

RNA が形作る相分離構造体

山崎 智弘, 廣瀬 哲郎

1. はじめに

近年, 相分離という物理現象の視点から, さまざまな細胞内プロセスを理解しようとする研究が大きな盛り上がりを見せている。古くから, 細胞内には特定の因子が集積した, 細胞膜に覆われていない細胞内構造体(非膜性構造体)が数多く存在することは知られていたが, これらが相分離により形成されていることが明らかになってきた¹⁾。さらに, 核膜孔やヘテロクロマチン, オートファゴソームなどさまざまな細胞内構造が相分離を介して形成されることもわかってきている¹⁾。非膜性構造体は, 混み合った細胞内で, (1)特定の分子を集める(と同時に排除する)ことで, 生化学反応の促進, 因子の隔離・緩衝作用, ノイズキャンセル効果, フィルター作用, クロマチンハブなどの機能, (2)相分離が温度, 浸透圧, pHなどの環境変化により影響を受けやすい性質を持つため, それらに対して鋭敏に応答できるセンサーとしての役割などの機能を担い, 複雑な生命現象を支えていると考えられている²⁾。純粋に相分離自体の機能を明らかにしようとする試みも進んでおり, 人工的に細胞内相分離を誘導する実験システムの構築も相次いでいる³⁾。さらに, 神経変性疾患やがんなどの疾患の発症機構, 治療法の探索にも関連して, 相分離制御に大きな注目が集まっている。細胞内には, 相分離や凝集を抑制する因子があり, たとえば, 分子シャペロンやRNAヘリカーゼ, タンパク質の翻訳後修飾酵素, 核内輸送因子 Importin タンパク質, ATP分子, “超”変性Heroタンパク質群などが報告されている。さらに, 低分子化合物による相分離制御も疾患治療への展開も見据え進められている。

このような相分離の制御において, RNAも重要な役割を担っており, 相分離の促進と抑制の両面の作用を持つことがわかってきている。核内に豊富に存在するRNAが“特異的”にタンパク質に相互作用することで, 凝集しやす

い性質を持つRNA結合タンパク質(RBP)の凝集を抑制している。一方, 特定のタンパク質をRNA配列や二次構造を介して, “特異的”に集約することで, 相分離の誘導を促進する⁴⁾。細胞内ではlncRNA(long noncoding RNA)を含む数多くのRNAが転写されるが, 一群のRNAは, 相分離を誘導するための足場となる。本稿では, RNAが誘導する細胞内非膜性構造体について, 実験およびソフトマター物理学の理論に基づく形成原理や機能について解説する。

2. RNAと相分離

ほとんどの非膜性構造体には, タンパク質とともにRNAが構成因子として含まれる。非膜性構造体の形成において, RNA間, RNA-タンパク質, タンパク質間相互作用を合わせた相互作用強度の総和が閾値を超えると, 相分離が誘導されるというモデルが提唱されている⁵⁾。RNAは, 非膜性構造体の制御において, 重要な役割を担うが, 我々は, この中でも, RNAが非膜性構造体の必須の骨格として働くことに注目している。酵母からヒトまでさまざまな生物種で, この機能を有するRNAが存在している(図1A)。そのため, RNAの普遍的な機能の一つであると考えられたため, 非膜性構造体形成に必須なRNAをarchitectural RNA(arcRNA)と名づけた^{4,6)}。RNAは, 帯電し, 可溶性であり, タンパク質よりかなり長い高分子であるため, さまざまなタンパク質を集約する足場として適している。RNA-タンパク質複合体(RNP)は, 高分子であり, そもそもつながっているため, 低分子化合物と比べ, 分離した相を作りやすい(Flory-Huggins理論)。ヒトには1500種類ものRBPが存在するが, 互いに相互作用しないタンパク質どうしであっても, 同一のRNA分子上に集められることによって, それらの機能を統合できる。RNAはその配列により, 結合タンパク質を規定しているが, lncRNAの場合には, タンパク質情報をコードするという制約がないため, 配列の自由度が高い。RNAは転写により一所で多コピー生産され, 分子数が増幅されるため, 相分離を時空間的に制御できる(図1B)。また, タンパク質の合成を伴わず, 迅速かつ可逆的にタンパク質を補足することもできる。以上のように, RNAは相分離の誘導に適した生体高分子であり, 他の機構だけでは成しえ

