

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19235

研究課題名（和文）非コードRNA転写領域のクロマチンを開くパイオニアポリメラーゼ複合体の探索

研究課題名（英文）Search for a pioneer polymerase complex that opens chromatin in non-coding RNA transcribed regions

研究代表者

廣田 耕志（Hirota, Kouji）

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：00342840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：非コードRNA転写はさまざまな生物で見出され、生命の本質的機能をもつことが想定されているが、ほとんどの非コードRNAの機能はわかっていない。これまでに分裂酵母fbp1遺伝子上流に非コードRNAのmIonRNAを発見し、このRNA転写によるクロマチン再編成現象とこれと共役した転写転写活性化機構を見出している。本研究では、この非コードRNAによる制御が、ゲノム全体の転写のみならず組換えといったさまざまなDNAを基質とした反応の制御に関わるユニバーサルな機構であることを解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究により、減数分裂期組換えを誘導する配偶子形成時における環境ストレスが非コードRNA転写のパターンに影響し、ゲノム上の組換え部位の分布に影響を与えうることを示唆できた。また、mIonRNAは転写のみならず組換え制御にも関与する、グローバルな染色体機能の制御システムの一翼をなすことを示唆できた。この成果から、進化に寄与する減数分裂期組み換えによる遺伝子の多様化現象において、その配偶子を形成するときのストレス環境で機能する遺伝子近傍により大きくバイアスした組換えによる多様化が引き起こされ、効率的な遺伝子進化に寄与している可能性が考えられ、遺伝子機能の進化の新しい可能性を示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Although noncoding RNA transcription has been found in a variety of organisms and is assumed to have essential functions in life, the functions of most noncoding RNAs are unknown. We have discovered a noncoding RNA, mIonRNA, in the upstream region of the fission yeast fbp1 gene, and found a chromatin remodeling phenomenon by this RNA transcription and a transcription activation mechanism associated with this mIonRNA expression mediated chromatin remodeling. In this study, we elucidate that the regulation by this noncoding RNA is a universal mechanism involved not only in transcription but also in the regulation of various DNA-based reactions such as genome-wide recombination.

研究分野：分子生物学

キーワード：非コードRNA クロマチン 転写 組換え 減数分裂 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトでは全ゲノムの約2%を蛋白質コード領域が占めているが、ヒトゲノムの70%以上から蛋白質をコードしない非コードRNAとして転写されている(Hon 2017, FANTOM CAT)。非コードRNAの中には、サイレンシング、転写活性化などの遺伝子発現の各段階に影響を与える分子が知られているとともに(Fu 2014)、非コードRNA発現領域と減数分裂期組換え部位の相関が指摘されるなど(Wahls 2008)、非コードRNA転写と染色体機能調節の関係性が議論されている。これまで、非コードRNA分子自体が蛋白質を標的遺伝子座に動員する際のガイドRNAとして機能したり、転写制御因子に直接相互作用し機能調節したりするなど、個別の分子自体の機能の解析が進められているが、機能が解明されている分子は非コードRNA分子の中のごく一部であった。

### 分裂酵母 mlonRNA

当研究グループでは、これまでに分裂酵母のグルコース飢餓ストレスにより誘導される *fbp1* 遺伝子上流領域で発現する非コードRNA、mlonRNA (metabolic stress induced long ncRNA) を発見している (Hirota 2008 *Nature*)。この非コードRNAの転写により、転写領域のヒストンアセチル化およびクロマチン構造変換が転写領域上流から下流に順次開誘導され、転写因子の接近を可能とすることで、転写活性化に必須の働きをしていることを見出した(図1)。

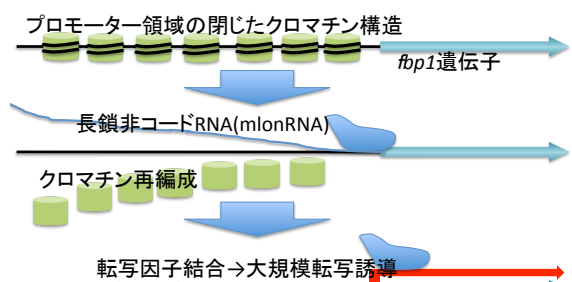


図1 パイオニアポリメラーゼ仮説 (Hirota et al. 2008 *Nature*)  
プロモーター領域上流からの非コードRNA転写によってRNAポリメラーゼ通過領域のヒストンタンパク質がクロマチンから外れ転写因子が接近できるようになり、転写活性化につながる。

