

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06187

研究課題名(和文) 神経変性疾患の原因遺伝子が引き起こすクロマチン構造変換の分子機構の解析

研究課題名(英文) Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation

研究代表者

井手 聖 (Ide, Satoru)

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・助教

研究者番号：50534567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リボソーム合成工場である核小体には、大量のリボソームRNA(rRNA)を供給するためにrRNA遺伝子(rDNA)が局在する。次世代シーケンサーを使った遺伝性疾患ゲノム解析により、rRNAの転写の担うRNAポリメラーゼIや転写因子UBFの変異がいくつかの異なる希少疾患の原因変異として同定されているが、その発症メカニズムはわかっていない。本研究では、神経疾患の原因変異がタンパク質を不安定化させ機能喪失型であること、頭蓋顔面骨形成不全症の原因変異は機能獲得型であり細胞内相分離を介して積極的に転写の抑制に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的な所見を有しながら通常の医療の中で診断に至ることが困難な病気が多くあり、原因もわからず、治療方法も見つからないままになっている。本研究では、次世代シーケンサーを使った遺伝性疾患ゲノム解析により同定された、タンパク質翻訳装置であるリボソーム合成に関わる因子の変異を解析した。その結果、油と水が分離する原理、いわゆる液-液相分離がリボソームの異常に起因するヒト遺伝性疾患の原因となることを明らかにした。今後このような細胞の異常や関連疾患の理解が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The nucleolus is a nuclear body with multiphase liquid droplets for ribosomal RNA (rRNA) transcription. How rRNA transcription is regulated in the droplets remains unclear. Here, using single-molecule tracking of RNA polymerase I (Pol I) and upstream binding factor (UBF), we reveal suppression of transcription with phase separation. For transcription, active Pol I formed small clusters/condensates that constrained rDNA chromatin in the nucleolar fibrillar center (FC). Treatment with a transcription inhibitor induced Pol I to dissociate from rDNA chromatin and to move like a liquid within the nucleolar cap that transformed from the FC. Expression of a Pol I mutant associated with a craniofacial disorder inhibited transcription by competing with wild-type Pol I clusters and transforming the FC into the nucleolar cap. The cap droplet excluded an initiation factor, ensuring robust silencing. Our findings suggest a mechanism of rRNA transcription suppression via phase separation.

研究分野：分子生物

キーワード：リボソームRNA遺伝子 RNAポリメラーゼI 希少疾患 液-液相分離

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボソーム合成工場である核小体には、大量のリボソーム RNA (rRNA) を供給するために rRNA 遺伝子 (rDNA) が局在する。転写因子 UBF が rDNA 領域全体に結合しユニークなクロマチン構造を形成することで RNA ポリメラーゼ I (Pol I) による連続かつ高速な転写が可能となる。興味深いことに、次世代シーケンサーを使った遺伝性疾患ゲノム解析により、転写因子 UBF が神経疾患の責任遺伝子として同定されており、変異型 UBF によって rRNA の転写が亢進するハイパーアクティブ状態になっていることがわかってきている。

2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患の原因として同定された変異型 UBF が rRNA の転写を亢進させハイパーアクティブ状態へと引き上げるクロマチンの構造変換の仕組みを明らかにすることを目的としている。また、神経変性疾患の原因となる新たな RNA ポリメラーゼ I の変異や頭蓋顔面骨形成不全の原因となる変異の解析を行い、希少疾患発症のメカニズムの理解を深めることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 変異型 UBF により引き起こされる rDNA クロマチンの構造変換を明らかにするために、細胞内で分子の 1 個 1 個を観察できる超解像蛍光顕微鏡を用いて正常型 UBF と変異型 UBF の動きを一分子レベルで観察した。

(2) 神経疾患の患者から新たに同定された RNA ポリメラーゼ I のサブユニット上のヘテロ接合型変異 (二種類) について、それらが機能欠損型か機能獲得型かを横浜市立大学松本直通先生と共同で行った。

(3) 同じ RNA ポリメラーゼ I サブユニット上の変異で神経疾患ではなく頭蓋顔面骨形成不全を引き起こす変異が核小体の機能にどのような影響を与えるのか明らかにするために、超解像顕微鏡を用いて生きている細胞内で正常型と変異型 Pol I の動きを一分子レベルで観察した。