大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク講座RNA生体機能研究室(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-3)

Phase-separated biomolecular condensates constructed by RNAs
Tomohiro Yamazaki and Tetsuro Hirose (RNA Biofunction, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930385

© 2021 公益社団法人日本生化学会

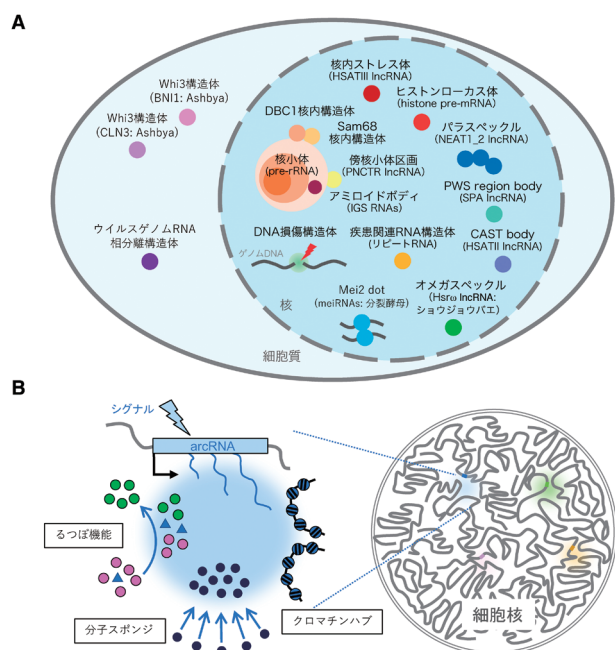


図1 RNAにより誘導される細胞内相分離構造体と機能
(A)真核生物におけるRNAを必須の骨格とする非膜性構造体。
(B)arcRNAによる非膜性構造体の形成と作用機序。

ない、ユニークな機構で生体機能を制御することができる (図1B)。

3. arcRNAにより誘導される非膜性構造体の形成と機能

ここでは、arcRNAにより構築されるいくつかの非膜性構造体を例に、その形成機構と機能について概説する。

NEAT1_2 lncRNAは、核内構造体パラスペックルの形成に必須であり、特定の組織、ストレス、種々の疾患（がん、ウイルス感染、神経変性疾患など）の際に誘導される⁷⁾。パラスペックルは、NEAT1_2がRNAポリメラーゼIIにより転写され、構成タンパク質がNEAT1_2上に集約することで相分離が誘導される (図1B, 図2)⁴⁾。パラスペックルは、球形や円筒形の形状をとり、構造体内部ではNEAT1_2やタンパク質が規則的なコアシェルの構造を示すというユニークな特徴を持つ (図2)^{7, 8)}。また、タンパク質をその内部に隔離する分子スポンジの機能を持ち、SFPQやTDP-43といったタンパク質を隔離し、それらの標的遺伝子の発現を制御する (図1B, 図2)⁷⁾。多数のゲノム領域と相互作用するため、遺伝子発現制御に機能すると考えられている (図1B, 図2)。60種類以上のパラスペックル構成タンパク質のうち、一部のNONOやFUSといったオリゴマーを形成するRBPが構造体形成に必須の役割を持ち、これらがNEAT1_2の中央のRNA領域に多数結合することが相分離誘導に必須である^{4, 9)}。これは、RNAが、

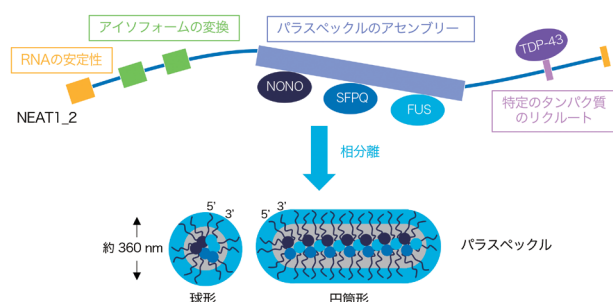


図2 パラスペックルの構造とNEAT1_2の機能RNAドメイン
NEAT1 arcRNAの機能RNAドメインと相互作用タンパク質を示す。下図はパラスペックル特有の形態（球・円筒）とNEAT1_2とタンパク質の内部配置。