### mlonRNA 転写に必要な cis-element (mlonBOX)

申請者はこれまでに *fbp1* プロモーター領域の配列入れ替えや変異導入によって、mlonRNA の転写開始 cis-element (*mlon-BOX*) を同定した (Senmatsu et al 2021 *Commun. Biol.*)。mlonRNA 転写が *fbp1* 以外の分裂酵母ゲノムにおいて染色体機能制御に寄与するのか検討するために、この *mlon-BOX* を減数分裂期組換え活性部位の *ade6-M26* 遺伝子座に移植する実験を行うと、移植部位からの非コードRNA転写が見られ、組換えが2倍以上に活性化することが明らかとなった。この事実から、*mlon-BOX* は *fbp1* 以外の遺伝子座でも機能し、転写のみならず組換えの活性化にも寄与することが示された (Senmatsu et al 2021 *Commun. Biol.*)。さらに、この *mlon-BOX* 配列と減数分裂期組換え部位との位置関係をゲノム解析によって調べると、組換え部位の200 bp以内にこの cis-element が多く分布することが明らかとなった。これらの事実から、mlonRNA 転写による染色体機能の制御機構は、分裂酵母ゲノムの普遍的なシステムであることが示唆された(図

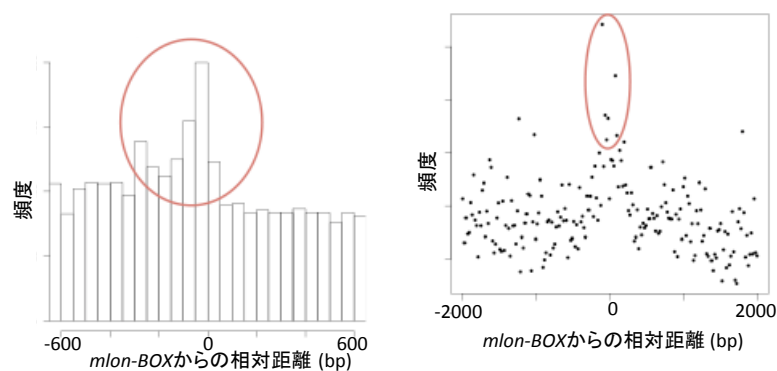


図2 分裂酵母ゲノムに存在する mlonBox の転写開始部位 (TSS) (左) と減数分裂期組換え部位 (右) との関係。mlonBox と転写開始部位 (TSS) や組換え部位に有意な相関が見られる (丸印で囲った部分)。

2)。

## 2. 研究の目的

本研究では、非コードRNA自身の機能ではなく、転写するポリメラーゼの通過に伴う染色体機能制御の可能性を示唆するパイオニアポリメラーゼ仮説「非コードRNAを転写するポリメラーゼがパイオニアとしてその通過領域のクロマチン構造を緩め、転写以外の組換えなどのDNAを基質とする反応に対してもその制御に寄与する」ことを立証する。この目的のために、mlonRNA転写がグルコース飢餓時に誘導される *fbp1* 遺伝子上流領域におけるストレスに応答したクロマチンの再編成と減数分裂期組換えの開始に必須のDNA二重鎖切断の形成について調査を行う。この機構は転写物の配列に依存しない普遍的な機構であることが想定でき、これまでに発見された膨大な種類の非コードRNAの機能の解明につながることを期待できる。

### 3. 研究の方法

1. 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子上流での、*mIcn*RNA 転写を誘導によるクロマチン再編成を検討するとともに、クロマチン再編成領域における DNA 二重鎖切断の形成パターンの変化について検討する。
2. 環境ストレスに応答した DNA 二重鎖切断の形成パターンの変化は、すはわち「ストレスによる組換え分布の可塑性」につながることを期待できる。*mIcn*RNA 転写によるクロマチン再編成がこの現象に関与している可能性が高いので、この応答に必須の *fbp1* 上流領域のシス配列を同定するとともに、組換えパターンの変化に関与する転写因子やクロマチン修飾機構を分析する。

