

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06623

研究課題名(和文) RNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系を応用した新生鎖RNAの解析

研究課題名(英文) Development of a novel technology to capture RNA-chromatin interactions

研究代表者

加藤 雅紀 (Kato, Masaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：10625437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは約28,000種のノンコーディングRNA(ncRNA)が存在するが、ほとんどの機能は明らかになっていない。lncRNAがクロマチンに結合することで高次クロマチン構造が作り出される例が知られている。本研究ではRNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系RADICL-seq法を構築し、染色体高次構造に重要な役割をもつlncRNAを探索した。またその系の応用版として、RADICL-seq法を応用し、免疫沈降法と組み合わせることでライブラリーを濃縮することで新しい技術開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系RADICL-seq法を構築した。これまで核内RNAとクロマチンの相互作用の検出方法としてはChIRP-seqやCHART-seq法など1つのRNAをターゲットにした解析法しか存在しなかったがRADICL-seq法の開発により多くのRNAを同時に網羅的に解析することが可能となった。また免疫沈降法と組み合わせることで新しい技術に応用することで、よりターゲットを絞った解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：With the help of sequencing technologies, thousands of lncRNAs have been identified. Most of them are present in the nucleus, and up to 40% of lncRNAs exert their functions by binding to chromatin. The interactions of lncRNAs with their target chromatin DNA are not clear. Therefore, the function of most lncRNAs remains unknown. Here, we developed a novel method to capture RNA-chromatin interactions at a genome-wide scale called RADICL-seq (RNA And DNA Interacting Complexes Ligated and sequenced). RADICL-seq is a proximity ligation-based methodology that broadly identifies the target genomic regions for coding and ncRNAs. We made RADICL libraries of several cell lines from mouse, human and Drosophila. We demonstrated the compatibility of this technology to map ncRNAs roX in Drosophila S2 cells and Xist lncRNA in mouse female cells.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ノンコーディングRNA 新生鎖RNA クロマチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム中約2%がタンパク質をコードするが、ゲノム中70%以上の領域で転写が起こっており、半数以上が ncRNA としてなんらかの機能を持つことが示唆されている。その中で200塩基以上のものが長鎖 ncRNA (lncRNA) とされるが、lncRNA の機能については不明な点が多い。いくつかのものにおいてはクロマチン修飾などエピジェネティックな制御に働くものやエンハンサーRNA (eRNA) など転写調節に関わる機能、遺伝子転写産物の安定化や翻訳活性に関わる機能などが知られている。例えば Xist RNA は X 染色体の不活性化に関わっており、不活性化される X 染色体から発現し、抑制的ヒストン修飾 H3K27me3 を担うメチル化酵素 EZH2 を含む Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) をクロマチン上にリクルートすることで染色体の高次構造を形成していくことが報告されている(Pintacuda et al., 2017, Mol Cell)。

いくつかの lncRNA がクロマチンと相互作用し遺伝子発現調節などに関わることから、機能の未知な非常にたくさんの ncRNA を解析する上で、RNA とクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系の開発が不可欠である。個々の lncRNA とクロマチンの相互作用を検出する系としては ChIRP-seq (Chu et al., 2011, Mol Cell) や RAP-seq (Engreitz et al., 2013, Science) などいくつかの系が開発されている。また染色体高次構造を解析する方法としては Hi-C 法が多く用いられている。よってこれらを組み合わせた、RNA を介したクロマチンとの相互作用を検出する Hi-C のような系の開発は非常に有用であると考えられる。特に最近になって eRNA と呼ばれる ncRNA がエンハンサー領域から転写されていることがわかってきており、eRNA とプロモーターの相互作用を網羅的に検出できる系が開発できれば eRNA の機能の解明に非常に有益であると考えられる。

### 2. 研究の目的

#### (1) RADICL-seq (RNA and DNA Interacting Complexes Ligated) 法の開発

RNA と、その RNA が相互作用するクロマチン領域にある DNA を、アダプターを介してライゲーションさせ、次世代シーケンサー用にライブラリーを作製することで、核内すべての RNA とクロマチンの相互作用を網羅的に検出することを目的とする。