RBPが多価に相互作用できるプラットフォームとなることが相分離誘導に重要であることを示している。この最たるものがリピード配列を含むRNA（リピードRNA）であり、反復するRNA配列にRBPを多く集め、相分離を誘導する。このリピードRNAに分類されるarcRNAも複数同定されており¹⁰⁾、その一つが、熱ストレスなどの外的要因により誘導されるHSATIII lncRNAであり、核内ストレス体を誘導する¹¹⁾。HSATIIIは、ペリセントロメア領域から転写されるGGAAU配列を多数有するリピードRNAであり、150種類近くのタンパク質を繋留し、その中のスプライシング制御に関わるSRタンパク質のリン酸化反応のつぼとして働く (図1A, B)¹¹⁾。リピードRNAとしては、他にもショウジョウバエのHsr ω lncRNA、分裂酵母のmeiRNA、ヒトのSPA lncRNAやPNCTRなども同定されている (図1A)^{4, 6, 10)}。さらに、リピードRNAは種々の神経変性疾患でも認められる。たとえば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、GGGGCCリピードRNA、ハンチントン病や脊髄小脳失調症で認められるCAGリピードや筋強直性ジストロフィー症で認められるCUGリピードなどで、核内で複数のRBPを取り込み、構造体を形成する (図1A)¹⁰⁾。このようなリピードRNAはRNA間相互作用が、相分離の誘導に大きく寄与する^{4, 12)}。ここまでは、1種類のRNAが特定の遺伝子座から転写され、形成される構造体についてふれたが、複数の遺伝子座から転写されるrRNAやhistone pre-mRNAもそれぞれ核小体とヒストンローカス体の形成に寄与する。さらに、細胞質でもRNAが相分離を誘導する例もあり、CLN3やBNI1 RNAがWhi3タンパク質とともに形成する細胞質顆粒やSARS-CoV-2のゲノムRNAがnucleocapsidタンパク質とともに相分離を誘導することなどが報告されている¹²⁾。Whi3顆粒の形成では、CLN3あるいはBNI1の2種類のRNAがWhi3タンパク質を集め、相分離を誘導するが、RNA上でのWhi3の配置が密か疎であるかで構造体の物性が変化する。物性を規定する上で、結合するタンパク質は重要であり、IGS RNAに

より誘導されるアミロイド体は、可逆的に凝集する固体の構造体である⁷⁾。つまり、arcRNAは、そのRNA配列により、結合するタンパク質の種類や配置を制御することで、構造体の性状・機能を規定する設計図になる。

ここまで、述べたarcRNAのほとんどが、個別に発見されてきたが、我々は、arcRNAを網羅的に探索する手法を開発した。この手法は、arcRNAに共通するRNA抽出試薬に溶解されづらい“難溶性”という性質を利用しており、この難溶性RNAをRNA-seqを用いて、網羅的に同定した¹³⁾。その結果、確認したarcRNA候補については、すべて核内で構造体を形成しており、pre-mRNAなども含まれており、さまざまな種類のRNAがノンコーディング様の機能を持ち相分離していることがうかがえた。興味深いことに、最近、RIC-seqやRD-SPRITEといった手法によっても、600種類以上の核内構造体形成に関わる可能性があるRNAが同定されており、RNAが主導する相分離構造体の世界は今後も広がりを見せると思われる。

