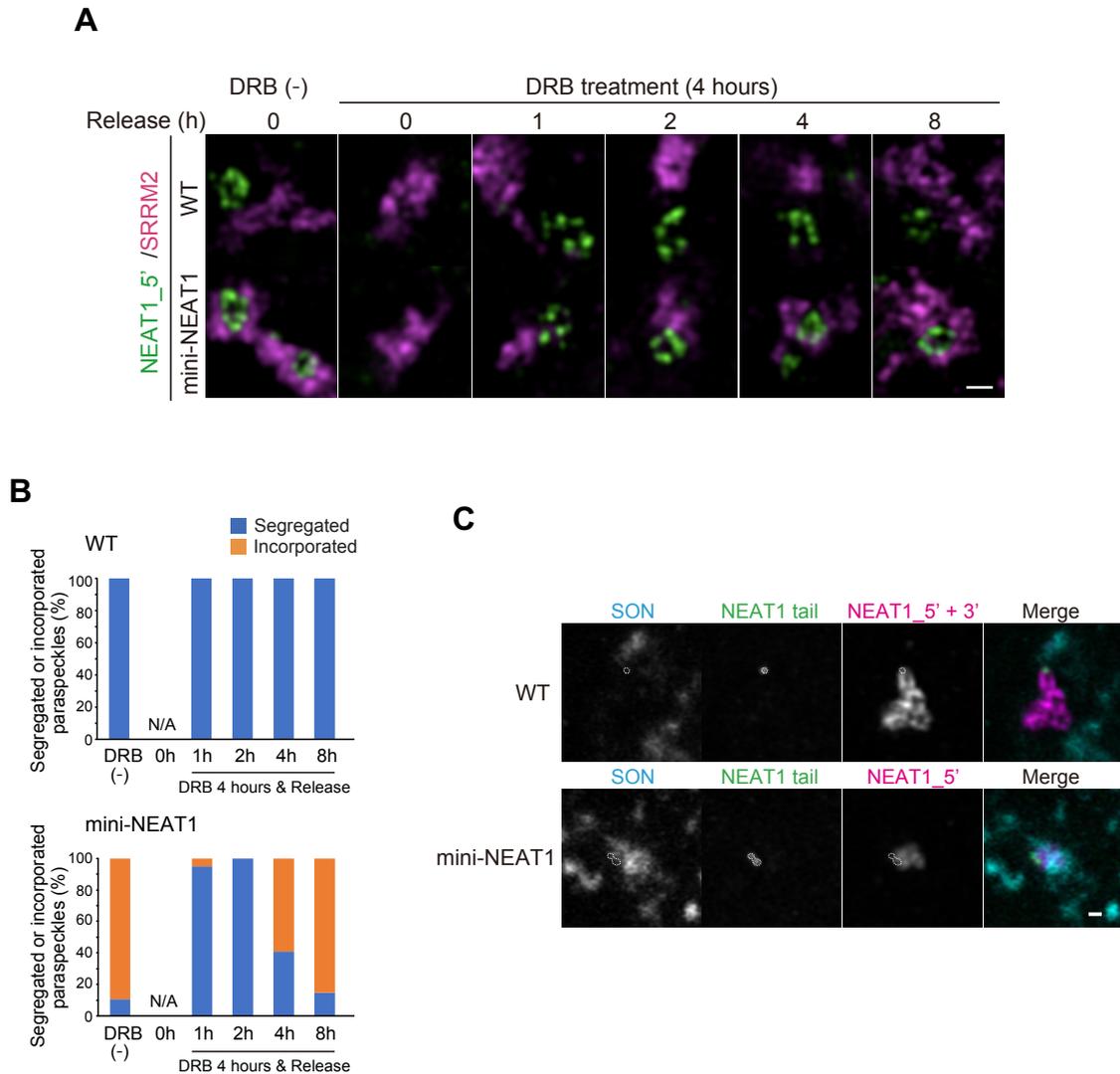


図 8. 新規に形成された PS あるいは NEAT1 の転写点と NS の観察

(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 μ 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 μ 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

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、 $\Delta 1-8\text{kb}/16.6-20.2\text{kb}$ 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。

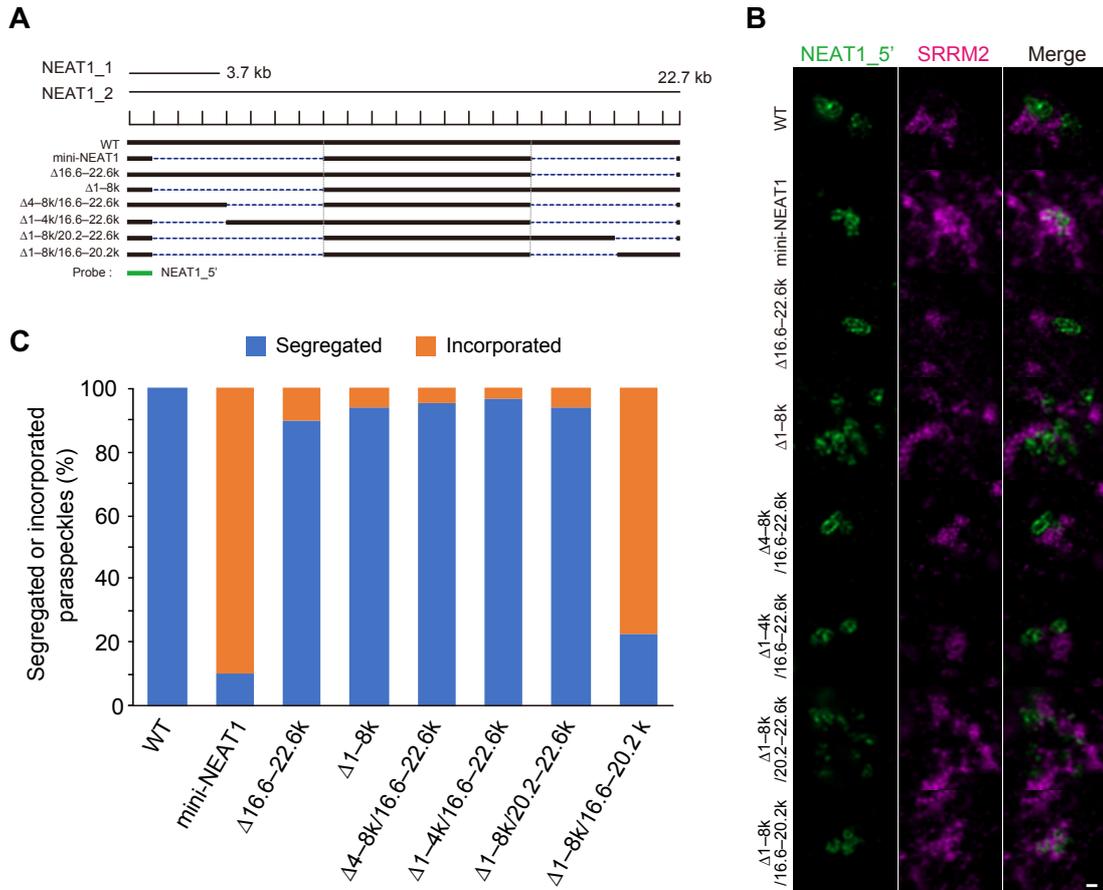


図 9. 複数の NEAT1 部分欠失細胞株における PS と NS の局在の観察

(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 プロブの位置を下に示す。(B) MG132 (5 μ 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、 Δ 16.6-22.6k: n = 188、 Δ 1-8k: n = 196、 Δ 4-8k/16.6-22.6k: n = 173、 Δ 1-4k/16.6-22.6k: n = 186、 Δ 1-8k/20.2-22.6k: n = 178、 Δ 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。