4. 研究成果

(1) 超解像顕微鏡を用いて生きている細胞内で正常型 UBF と変異型 UBF の動きを一分子レベルで計測したところ、期待に反して、変異の挿入によりその動きに大きな変化は見られなかった (図 1)。また変異型 UBF を一過的に発現させても、rRNA の転写量に変化がなかった。このことから HeLa 細胞などを用いた培養細胞系では患者由来の細胞で見られるような変異型 UBF によってクロマチン構造が変換し、rRNA の転写が亢進することを再現することは難しいと結論づけた。

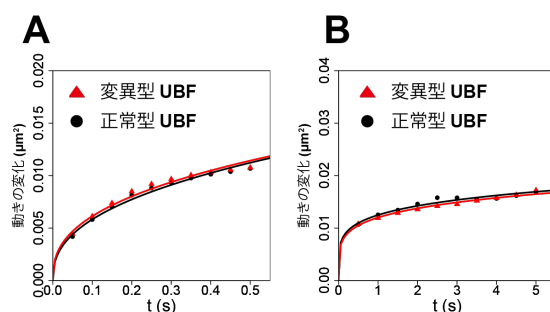


図 1 : 正常型 UBF と変異型 UBF の一分子レベルの動き。

(A) 0.5 秒間での動き、(B) 5 秒間での動き。ともに差はない。

(2) 神経疾患の原因変異が同定された Pol I の第 2 サブユニット POLR1B 遺伝子をクローニングし、部位特異的変異を挿入後、培養細胞で発現させたところ、二種類の変異型のタンパク質の核小体への局在と細胞内での安定な発現は確認できなかった (図 2 A&B)。このことから変異型タンパク質は細胞内において不安定であり、両アリルともに機能喪失性 (Loss Of Function) 変異であることが明らかとなった。また、マウス ES 細胞においてゲノム編集技術を用いて片側アリルを欠損させることで、ヘテロ接合性変異型の細胞を作製し (図 2 C、クローン 2)、神経前駆細胞に分化後リボソーム合成に与える影響について調べた。POLR1B^{+/-} 細胞株ではコントロールの親株と比べて rRNA の転写レベルが 60%ほどに低下していることがわかった (図 2 D、クローン 2)。したがって、新たに解析した神経疾患の原因変異は rRNA の転写をハイパーアクティブ状態にするものではなく、むしろ転写の活性を低下させるもので、その結果神経疾患を引き起こすことが示唆される。

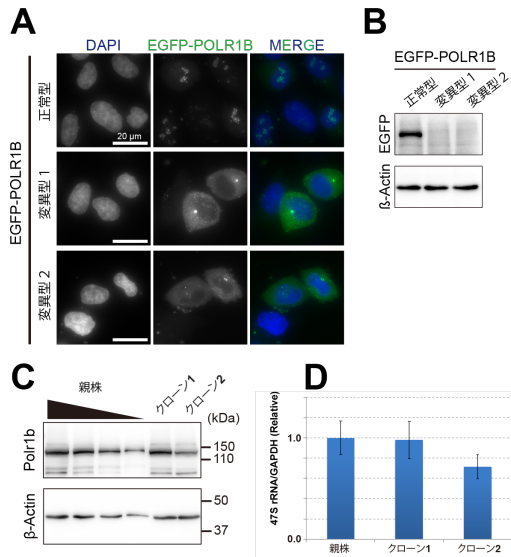


図2 : (A)POLR1B の細胞内局在。(B) ウェスタンブロットによる POLR1B タンパク質の発現レベル。(C) ゲノム編集技術によって片側アリルを欠損した2つのクローンの POLR1B タンパク質の発現レベル。(D)定量的 PCR による rRNA の転写量。片側アリルが欠損すると POLR1B のタンパク質の発現レベルが下がると同時に rRNA の転写量も下がる (クローン2)。

(3) 細胞の核内には核小体に代表されるような膜のない構造体が存在する。最近、それらの多くが液-液相分離を介して形成され、液滴様構造体 (ドロプレット) であることが細胞生物学のホットトピックとなっている。我々はこれまで転写が行われている通常状態では Pol I は rDNA クロマチン上でクラスター形成し、rDNA を拘束している一方、阻害剤により Pol I の転写が阻害されると、Pol I が rDNA からはずれ、自由拡散運動となり (図3A、黄緑色の点)、核小体内に流動性の高い巨大な液滴 (キャップ) となってたまっていることを見出していた。今回、ヒト遺伝性疾患の原因となる変異型 Pol I を発現させることでも超解像顕微鏡を用いて同様の分子が自由拡散した液滴が出現していることを見つけた (図3A、赤点)。興味深いことに、この変異型 Pol I は正常型のクラスター形成を阻害し、液滴から転写開始因子を選択的に排除することで、転写の安定的阻害に寄与すると考えられた (図3B)。以上、細胞内相分離がリボソームの異常に起因するヒト遺伝性疾患の原因となることから、このような細胞の異常や関連疾患の理解が進むことが期待される (図3C)。