### 4. 研究成果

1. 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子上流のクロマチン構造を球菌ヌクレアーゼによる消化部位のマッピングを行うことで、ヌクレオソーム配置を解析すると、図2のようにグルコース飢餓ストレスに応答し1時間後から開いたクロマチン構造（切断シグナルとして矢印とドット線で示した位置に検出）に変化していることがわかった（図2左）。この領域の減数分裂期 DNA 二重鎖切断を調査すると、クロマチンが開いた領域に切断がストレス時のみに2箇所形成されている様子があった。

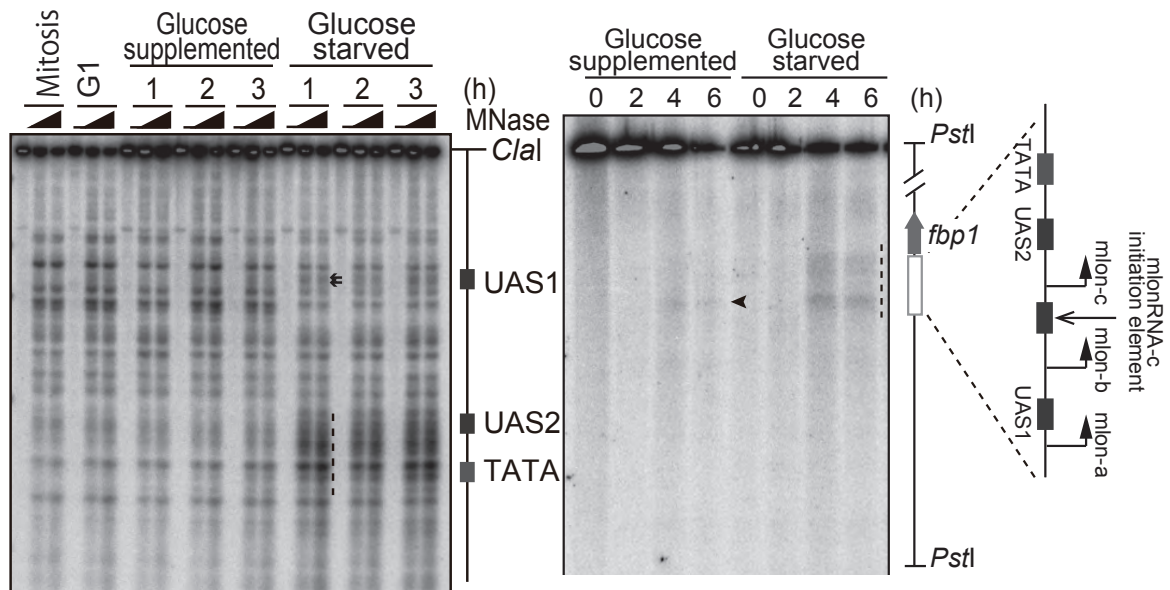


図2 *fbp1* 遺伝子上流のクロマチン構造（左）と二重鎖切断パターン（右）

2. *mIcn*RNA 転写に必要なエレメントとして、当研究室では UAS1 と *mIcn*Box という 2 種類の上流シスエレメントを発見している (Senmatsu et al 2019 *Scientific Rep.*). この他に、*fbp1* の mRNA 転写に必要なが、非コード RNA 転写には不要のシスエレメント、UAS2 や TATA-box も上流領域には存在する。これらの 4 種のシス配列を置換変異した細胞を作製し、それらでのクロマチン構造を調べると図3に示すように、非コード RNA 転写に必須の UAS1 と *mIcn*Box の変異のみでクロマチン構造変化の不良が見られた（図3）。UAS1 変異では UAS1（矢頭）と TATA 付近（ドット線）の両方の変化が見られず、*mIcn*Box 変異では TATA 付近（ドット線）のみの変化が不良となっていた。これらの結果は、*mIcn*RNA 転写が UAS1 変異では完全に不良となり、*mIcn*Box 変異では最も下流に位置する *mIcn*RNA のみが転写不良となる事実と一致する。