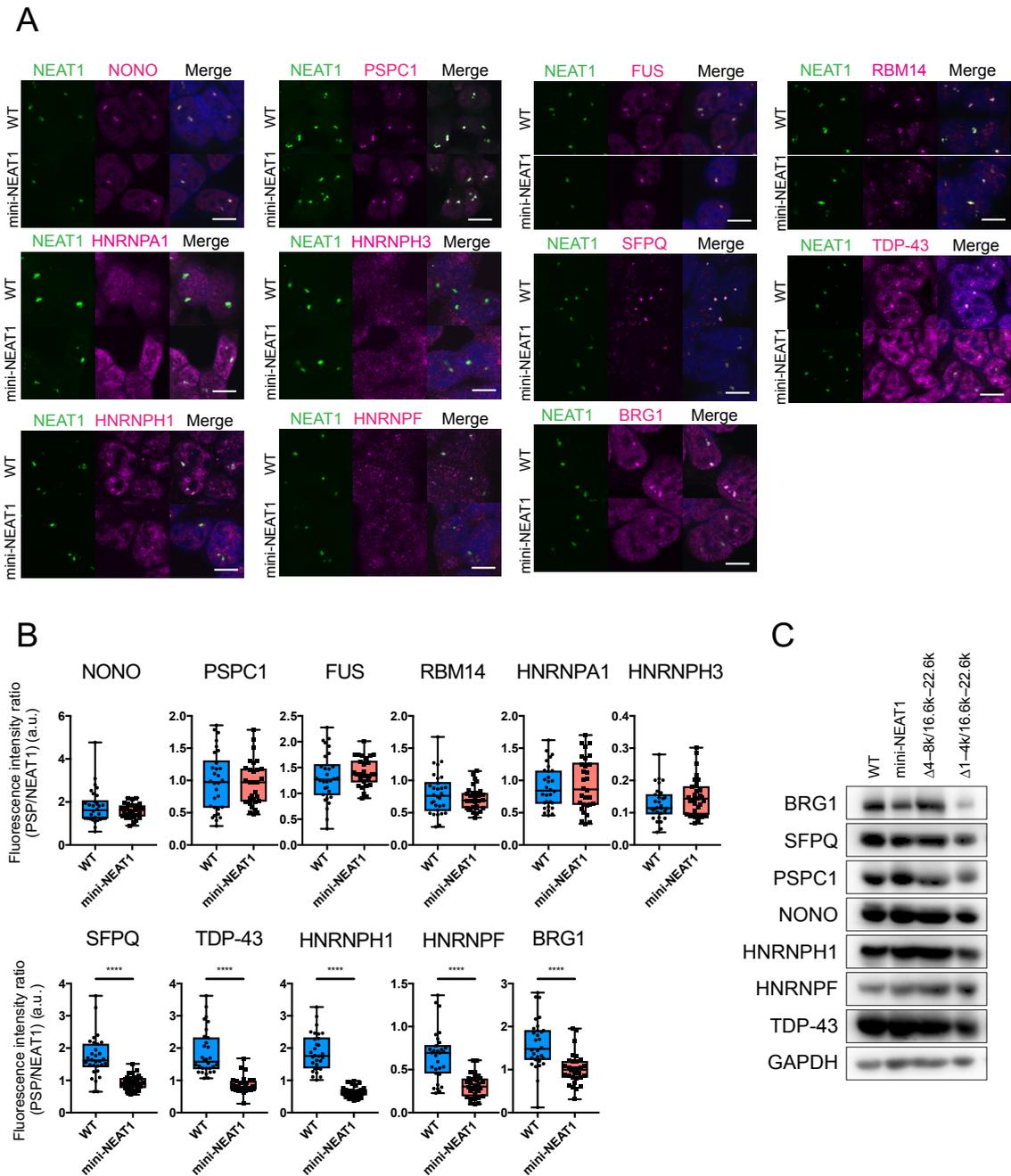


図 10. mini-PS と WT のパラスペックにおける、PSP の局在量の解析

(A) 5 μ 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は示している 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 μ 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 μM の MG132 で 6 時間処理した HAP1 WT および mini-NEAT1、 $\Delta 4\text{-}8\text{kb}/16.6\text{-}22.6\text{kb}$ 、 $\Delta 1\text{-}4\text{kb}/16.6\text{-}22.6\text{kb}$ 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 への人為的な繫留は 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 に繫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。この繫留実験には、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 $6 \times \text{MS2BS}$ (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 $6 \times \text{MS2BS}$ に結合して候補タンパク質が mini-NEAT1 RNA 上に繫留される (図 11A)。SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 を mini-PS のシェルに繫留したところ、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 を繫留したところ、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。

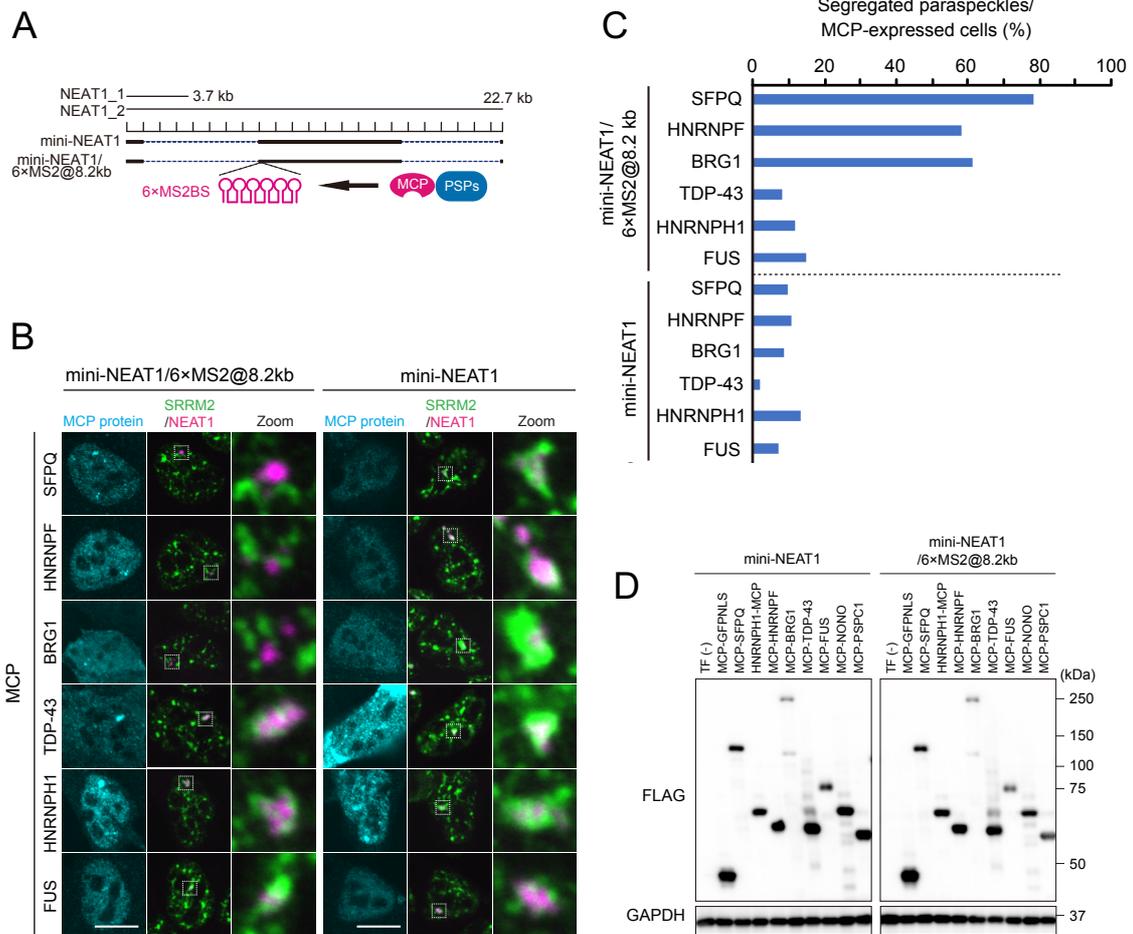


図 11. mini-PS の NS からの分離欠損の機能相補実験

(A) MCP 融合タンパク質の mini-PS シェル領域への人為的な繫留実験の模式図。
 (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 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。
 (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 のウェ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 コアへの人為的な繫留は 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、繫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 のコア領域への繫留実験を行った (図 12A)。実際に、mini-NEAT1 の 5'側に SFPQ を繫留すると mini-PS のシェルに、3'側に繫留すると 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 のコアに繫留したところ、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 シェルへの繫留は NS からの mini-PS の分離を促進するが、mini-PS コアへの繫留では分離を促進しないことが示された。