#### (2) RADICL-seq法で検出された相互作用の生理学的評価と改良

XIST や HOTAIR などクロマチンとの相互作用することが知られている lncRNA を発現する細胞株を用い、RADICL-seq 法で検出された相互作用の生理学的評価を行う。

#### (3) 新生鎖RNA (nascent RNA) に注目したRADICL-seqを応用した系の開発

RADICL-seq は核内 RNA と近傍 DNA をライゲーションする方法であることから様々な目的に応用可能である。本研究では(1)(2)で開発した RADICL-seq を応用し、特に新生鎖 RNA に注目し eRNA とプロモーターの相互作用の全容解明を目標とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) RADICL-seq (RNA and DNA Interacting Complexes Ligated) 法の開発

細胞をホルムアルデヒドでクロスリンク後、核を抽出し、DNase I によるゲノムの切断を行う。5'末端をアデニル化しピオチンを付加したアダプターを介し核内 RNA とゲノム DNA をライゲーションさせる。脱クロスリンク、タンパク質消化後、逆転写で RNA を cDNA に変換する。アダプター上の制限酵素 EcoP15I サイトにより消化し、RNA と DNA の両方がライゲーションされたものを PCR 後アクリルアミドゲルにより切り出す。作製したライブラリーをイルミナ次世代シーケ

ンサーによりシーケンス、解析する。

(2) RADICL-seq 法で検出された相互作用の生理学的評価と改良

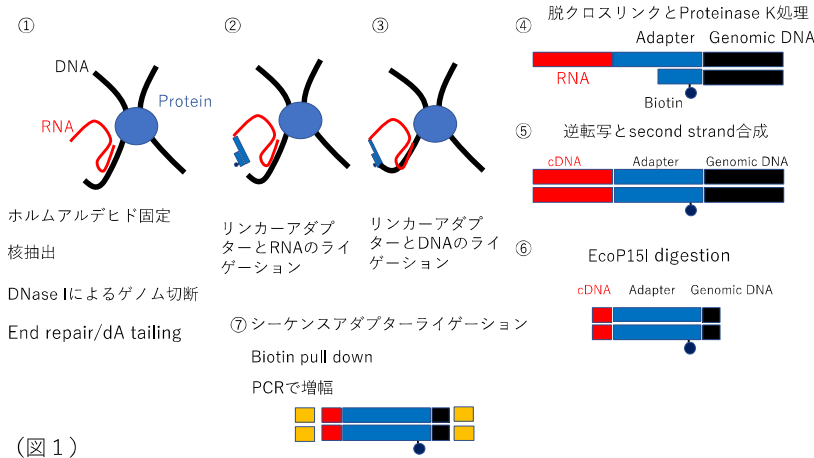
RADICL-seq で得られた相互作用が生理学的に正しいものか評価するために、XIST RNA や HOTAIR を発現する細胞株でライブラリーを作製する。パブリックなデータベースより XIST RNA とクロマチンの相互作用を解析した ChIRP-seq のデータを入手し、今回得られたデータと比較する。

(3) 新生鎖 RNA (nascent RNA) に注目した RADICL-seq を応用した系の開発

RADICL-seq は核内 RNA と近傍 DNA をライゲーションする方法であることから様々な目的に応用可能である。例えば RNA-DNA ライゲーション複合体をある特定の抗体などで濃縮する。抗 pol II 抗体で濃縮すれば新生鎖 RNA と DNA の、抑制的ヒストン修飾である H3K27me3 に対する抗体で濃縮すれば遺伝子発現抑制に関わる RNA とクロマチンの相互作用の解析に応用できる。よって RADICL-seq と ChIP-seq を組み合わせた応用系を開発する。