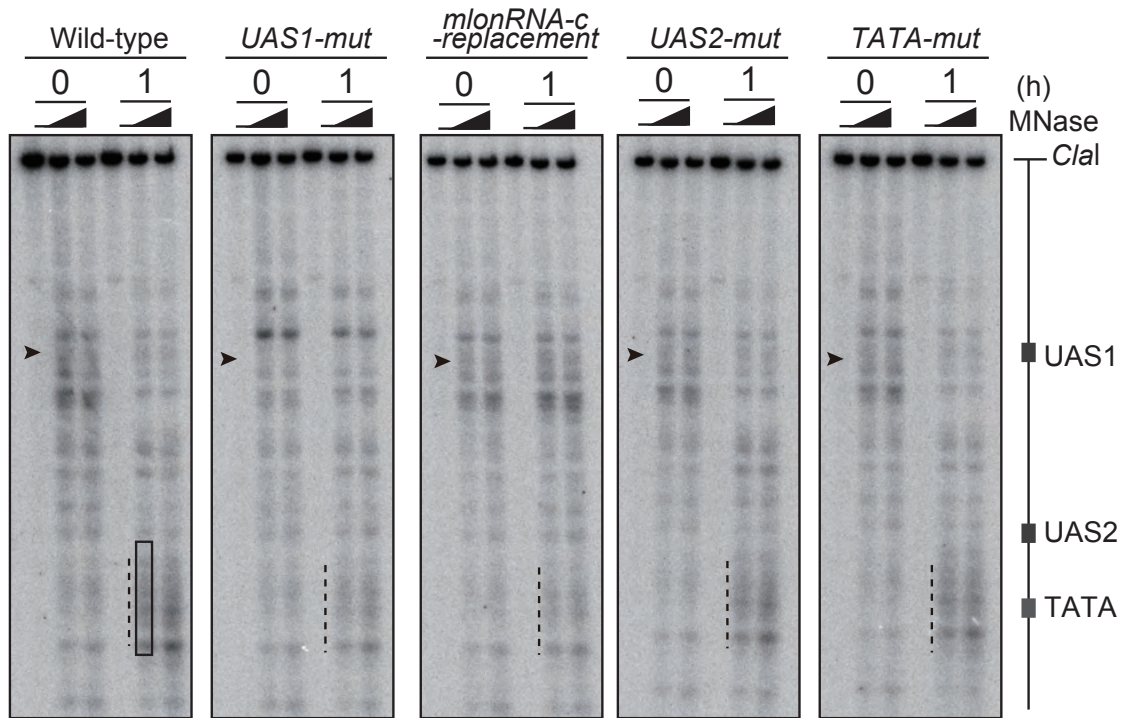


図3 各シスエレメントの変異細胞でのクロマチン再編成の状況

この時の、DNA 二重鎖切断の形成パターンを調べると、UAS1 変異と *mlon*Box 変異とでのみ DNA 二重鎖切断の形成が不良化していることが判明した (図4)。クロマチン再編成の不良と一致して、UAS1 変異では2箇所形成される DNA 二重鎖切断部位後両方ともに低下していた (黒矢印)。また、*mlon*-Box の変異体では下流部位のクロマチン再編成不良の見られる領域のみの DNA 二重鎖切断の形成不良が見られた (赤矢印)。この結果から、*mlon*RNA 転写によるクロマチン再編成領域に減数分裂期組換えが誘導され、この制御にストレス応答性非コード RNA の *mlon*RNA 転写が必須の働きを持つことが判明した。