4. パラスペックルの形成・形態・機能をつかさどる NEAT1_2 lncRNAの機能ドメイン

我々は、これまでNEAT1_2をモデルにパラスペックルの形成と機能の解析を進めてきた。その中で、パラスペックルの設計原理を理解するため、NEAT1のどのRNA領域が形成や機能に重要であるかを、ヒト一倍体細胞株HAP1で200種類以上に及ぶNEAT1_2変異細胞株を樹立し、表現型の解析を進めた。その結果、NEAT1_2 lncRNAには、複数の機能RNAドメインが含まれていることがわかった(図2)⁹⁾。NEAT1_2 RNA自体の安定性、NEAT1のアイソフォームの切り換えに関わる領域や、上述のように相分離誘導に関わる領域がNEAT1_2の中央に存在し、そこに相分離を誘導するNONOやFUSといったタンパク質が多数結合することが明らかになった⁹⁾。さらに、種間で保存されたUGリピート配列は、TDP-43タンパク質をトラップし、ES細胞の効率的な分化での役割を明らかにした⁷⁾。このように、lncRNAは機能モジュールドメインを持つことができる。NEAT1_2以外にも、X染色体の不活性化に関わるXIST lncRNAは、A~Fリピートと呼ばれる反復配列が、機能ドメインとなっており、特定のタンパク質をリクルートする場を提供し、XISTの持つ多彩な機能を支えている。このXIST lncRNAについても、相分離がその形成の初期段階に関わっており、RNAの機能ドメイン構造の理解から、RNAが持つ機能発現メカニズムが明らかになってきている。

5. ソフトマター物理理論によるRNAを骨格とする非膜性構造体形成原理の理解

現在、我々は、RNAが骨格となる相分離構造体の形成機構を、ソフトマター物理学の理論を用いて、理解することを試みている。まず、核内で転写されたRNAが、その結合タンパク質とともに相分離を誘導する過程について、溶液中高分子の相分離の標準理論であるFlory-Huggins理論を拡張することで、理論モデルを構築した(図3A)¹⁴⁾。この理論からRNAの転写量がある閾値を超えた段階で相分離が誘導され、RNAの転写量が増えることで相分離構造が大きくなることが予測された。この過程は、マクロ相分離と呼ばれる過程であり、核小体など転写により誘導される構造体に対して、この理論は適用できると考えられる。一方、この理論では、RNAやタンパク質は相分離構造体内でランダムに存在していると仮定しており、パラスペックルの規則的な内部構造や円筒構造はうまく説明できない。我々は、このパラスペックルの特徴が、ブロック共重合体が形成する高分子ミセルと類似している点に着目し、NEAT1_2とその結合タンパク質により構成されるNEAT1_2 RNPをブロック共重合体、パラスペックルを高分子ミセルと仮定し、パラスペックル形成の理論的枠組みを構築した(図3B)^{15, 16)}。ブロック共重合体とは、2種類以上の高分子ブロックが繋がった高分子の総称である。各ブロックの性質が異なるために、互いのブロックどうしが反発しあうが、つながっているために完全に分離することができず、分子のサイズに制限された、比較的小さな相を作り上げる。そのため、この相分離過程は、マクロ相分離に対して、ミセル化と呼ばれる。たとえば、親水性和疎水性のブロックが繋がった(AB)ブロック共重合体は、水中では親水性の部分を外側に向け、疎水性の部分を内側に集めた、リン脂質のミセルのような構造をとる(図3C)。また、ブロックの長さやブロック共重合体の量などに依存して、球だけではなく、円筒構造もとることができ(図3C)、パラスペックルの形態と非常に類似性が高い。このミセル理論では、ミセルの形態や大きさは、系の自由エネルギーを最小化する方向で決まると考えるが、その際いくつかのエネルギーを考慮する。その中で、シェル部における反発力がミセル化の過程では必須である。この反発力がなければ、NEAT1_2 RNPがある限り、際限なくパラスペックルが大きくなり、表面張力を最小にするため、球形をとることが予測されるが、実際にはそうならない。反発力が形態や大きさを規定する鍵となる。パラスペックルをブロック共重合体の高分子ミセルと捉えることで、パラスペックルの挙動をうまく説明できることがわかってきた。以下、理論による予測と検証実験について説明する^{15, 16)}。