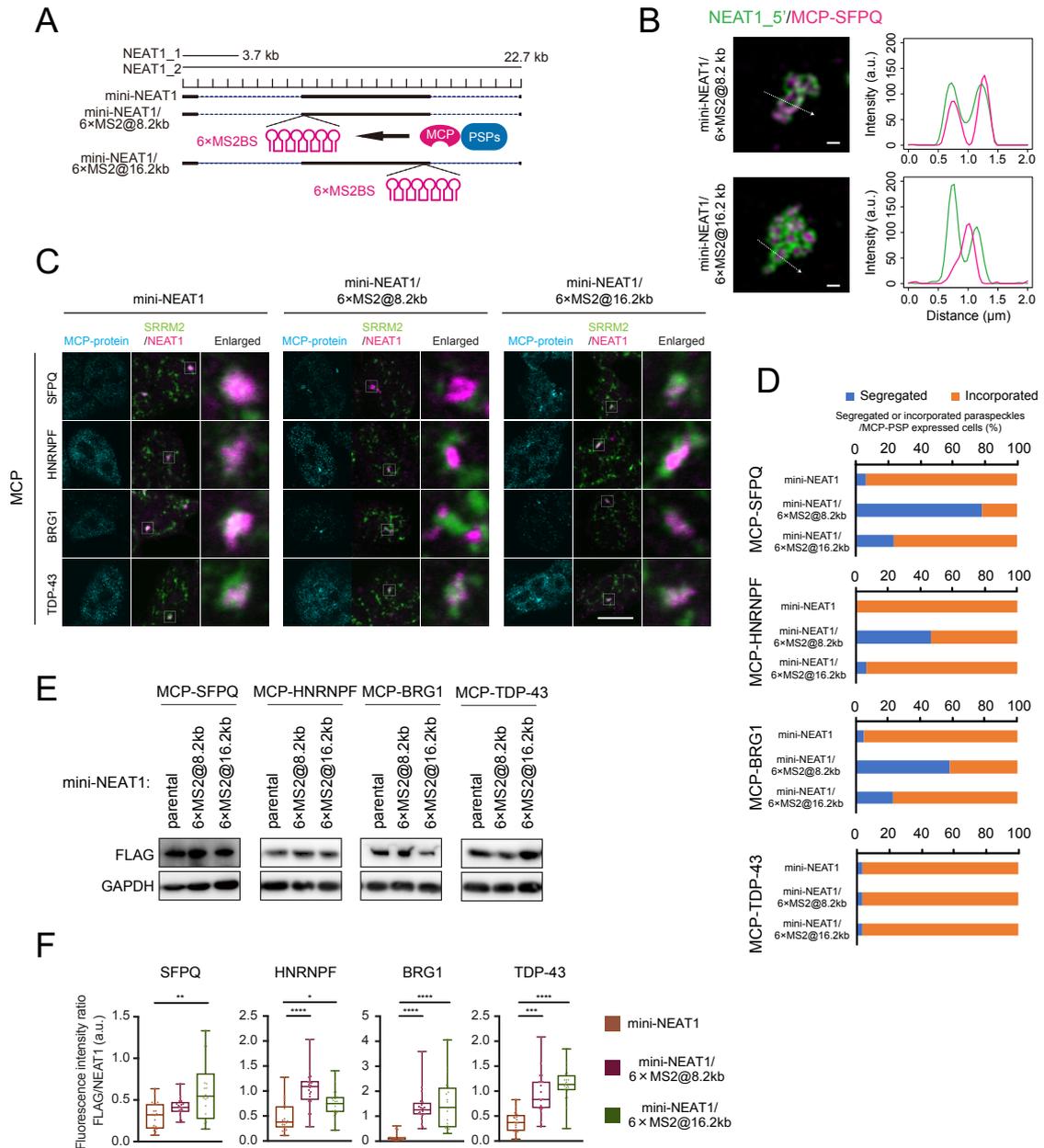


図 12. mini-PS のシェルあるいはコア領域へのタンパク質の繫留による NS からの分離欠損の機能相補実験

(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繫留実験の模式図。(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 のウェ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。**** $P < 0.0001$ 、*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$ 。

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。

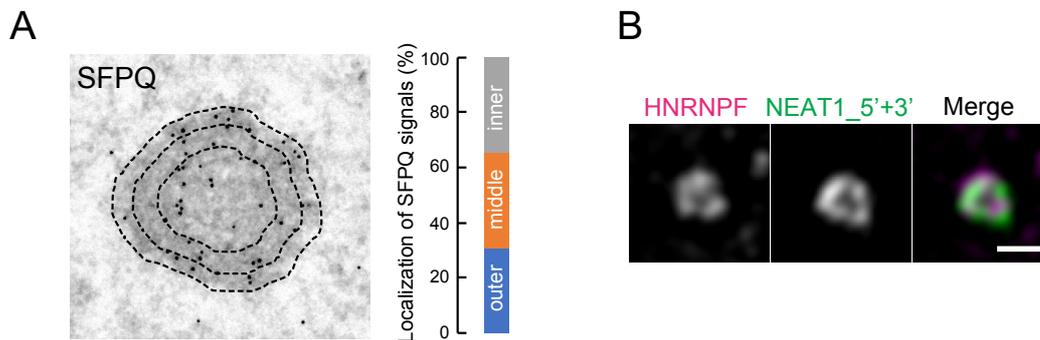


図 13. EM と SIM を用いた SFPQ と HNRNPF の局在解析

(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、これらの因子を繫留した際に、他の因子が相互に mini-PS へリクルートされるのかを検証した。HNRNPF を mini-PS へ繫留したところ、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 への繫留により、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 へ繫留した場合には 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繫留した際には、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。

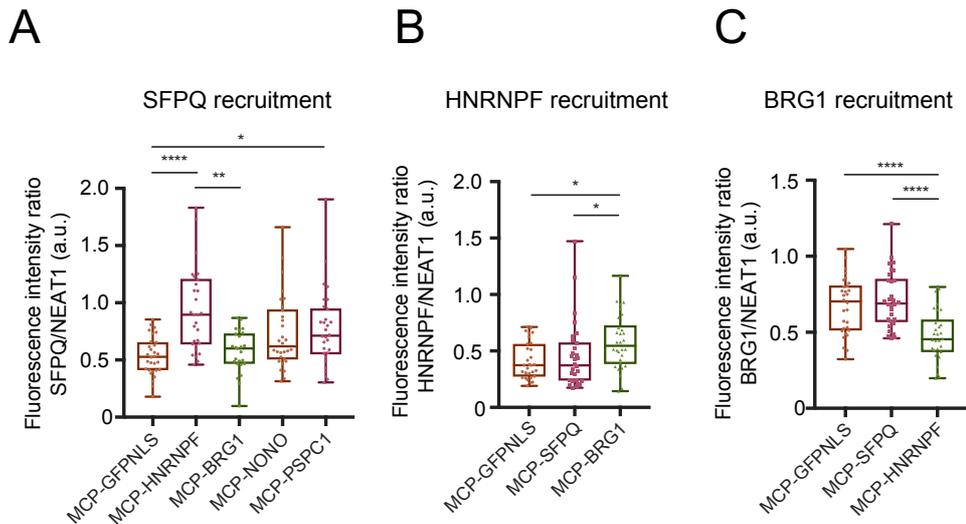


図 14. PSP を mini-PS へ繫留した際の、SFPQ あるいは HNRNPF、BRG1 のリクルート量の評価

(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 μM, 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 のシエルへの人為的な繫留実験を行い、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 (Δ RRM2/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 Δ RRM2/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 Δ CC 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 Δ PLD 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、 Δ 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。