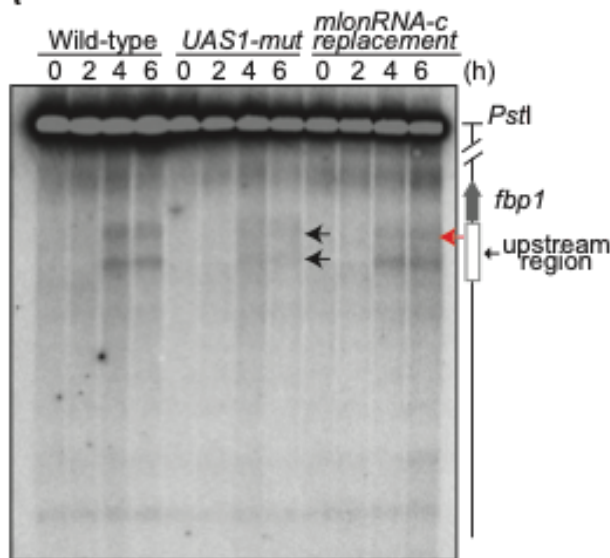


図4 減数分裂期 DNA 二重鎖切断には非コード RNA の *mlon*RNA 転写が必要である。

上記の研究により、減数分裂期組換えを誘導する配偶子形成時における環境ストレスが非コード RNA 転写のパターンに影響し、ゲノム上の組換え部位の分布に影響を与えうることを示唆できた。また、*mlon*RNA は転写のみならず組換え制御にも関与する、グローバルな染色体機能の制御システムの一翼をなすことを示唆できた。この成果から、進化に寄与する減数分裂期組換えによる遺伝子の多様化現象において、その配偶子を形成するときのストレス環境で機能する遺伝子近傍により大きくバイアスした組換えによる多様化が引き起こされ、効率的な遺伝子進化に寄与している可能性が考えられ、遺伝子機能の進化の新しい可能性を示唆できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 T. Abe, Y. Suzuki, T. Ikeya, K. Hirota	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting chromosome trisomy for chromosome editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97580-1.	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 A.A. Demin, K. Hirota, M. Tsuda, M. Adamowicz, R. Hailstone, J. Brazina, W. Gittens, I. Kalasova, Z. Shao, S. Zha, H. Sasanuma, H. Hanzlikova, S. Takeda, K.W. Caldecott	4. 巻 81
2. 論文標題 XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell	6. 最初と最後の頁 3018-3030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.05.009. Epub 2021 Jun 7.	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 該当する
1. 著者名 N.L. Hindul, A. Jhita, D.G. Oprea, T.A. Hussain, O. Gonchar, M.A.M. Campillo, L. O'Regan, M.T. Kanemaki, A.M. Fry, K. Hirota, K. Tanaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Construction of a human hTERT RPE-1 cell line with inducible Cre for editing of endogenous genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.059056	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 該当する
1. 著者名 K. Hirota, M. Ooka, N. Shimizu, K. Yamada, M. Tsuda, M.A. Ibrahim, S. Yamada, H. Sasanuma, M. Masutani, S. Takeda	4. 巻 -
2. 論文標題 XRCC1 counteracts poly(ADP ribose)polymerase (PARP) poisons, olaparib and talazoparib, and a clinical alkylating agent, temozolomide, by promoting the removal of trapped PARP1 from broken DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12929.	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 Y. Inomata, T. Abe, M. Tsuda, S. Takeda, K. Hirota	4. 巻 16
2. 論文標題 Division of labor of Y-family polymerases in translesion-DNA synthesis for distinct types of DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0252587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone0252587	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 R. Kawasumi, T. Abe, I. Psakhye, K. Miyata, K. Hirota, D. Brnzei	4. 巻 35
2. 論文標題 Vertebrate CTF18 and DDX11 essential function in cohesion is bypassed by preventing WAPL-mediated cohesin release	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Dev	6. 最初と最後の頁 1368-1382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gab.348581.121	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 該当する

1. 著者名 W. Koda, S. Senmatsu, T. Abe, C.S. Hoffman, K. Hirota	4. 巻 49
2. 論文標題 Reciprocal stabilization of transcription factor binding integrates two signaling pathways to regulate fission yeast fbp1 transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 9809-9820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab758	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

1. 著者名 A. Sassa, T. Fukuda, A. Ukai, M. Nakamura, R. Sato, S. Fujiwara, K. Hirota, S. Takeda, K.I. Sugiyama, M. Honma, M. Yasui	4. 巻 36
2. 論文標題 Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 331-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mutage/geab025	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 S. Senmatsu, R. Asada, A. Oda, C.S. Hoffman, K. Ohta, K. Hirota	4. 巻 4
2. 論文標題 lncRNA transcription induces meiotic recombination through chromatin remodelling in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01798-8	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