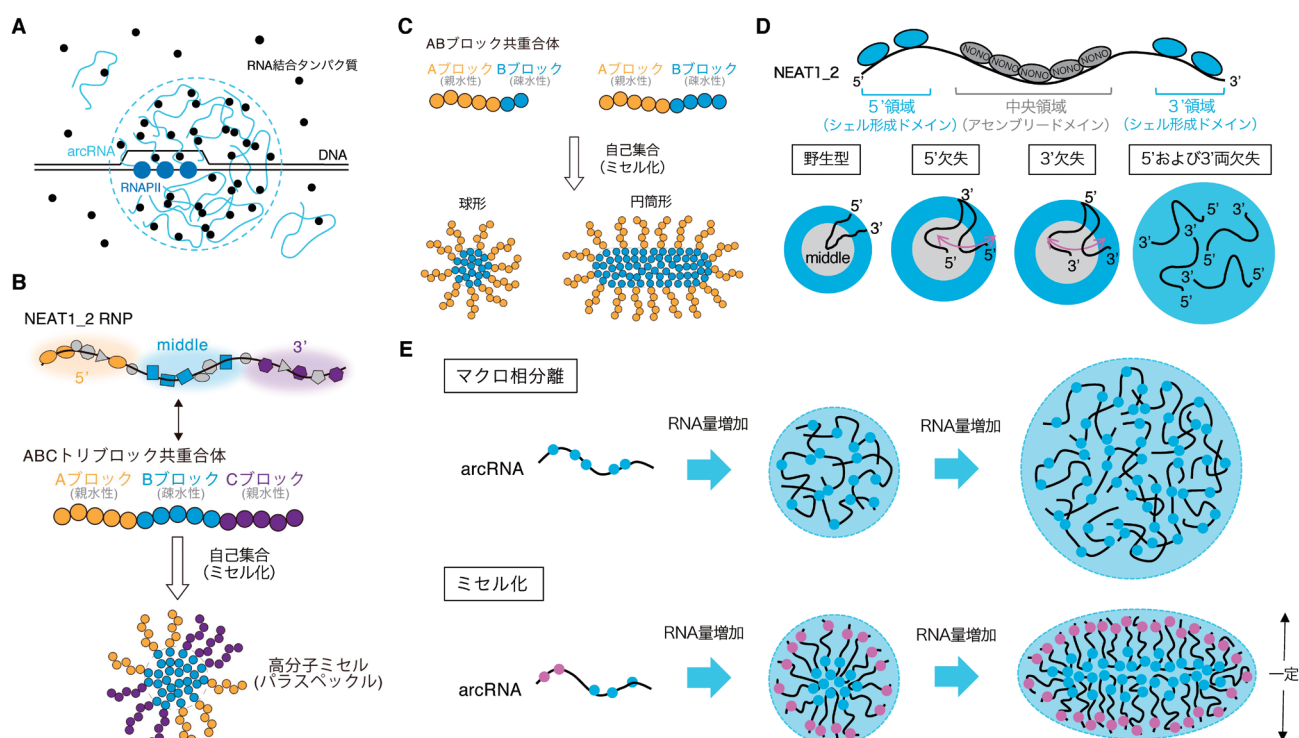


図3 パラスベクルはブロック共重合体の高分子ミセルとして振る舞う
 (A) Flory-Huggins 理論を拡張した、RNA ポリメラーゼにより転写された RNA が誘導する (マクロ) 相分離構造体形成モデル。点線の円は、相分離領域を表す。(B) パラスベクルのブロック共重合体の高分子ミセルモデル。(C) ブロック共重合体による自己集合体の形態。2 種類の高分子ブロックにより構成される AB ブロック共重合体について例示。(D) NEAT1_2 の欠失変異体における NEAT1_2 の配置と構造体の大きさの変化。NEAT1_2 の中央領域には、自己集合に必須な NONO などのタンパク質が結合する。末端が欠失することで内部の NEAT1_2 の配置と構造体の大きさが変化する。(E) arcRNA により誘導されるマクロ相分離とミセル化。arcRNA の量が増加した場合の変化を示す。(A) は文献 14, (B, C) は文献 15 の図をそれぞれ改変して引用。