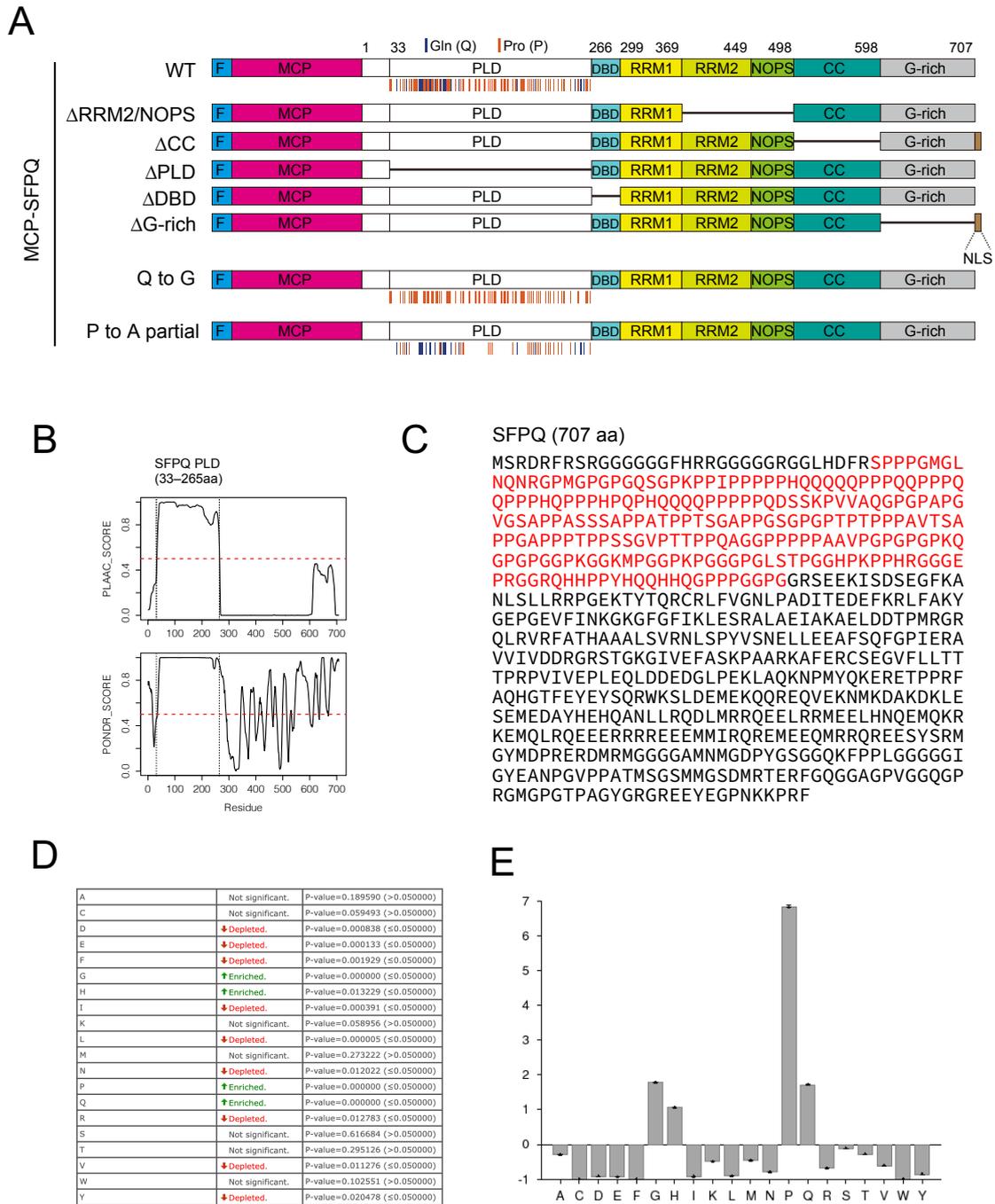


図 15. 人為的繫留実験に用いた MCP-SFPQ WT と変異体の模式図と SFPQ PLD のアミノ酸配列の特徴

(A) 人為的繫留実験に用いた 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。

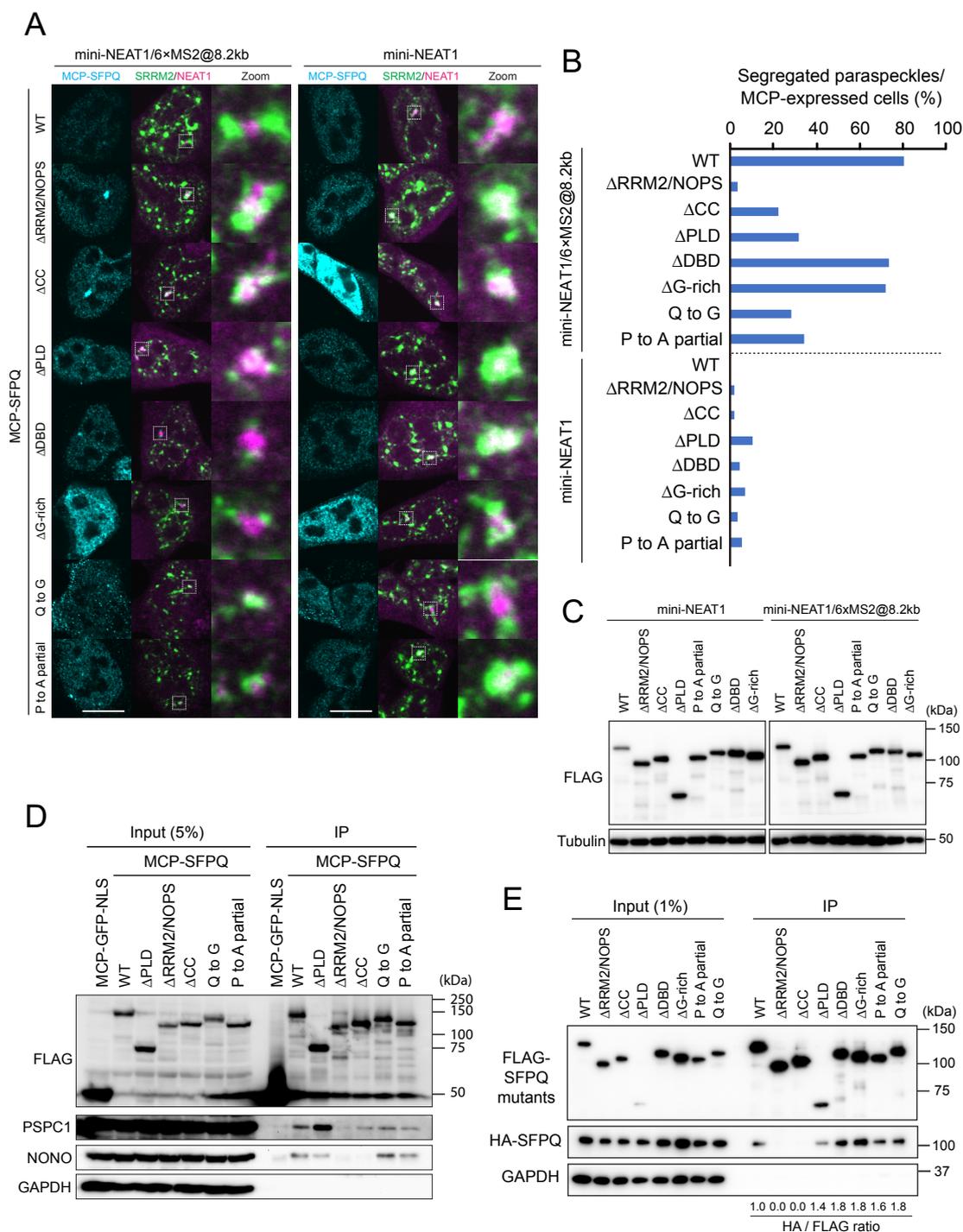


図 16. MCP-SFPQ WT と変異体を用いた mini-PS の NS からの分離欠損の機能相補実験

(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 μ 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 のマーカートンパク質である 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 μ m。 (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 \times MS2@8.2 kb: n = 61 (WT), n = 62 (Δ RPM2/NOPS), n = 67 (Δ CC), n = 66 (Δ PLD), n = 76 (Δ DBD), n = 61 (Δ G-rich), n = 60 (Q to G), n = 64 (P to A partial); mini-NEAT1: n = 59 (WT), n = 63 (Δ RPM2/NOPS), n = 62 (Δ CC), n = 67 (Δ PLD), n = 66 (Δ DBD), n = 60 (Δ 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 の繫留は、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。

