

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19241

研究課題名(和文)ポリコム複合体によるノンコーディングRNAの標的クロマチンへの繫留機構の解明

研究課題名(英文)Role of Polycomb in tethering ncRNAs to chromatin.

研究代表者

増井 修 (Masui, Osamu)

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・研究員

研究者番号：30579305

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)：RNA-DNA結合を網羅的に同定するRADICL-seqを用いて解析を行ったところ、PRC1欠損細胞では50%のXist RNAがXから常染色体に移行することが明らかになった。この時同様の挙動を示すnon-coding RNAを複数同定した。Xist RNAを生細胞で可視化できる細胞において、Time-lapse解析(1 min x5)を行なったところ、PRC1欠損下で細胞核内に分散したXist RNAは殆ど動かないことが分かった。これらの結果から、Xist RNAはPRC1により不活性Xに結合し、PRC1が存在しない場合はX染色体への特異性を失うが、クロマチンに留まる能力を持つと結論された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Xist RNAなどのnon-coding RNAは、標的遺伝子の転写を調節して生物個体の恒常性の維持に関わり、その破綻は疾患の原因となることが知られている。従ってnon-coding RNAの作用するメカニズムを解明することは、遺伝子転写調節機構を明らかにするだけでなく、疾患の予防や治療方法の分子基盤をもたらずと期待できる。本研究では転写抑制に関わるポリコム複合体PRC1がXist RNAなどのnon-coding RNAをクロマチンに繫留することを明らかにした。今後さらに解析を進めて、その詳細な分子メカニズムの解明を行うことを目指す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first performed RADICL-seq analysis, which can identify RNA-DNA interactions in a genome-wide manner, and revealed that 50% of Xist RNA changed its binding from X chromosome to autosomes upon PRC1 deletion. This result is consistent with our previous results based on RNA FISH experiments, in which ~50% of cells showed a dispersed distribution of Xist RNA in the nucleus upon PRC1 deletion. In RADICL-seq results, we also identified several other non-coding RNA candidates that had similar behavior to Xist, i.e. losing their chromatin binding upon PRC1 deletion.

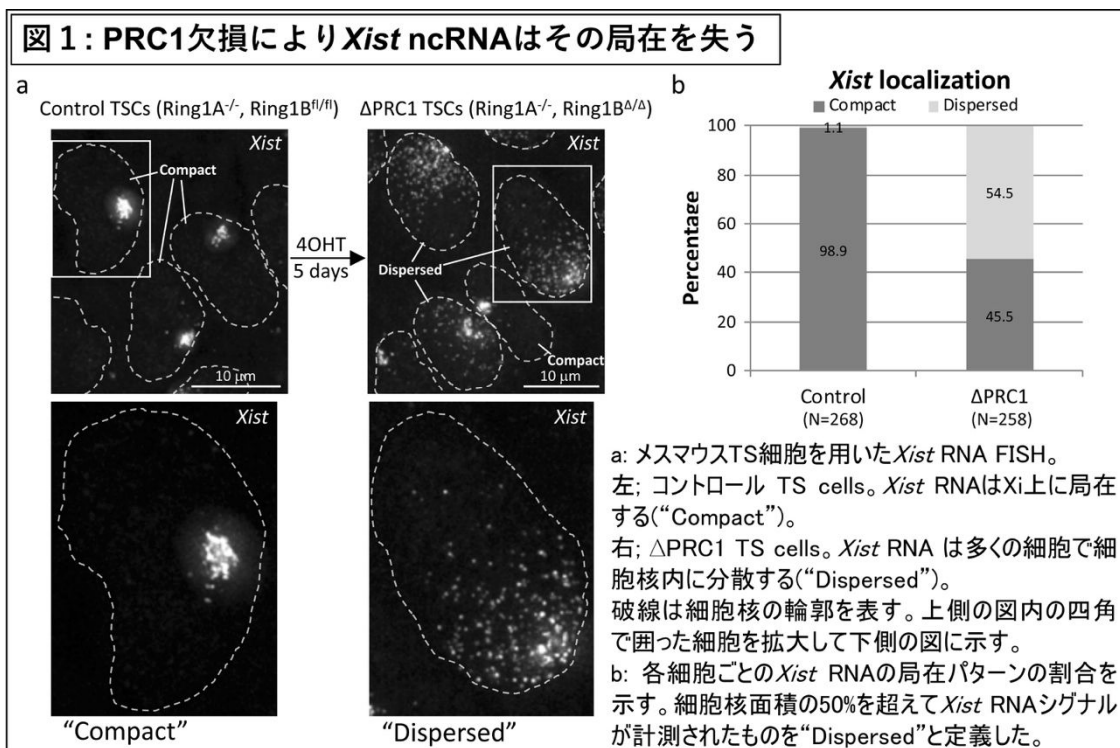
By using live-cell imaging analysis of Xist RNA with 1 minute interval, we found that Xist RNA does not make any major movement in PRC1-deleted cells in this time-window, suggesting that Xist RNA has intrinsic ability to bind to chromatin and/or nuclear matrix and does not freely move around in the nucleus even in the absence of PRC1-dependent tethering to the inactive X chromosome.