我々の変異体を用いた解析から、NEAT1_2 の末端領域を欠失させると、その配置がパラスベクル内部に入り込むことがわかってきた (図 3D)。この変化は、上記の理論から、親水性ブロックが減少したことで、内部 (コア) に入る際のエネルギー的なロスが野生型と比べて減るためと説明できる。また、この際にシェルでの反発力が減少したことによって、パラスベクルに取り込まれる NEAT1_2 RNP 数が増え、パラスベクル体積が大きくなると予測された。そこでこれらを測定したところ、この予測と一致して、NEAT1_2 末端欠失によって、パラスベクルに取り込まれる NEAT1_2 数が増加し、パラスベクル体積は大きくなった (図 3D)。さらに、5' と 3' の両方を欠失した変異体では、シェルでの反発力がほぼ失われるため、マクロ相分離様の挙動を示し、パラスベクルは球形になり、NEAT1_2 の転写量が増えた分だけ、パラスベクルは融合し大きくなることが予測されたが、この点も実験的に実証できた (図 3E)。また、NEAT1_2 の転写量が増えるとパラスベクルは円筒形をとるようになるが、この点は、理論から、コアでの NEAT1_2 の弾性エネルギー、シェルで

の反発力、表面張力の関係によりうまく説明できた。この一連の解析により、パラスベクルが、ブロック共重合体ミセルとして形成されることを明らかにした。

6. おわりに

RNA が、液-液相分離 (LLPS; マクロ相分離の一種) だけではなく、ミセル化を誘導することがわかった (図 3E)。ミセル化の特徴は、1) コア-シェル構造などの規則的な構造を作る、2) サイズが制御される (適切なサイズ・大きくなりすぎない)、3) マクロ相分離に比べ、数が多く、表面積も大きくなる、4) 融合が起こりにくいなどがあげられる。これらの特徴から、たとえば、細胞内相分離のサイズ制御において、これまでに報告されている機構に比べて、ミセル化による制御は分子サイズにより規定されるため、厳密な制御に向いていると考えられ、これが機能上重要な可能性がある。また、マクロ相分離では、融合が進み、大きくなりすぎる可能性があり、そうした場合、ゲノムの 3 次元配置など他の核内プロセスに影響が出るか

もしれない。他にも、同量のRNAであれば、ミセル化の方が多くの構造体を形成できる。そのため、核内に分散し、多くのクロマチン領域と結合する場合にも有利であると考えられる。さらに、シエルには、pre-miRNAなど特定のRNAが隔離されるため、ミセル化により、パラスペックルの数が増え、シエル領域が大きくなれば効率的に隔離機能を果たすことができる。このように、構造と機能の関連については重要な課題であるが、シエルを構成するタンパク質を同定しその機能を解析することで、RNAにより誘導される相分離構造体の構造-機能相関の深い理解につながる事が期待できる。

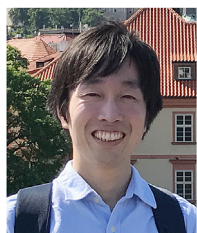
最近、細胞内の分子集積に関して、十分な実験証拠なく、LLPSという用語が多用されていることに警鐘が鳴らされているが¹⁷⁾、我々の研究では、パラスペックルの形成はLLPSではなく、別のタイプの相分離現象であるミセル化によって起こることが明らかになった。これは、細胞内における相分離の新たな形態を示しただけではなく、RNAが持つ構造体形成における新たなポテンシャルを示すことにもつながった。合成高分子の研究では、ブロック共重合体は、球や円筒構造だけではなく、層状構造、ベシクル構造、海島構造などともとることが示されている。細胞内には、電子顕微鏡による解析から特徴的な構造を持つものが知られており、こういった構造が同様のメカニズムで形成されているかは興味深い。理論と実験との連携を緊密に研究を進めることで、生物学においても理論予測から実験をデザインする研究が非常に有効であることを我々の研究は示している。細胞内相分離研究における物理理論を取り入れた解析の重要性は今後さらに増すものと思われる。