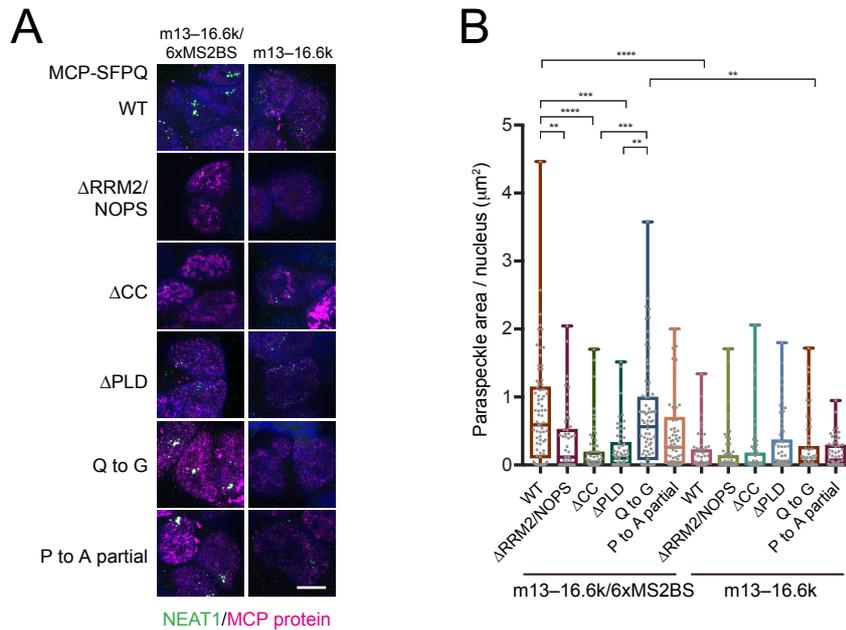


図 17. MCP-SFPQ WT と変異体を用いた PS のアセンブリー欠損の機能相補実験
 (A) MCP-SFPQ WT あるいは変異体を m13-16.6k / 6 × MS2BS (左) あるいは m13-16.6k (右) にトランスフェクションし、MG132 処理条件下 (5 μM、6 時間) において PS を観察した。NEAT1 RNA を RNA-FISH 法により検出した (緑)。MCP-SFPQ WT あるいは変異体 は抗 FLAG 抗体を用いて蛍光免疫染色法により検出した (マゼンダ)。核は DAPI を用いて染色した (青)。スケールバー: 10 μm。 (B) A 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/6xMS2BS: n = 78 (WT), n = 54 (ΔRRM2/NOPS), n = 65 (ΔCC), n = 62 (ΔPLD), n = 78 (Q to G), n = 66 (P to A partial); m13-16.6k: n = 58 (WT), n = 64 (ΔRRM2/NOPS), n = 53 (ΔCC), n = 62 (ΔPLD), n = 60 (Q to G), 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。