1. 著者名 Asada Ryuta, Hirota Kouji	4. 巻 12
2. 論文標題 Multi-Layered Regulations on the Chromatin Architectures: Establishing the Tight and Specific Responses of Fission Yeast fbp1 Gene Transcription	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1642-1645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12111642	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 Hirota Kouji	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation Mechanisms of Meiotic Recombination Revealed from the Analysis of a Fission Yeast Recombination Hotspot ade6-M26	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1716-1726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12121761	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 Hirota Kouji, Ooka Masato, Shimizu Naoto, Yamada Kousei, Tsuda Masataka, Ibrahim Mahmoud Abdelghany, Yamada Shintaro, Sasanuma Hiroyuki, Masutani Mitsuko, Takeda Shunichi	4. 巻 27
2. 論文標題 XRCC1 counteracts poly(ADP ribose)polymerase (PARP) poisons, olaparib and talazoparib, and a clinical alkylating agent, temozolomide, by promoting the removal of trapped PARP1 from broken DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 331-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12929	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 Ikemoto Daiki, Taniguchi Tomoya, Hirota Kouji, Nishikawa Kiyoshi, Okubo Kan, Abe Takuya	4. 巻 13
2. 論文標題 Application of neural network-based image analysis to detect sister chromatid cohesion defects	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2133-2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28742-6	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 Li, J., A. Beiser, N. B. Dey, S. Takeda, L. K. Saha, K. Hirota, L. L. Parker, M. Carter, M. I. Arrieta, and R. W. Sobol	4. 巻 4
2. 論文標題 A high-throughput 384-well CometChip platform reveals a role for 3-methyladenine in the cellular response to etoposide-induced DNA damage.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NAR Genom Bioinform	6. 最初と最後の頁 qac065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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

1. 著者名 Nakano Toshiaki, Moriwaki Takahito, Tsuda Masataka, Miyakawa Misa, Hanaichi Yuto, Sasanuma Hiroyuki, Hirota Kouji, Kawanishi Masanobu, Ide Hiroshi, Tano Keizo, Bessho Tadayoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 SPRTN and TDP1/TDP2 Independently Suppress 5-Aza-2 -deoxycytidine-Induced Genomic Instability in Human TK6 Cell Line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 2059-2067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00213	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 該当する

1. 著者名 Ooka Masato, Yang Shu, Zhang Li, Kojima Kota, Huang Ruili, Hirota Kouji, Takeda Shunichi, Xia Menghang	4. 巻 4
2. 論文標題 Lestaurtinib induces DNA damage that is related to estrogen receptor activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 100102-100104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crttox.2022.100102	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10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 阿部 拓也、鈴木 雄也、池谷 鉄兵、廣田 耕志
2. 発表標題 トリソミー染色体を標的とした染色体編集
3. 学会等名 分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mao Ebisawa, Kouji Hirota
2. 発表標題 Generation of Y chromosome loss cells using HSV-TK-HIS marker genes
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Taniguchi, Kouji Hirota
2. 発表標題 The role of proofreading exonuclease activity of polymerase
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayato Saeki, Kouji Hirota
2. 発表標題 DNA replication repriming by PrimPol resumes the oncogenic K-Ras induced replication arrest
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Ishida, Kouji Hirota
2. 発表標題 The assay to evaluate the frequency of aneuploidy
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minato Watanabe, Kouji Hirota
2. 発表標題 Effect of polymerase overexpression on UV sensitivity
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yusuke Tsuruta, Kouji Hirota
2. 発表標題 Relationship between metabolic-stress-induced long noncoding RNA and meiotic recombination
3. 学会等名 バイオコンファレンス2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田耕志
2. 発表標題 複製ポリメラーゼの校正活性は断裂した鋳型における安全なフォーク停止に寄与する
3. 学会等名 分子生物学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣田耕志
2. 発表標題 複製ポリメラーゼ の校正活性は断裂した鋳型における安全なフォーク停止に寄与する
3. 学会等名 日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川澄遼太郎 廣田耕志
2. 発表標題 複製とコヒージョン形成の連動によるゲノム安定性の維持
3. 学会等名 分子生物学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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		
米国	ボストン大学		