4. 研究成果

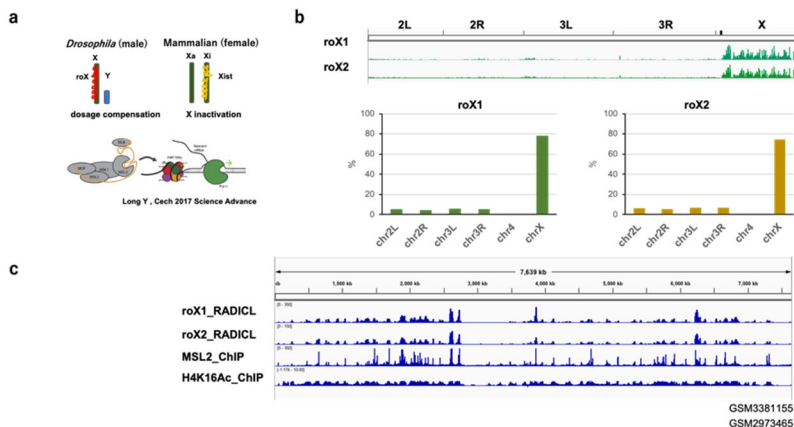
RADICL-seq (RNA and DNA Interacting Complexes Ligated) 法の開発



(図1)

我々のチームによって RADICL-seq の大まかなプロトコールは完成することができた (Bonetti et al., 2020) (図1)。RADICL-seq 法で検出された相互作用の生理学的評価と改良のため、クロマチンとの相互作用がよく知られる roX を発現するショウジョウバエ S2

細胞および XIST RNA を発現するメスマウス ES 細胞株, MEF 細胞を用いて RADICL-seq ライブラリーを作製した。S2 細胞における roX の X 染色体への結合 (図2) および MEF 細胞における XIST RNA の X 染色体への結合結果から報告されている ChIRP-seq, CHART-seq の結果と非常によく似ており、よって RADICL-seq 法が RNA とクロマチンの相互作用を検出する系として働くことが示された。その他ヒト iPS 細胞などいくつかの細胞からライブラリーを作製し、次世代シーケン



(図2) ショウジョウバエの遺伝子量補正に関わるncRNA roX1, roX2の局在RADICL-seqの結果よりroXは主にX染色体上に局在すること(b), MSL複合体因子MSL2のChIP-seqおよびH4K16AcのChIP-seqの結果と高い相関を示す

ーでデータを取得した。これらの結果は国際コンソーシアムであるFANTOMの成果の一部として報告した。

これらの研究により RADICL-seq 法で検出できる RNA の大半

はタンパク質をコードする新生鎖 RNA であることが明らかとなった。これは核内 RNA の大半は

新生鎖 RNA であることを反映している。よって RADICL-seq 法を応用し、特定の抗体による濃縮を組み合わせることによって、特定の領域を高感度で検出する系の開発を進めた。新生鎖 RNA とその相互作用するクロマチンを効率よく濃縮するために抗 RNA pol II 抗体を用い、マウス ES 細胞の RADICL-seq ライブラリーの途中産物から抗体 pull down を試みた。しかし、収量面で改善する必要性がみられた。よって 1) low input 用ライブラリー作製キットを用いるなどプロトコールを改変することで低収量でもライブラリー作製が可能となるか 2) 細胞数を増やすことで収量をあげること 3) 抗ヒストン修飾抗体を用いることで収量をあげることを検討した。これらの検討結果によりいくつかの抗ヒストン修飾抗体ではライブラリー作製が可能となった。よって次世代シーケンサー HiSeq を用いてデータを取得し解析を行った。その結果、抗 H3K27me3 抗体ではマウス ES 細胞において H3K27me3 修飾に相互作用する RNA の候補が多く同定できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Masaki, Carninci Piero	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-Wide Technologies to Study RNA-Chromatin Interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 20 ~ 20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ncrna6020020	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 Abugessaisa Imad et al.	4. 巻 49
2. 論文標題 FANTOM enters 20th year: expansion of transcriptomic atlases and functional annotation of non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 D892 ~ D898
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1054	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤雅紀
2. 発表標題 RNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系を用いたRNA局在の解析
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤雅紀、Yip Wing Hin、Bonetti Alessandro、橋本浩介、村田光義、Carninci Piero
2. 発表標題 RNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤雅紀、Bonetti Alessandro、橋本浩介、Yip Wing Hin、Carninci Piero
2. 発表標題 RNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系の開発
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 雅紀, Xufeng Shu, Alessandro Bonetti, 橋本 浩介, Piero Carninci
2. 発表標題 RNAとクロマチンの相互作用を網羅的に検出する系を用いた空間的転写制御の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xufeng Shu, 加藤 雅紀, Piero Carninci
2. 発表標題 新しい技術RADIP-seq法を用いた機能的lncRNAの探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------