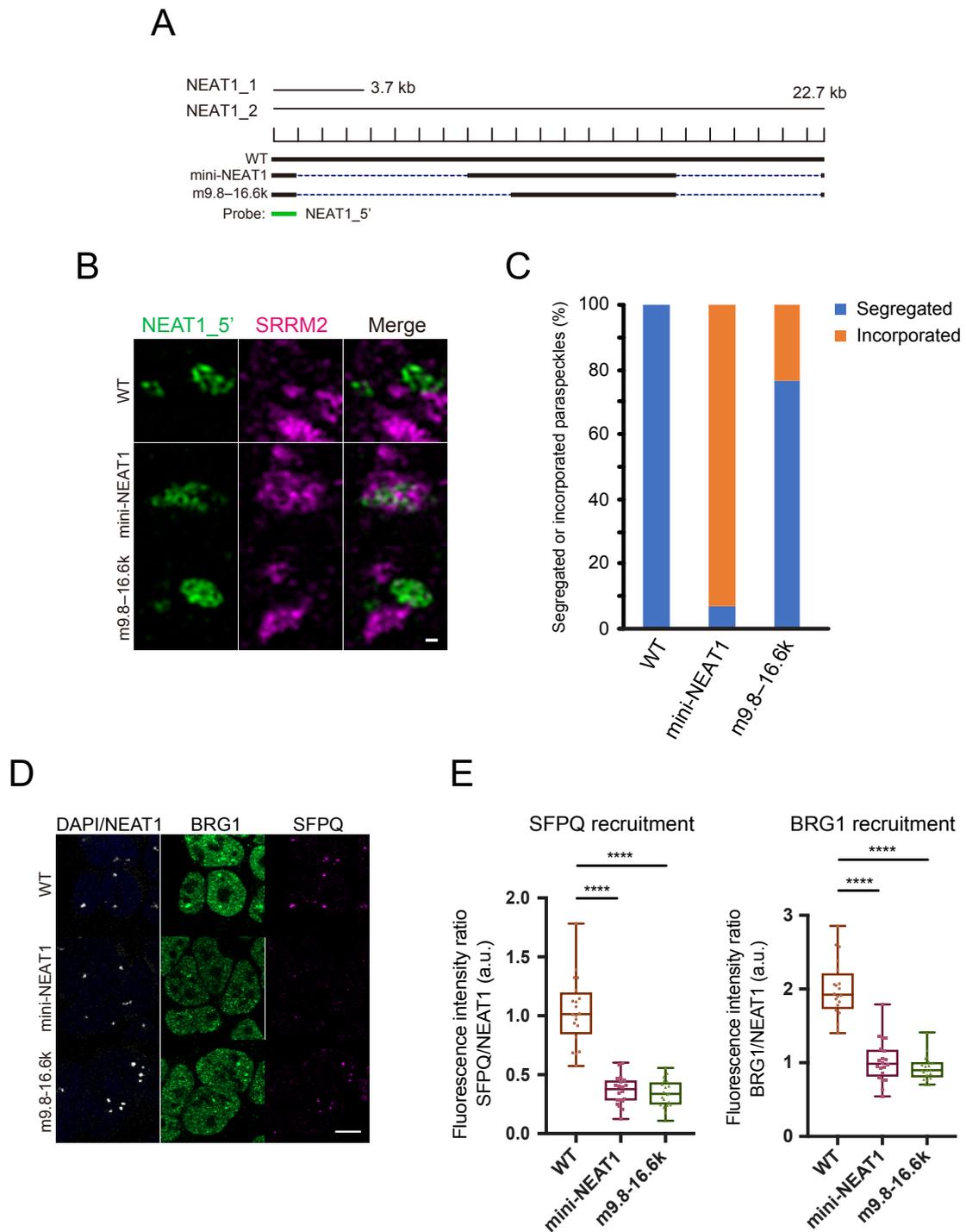


図 18. m9.8-16.6k 変異細胞株における PS と NS の観察

(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 (5 μ 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 (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 μ 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 μ 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	ENSG00000060339	CCAR1	cell division cycle and apoptosis regulator 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24236]	128
5	U2SURP	ENSG000001163714	U2SURP	U2 snRNP associated SURP domain containing [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30855]	121
6	SF3B2	ENSG00000087365	SF3B2	splicing factor 3b subunit 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10769]	114
7	HNRNPL	ENSG00000104824	HNRNPL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5045]	100
8	HNRNPUL1	ENSG00000105323	HNRNPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17011]	99
9	PTBP1	ENSG00000011304	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9583]	97
10	PUF60	ENSG00000179950	PUF60	poly(U) binding splicing factor 60 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC: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	ENSG00000088247	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	ENSG00000063244	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	DEAH-box helicase 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2750]	79
19	CHERP	ENSG00000085872	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	ENSG00000066044	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]	60
26	DAZAP1	ENSG00000071626	DAZAP1	DAZ associated protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2683]	59
27	MATR3	ENSG00000015479	MATR3	matrin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6912]	58
28	HNRNPR	ENSG00000125944	HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5047]	55
29	RBM39	ENSG00000131051	RBM39	RNA 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	ENSG00000071894	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	ENSG00000099783	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	poly(C) 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	CPSF2	ENSG00000165934	CPSF2	cleavage and polyadenylation specific factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2325]	36
44	HNRNPDL	ENSG00000152795	HNRNPDL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5037]	36
45	FUS	ENSG00000089280	FUS	FUS RNA binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4010]	35
46	PRPF40A	ENSG00000196504	PRPF40A	pre-mRNA processing factor 40 homolog A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16463]	34
47	SF3A2	ENSG00000104897	SF3A2	splicing factor 3a subunit 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC: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	ENSG00000054118	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 splicing factor 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10782]	25
64	RPS7	ENSG00000171863	RPS7	ribosomal protein S7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10440]	23
65	SNRPB2	ENSG00000125870	SNRPB2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11155]	23
66	FIP1L1	ENSG00000145216	FIP1L1	factor interacting with PAPOLA and CPSF1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19124]	22
67	SRRM2	ENSG00000167978	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18639]	22
68	EWSR1	ENSG00000182944	EWSR1	EWS RNA binding protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3508]	21
69	RPS4X	ENSG00000198034	RPS4X	ribosomal 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:11511]	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

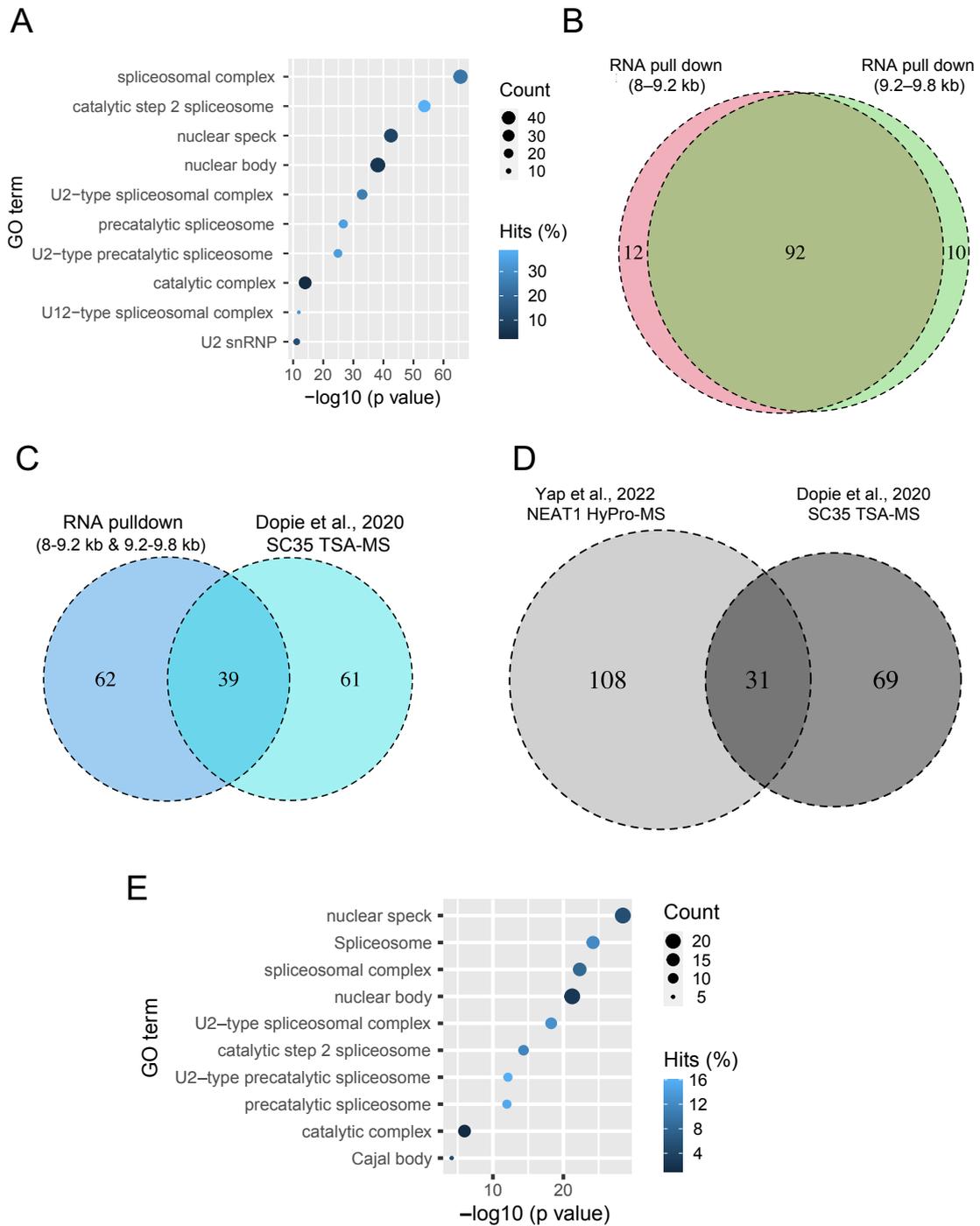


図 19. *in vitro* RNA プルダウンと MS 解析による NEAT1 の 8-9.8 kb 領域と相互作用するタンパク質の探索

(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繫留は 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 に繫留した (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繫留した。その結果、SF1 あるいは SF3B4、SF3A3 を PS のシェルに繫留した場合、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 の繫留では、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繫留した。その結果、SF1 あるいは SF3B4、SF3A3、U2AF2、PTBP1 を PS のコアに繫留した場合、PS の NS への内在化は観察されなかった (図 20A–D)。