文 献

- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., & Rosen, M.K. (2017) Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285–298.
- Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2020) Consideration and challenges in studying liquid–liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell*, **176**, 419–434.
- Bracha, D., Walls, M.T., & Brangwynne, C.P. (2019) Probing engineering liquid-phase organelles. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1435–1445.
- Yamazaki, T., Nakagawa, S., & Hirose, T. (2019) Architectural RNAs for membraneless nuclear body formation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **84**, 227–237.
- Van Treeck, B. & Parker, R. (2018) Emerging roles for intermolecular RNA–RNA interactions in RNP assemblies. *Cell*, **174**, 791–802.
- Chujo, T., Yamazaki, T., & Hirose, T. (2016) Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 139–146.
- Souquere, S., Beauclair, G., Harper, F., Fox, A., & Pierron, G. (2010) Highly ordered spatial organization of the structural long noncoding NEAT1 RNAs within paraspeckle nuclear bodies. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 4020–4027.
- 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. *J. Cell Biol.*, **214**, 817–830.
- Yamazaki, T., Souquere, S., Chujo, T., Kobelke, S., Chong, Y.S., Fox, A.H., Bond, C.S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2018) Functional domains of NEAT1 architectural lncRNA induce paraspeckle assembly through phase separation. *Mol. Cell*, **70**, 1038–1053.
- Ninomiya, K. & Hirose, T. (2020) Short tandem repeat-enriched architectural RNAs in nuclear bodies: Functions and associated diseases. *Noncoding RNA*, **6**, 6.
- Ninomiya, K., Adachi, S., Natsume, T., Iwakiri, J., Terai, G., Asai, K., & Hirose, T. (2020) LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation. *EMBO J.*, **39**, e102729.
- Roden, C. & Gladfelter, A.S. (2020) RNA contributes to the form and function of biomolecular condensates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 183–195.
- Chujo, T., Yamazaki, T., Kawaguchi, T., Kurosaka, S., Takumi, T., Nakagawa, S., & Hirose, T. (2017) Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs. *EMBO J.*, **36**, 1447–1462.
- Yamamoto, T., Yamazaki, T., & Hirose, T. (2020) Phase separation driven by production of architectural RNA transcripts. *Soft Matter*, **16**, 4692–4698.
- Yamazaki, T., Yamamoto, T., Yoshino, H., Souquere, S., Nakagawa, S., Pierron, G., & Hirose, T. (2021) Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles. *EMBO J.*, e107270. <https://10.15252/embj.2020107270>
- Yamamoto, T., Yamazaki, T., & Hirose, T. (2020) Triblock copolymer micelle model of spherical paraspeckles. *bioRxiv*. <https://10.1101/2020.11.01.364190>
- McSwiggen, D.T., Mir, M., Darzacq, X., & Tjian, R. (2019) Evaluating phase separation in live cells: Diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes Dev.*, **33**, 1619–1634.

著者寸描

●山崎 智弘（やまざき ともひろ）



大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク講座RNA生体機能研究室特任講師。生命科学博士。

■略歴 2002年京都大学農学部卒業。10年京都大学大学院生命科学研究科，博士号取得。11年よりHarvard Medical School 博士研究員。14年より北海道大学遺伝子病制御研究所助教。19年より同講師。20年より現職。

■研究テーマと抱負 長鎖ノンコーディングRNAの機能発現メカニズム。特に，NEAT1 lncRNAの解析と，RNAとタンパク質による相分離の体系的な理解やALSなどの相分離異常が関わる疾患への応用を見据えた基礎研究を進めている。

■ウェブサイト https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/7

●廣瀬 哲郎（ひろせ てつろう）

大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク講座RNA生体機能研究室教授。理学博士。

■略歴 1995年名古屋大学にて博士取得，その後，名古屋大学助手，米国イェール大学博士研究員，東京医科歯科大学特任准教授，さきがけ専任研究員，産業技術総合研究所チーム長／グループ長，北海道大学教授を経て，2020年より現職。

■研究テーマと抱負 RNAの機能ポテンシャルの拡張，ゲノム中に潜む新機能探索。

■ウェブサイト https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/ja/research_group/detail/7