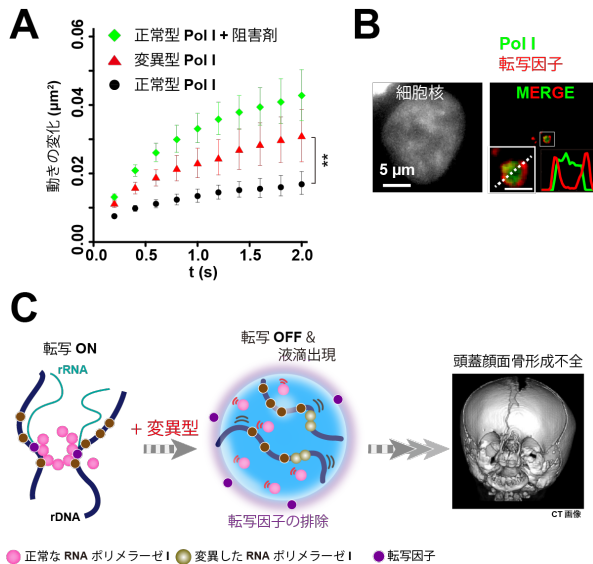


図3 : (A)正常型 Pol I、転写阻害した後の正常型 Pol I、変異型 Pol I の一分子レベルの動き。(B) 変異型 Pol I (緑) と Pol I の転写因子 (TAFIA、赤) の細胞内局在。転写因子が変異型 Pol I から分離されている。(C) ヒト遺伝性疾患の原因となる変異した RNA ポリメラーゼ I を発現させると、阻害剤を投与した時と同様に液滴である核小体のなかに新たな液滴が作られる (中央)。その際、転写に必要なタンパク質 (紫色のボール) が液滴から追いだされる (中央)。そのため液滴内に残る rRNA 遺伝子と正常な RNA ポリメラーゼ I による転写は起きない。このように生じるリボソーム合成過程の異常が頭蓋骨や顔の骨の形成不良を引き起こすと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeshima Kazuhiro, Ide Satoru, Babokhov Michael	4. 巻 58
2. 論文標題 Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mathilde Gauchier, Sophie Kan, Amandine Barral, Sandrine Sauzet, Eneritz Agirre, Erin Bonnell, Nehme. Saksouk, Teresa K. Barth, Satoru Ide, Serge Urbach, Raymund J. Wellinger, Reini F. Luco, Axel Imhof, Jerome Dejardin	4. 巻 5
2. 論文標題 SETDB1 dependent heterochromatin stimulates alternative lengthening of telomeres	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaav3673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aav3673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ide Satoru, Imai Ryosuke, Ochi Hiroko, Maeshima Kazuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabb5953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abb5953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Yuji, Iida Shiori, Tamura Sachiko, Nagashima Ryosuke, Shiraki Kentaro, Goto Tatsuhiko, Hibino Kayo, Ide Satoru, Maeshima Kazuhiro	4. 巻 4
2. 論文標題 1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202001005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202001005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Satoru Ide
2. 発表標題 Shut-down of ribosomal RNA transcription by liquid-like behavior of inactive RNA polymerase I
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoru Ide
2. 発表標題 Liquid droplets induced by aberrant RNA polymerase I in a craniofacial disorder lead to ribosome dysfunction
3. 学会等名 3R&3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手聖、今井亮輔、大地弘子、前島一博
2. 発表標題 Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井手聖、今井亮輔、大地弘子、前島一博
2. 発表標題 Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation
3. 学会等名 第38回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 井手聖、永島峻甫、前島一博	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 214(80-86)
3. 書名 教科書を書き換える！染色体の新常識	

1. 著者名 井手聖、前島一博	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 416(92-98)
3. 書名 相分離生物学の全貌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>細胞内のダイナミックなクロマチン構造 https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/03/research-highlights_ja/rh20190315.html</p> <p>転写は「液滴」によって制御されていた！ https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2020/10/research-highlights_ja/pr20201015.html</p> <p>ヘキサンジオールは細胞内のクロマチンの動きを止める https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2021/02/research-highlights_ja/rh20210204.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前島 一博 (Maeshima Kazuhiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松本 直通 (Matsumoto Naomichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関