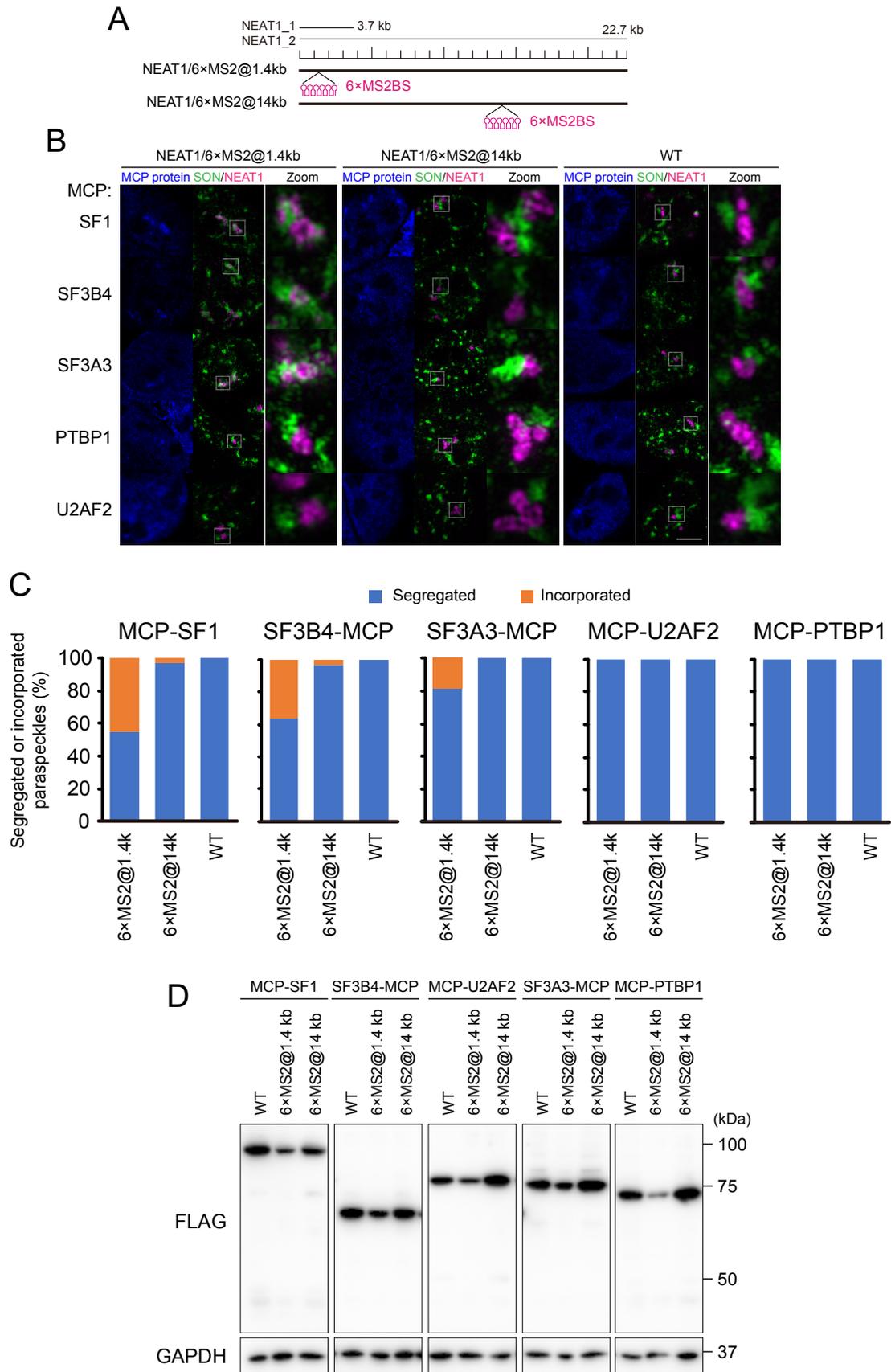


図 20. U2 snRNP 関連タンパク質の PS への繫留実験

(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ェ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。

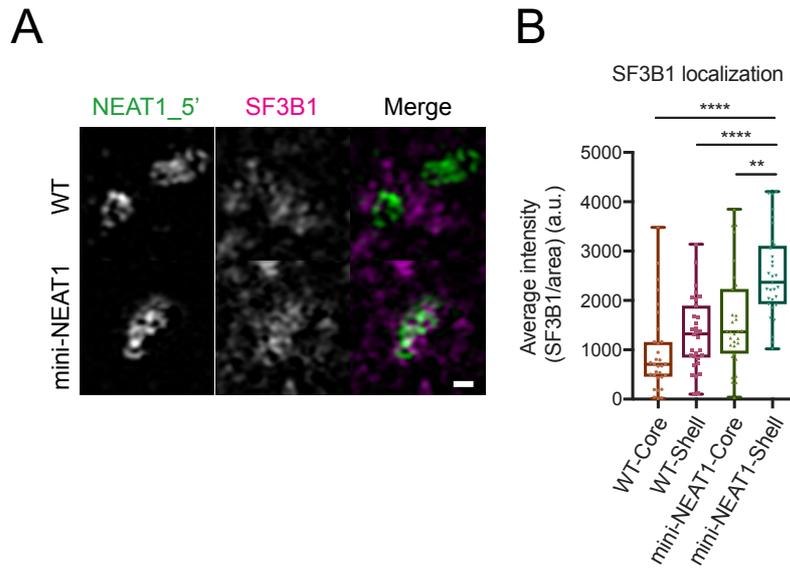


図 21. U2 snRNP の主要な構成因子である SF3B1 は PS のシェルに局在する
 (A) MG132 (5 μ M、6 時間) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) と SF3B1 (マゼンタ) の SRM 画像。スケールバー: 500 nm。 (B) PS のシェルあるいはコアにおける SF3B1 の平均蛍光強度の定量。箱ヒゲ図により、平均値 (中央線)、25–75% (箱の下底と上底)、最小値と最大値 (ヒゲの下端と上端) を示す。データは、Kruskal-Wallis ANOVA and post hoc Dunn 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。

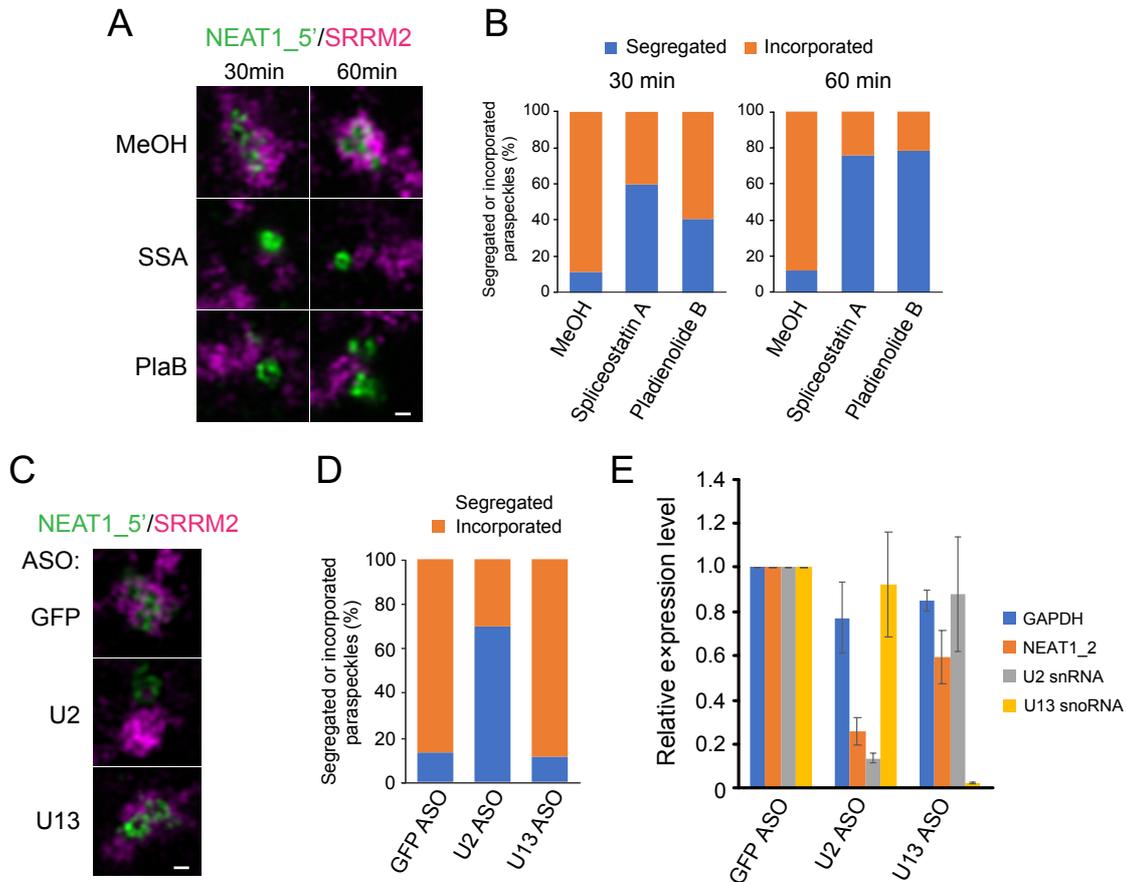


図 22. U2 snRNP の主要な構成因子である SF3B1 は PS のシェルに局在する
 (A) SSA (100 ng/ml) あるいは PlaB (1 μ M) で処理した HAP1 WT および mini-NEAT1 変異細胞株における、NEAT1 (緑) と SRRM2 (マゼンタ) の SRM 画像。MeOH はメタノールを示し、ネガティブコントロールとして用いた。スケールバー: 500 nm。(B) A における、NS と分離あるいは取り込まれていた PS の割合を定量したグラフ。30min 処理: n = 208 (MeOH)、n = 131 (SSA)、n = 125 (PlaB)、60min 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 μ M、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 \pm 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 のシェルへの繫留により、mini-PS が NS と分離し、隣接した。この分離誘導は、PS のコアへの繫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繫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)。

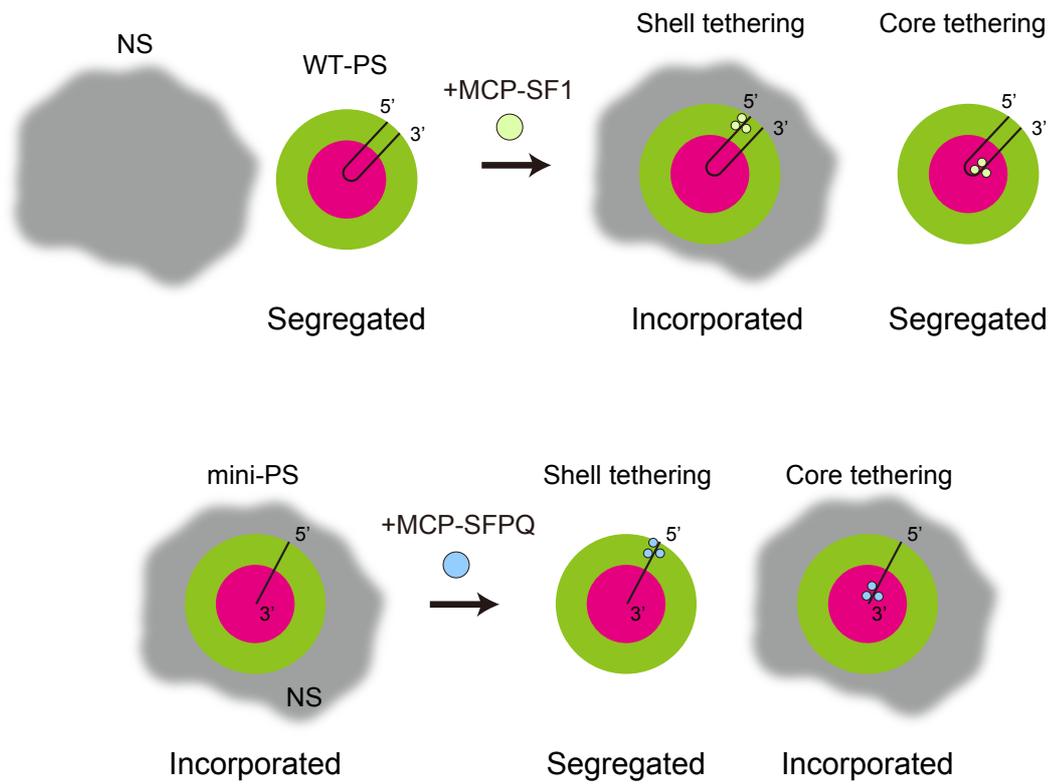


図 23. シェルに局在するタンパク質が WT の PS と mini-PS の NS あるいは核質への局在を決定する

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繫留実験結果の概略図

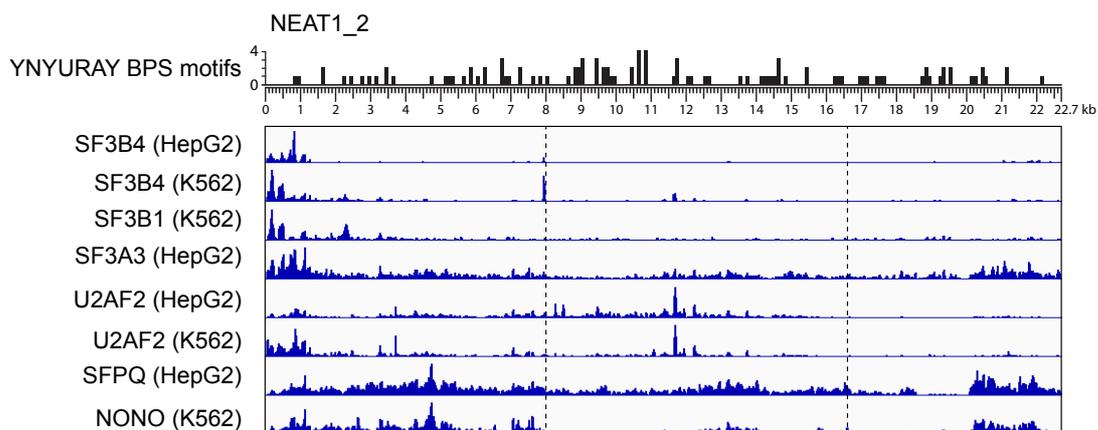


図 24. PSP と U2 snRNP 複合体の構成因子の eCLIP データと SF1 が結合するコンセンサス配列のマッピング図

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。

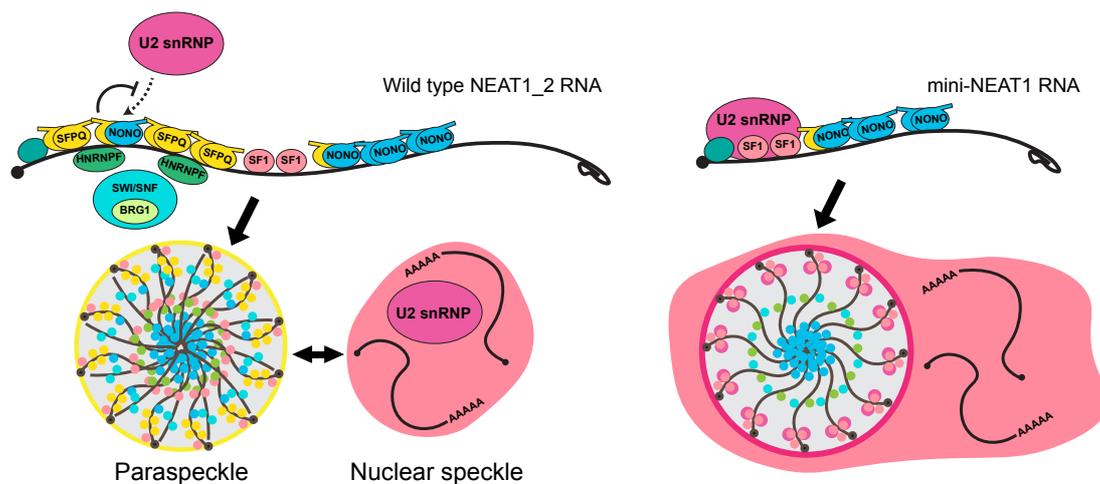


図 25. PS のシェルに局在するタンパク質が NS との独立性を決定する分子機構を示したモデル図

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ものが期待できる。

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、マスマスプロト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た。厚く御礼申し上げます。

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も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。

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 MEN β 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., Jadalaha, 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., Trehwella, 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., Biegging-Rolett, K., Broz, D.K., Imam, J.F.C., Vogel, H., Wood, L.D., Sage, J., et al. (2017). *Neat1* is a p53-inducible 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'Agnesse, 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 ε/β* nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated 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 RNA-binding 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.