研究分野：分子生物学

キーワード：Xist RNA エピジェネティクス 遺伝子転写制御 Non-coding RNA RADICL-seq Live-cell imaging

1. 研究開始当初の背景

X染色体不活性化は哺乳類のメスの細胞において2本のX染色体の1本を転写不活性化し、雌雄間でのX染色体からの遺伝子転写量を均等化する。X染色体不活性化の開始にはXist non-coding RNAが必須であり、Xist RNAは転写抑制に寄与する様々なエピジェネティクス修飾、DNAメチル化やヒストン化学修飾、をX染色体上に誘導して染色体全体からの転写を遮断すると考えられている。それらのヒストン化学修飾の中にはH2AK119ub1とH3K27me3が含まれており、それぞれポリコーム複合体PRC1とPRC2により誘導される。このことからPRC1とPRC2はX染色体不活性化において遺伝子の転写不活性化を実行する機能分子の1つであると考えられているがその詳細は明らかになっていない。我々はX染色体不活性化におけるポリコーム複合体の役割を明らかにするために、ERT2Creシステムを用いて4OHT添加によりPRC1を条件的に欠失できるように設計した(Ring1A^{-/-}, Ring1B^{fl/fl}, ERT2Cre/+)メスのマウスTS細胞(Trophoblast stem cells; TSCs)を樹立してこれまでに解析を行っている。Ring1A/B遺伝子はPRC1の触媒サブユニットをコードする遺伝子で、これらが欠失することでPRC1の欠失を誘導できる。解析の結果、PRC1を欠失させたTS細胞では不活性X染色体上の遺伝子の一部が転写脱抑制するだけでなく、本来は不活性X染色体上に局在するXist RNAが細胞核質内全体に分散することが約半数の細胞で観察された。このことはポリコーム複合体PRC1がX染色体不活性化において転写不活性化を実行するだけでなく、Xist RNAを不活性X染色体上に繫留する役割を持つことが考えられた(図1)。



2. 研究の目的

上述のように、ポリコーム複合体PRC1がXist RNAの不活性X染色体上への繫留に必要であることが示唆されており、これに関して本研究では次の3項目を目的として実験を行った。

- (1) PRC1はXist以外のnon-coding RNAsにも結合することが知られており、それらのRNA分子もまたPRC1に依存してその細胞核内での局在、特にクロマチンへの結合が規定されることが考えられた。この点を明らかにするために、本研究では細胞核内のRNAとDNAの結合を網羅的に同定し、PRC1の有無によりクロマチン(DNA)への結合が変化するnon-coding RNAの探索を行った。
- (2) PRC1を欠失させた細胞ではXist RNAが細胞核質内へ拡散することは分かっていたが、この時にXist RNAは細胞核質内に浮遊して自由に移動しているのか、それともX染色体への親和性を失ってはいるが常染色体のクロマチンに安定に結合した状態を保っているのかは不明であった。我々はXist RNAの生細胞イメージングを行うことでこの疑問に答えられると考え、以前に我々が開発したXist RNA可視化システムとPRC1の条件的欠失システムを組み合わせ、PRC1を条件的に欠失できるXist RNA可視化TS細胞を作製し生細胞イメージングによる解析を試みた。
- (3) PRC1を欠失させた細胞では約半数の細胞でXist RNAの細胞核質内への拡散が観察されるが、残りの細胞ではXist RNAは正常に不活性X染色体上に局在する。このことからPRC1欠損に

より誘導される Xist RNA の拡散は細胞周期に依存して制御される可能性が考えられた。Xist RNA は分裂期に一過性に不活性 X 染色体から解離して細胞核質内に拡散することが観察されており、PRC1 欠失時にはこの現象の持続時間が延長されて、Xist RNA はより長い時間、細胞周期の半分程度の間、細胞核質内に拡散する可能性が考えられた。我々はこの可能性を検証するために(2)で述べた Xist RNA 可視化システムに細胞周期可視化システムを組み合わせた実験系の構築を試みた。また、これまでに用いていた ERT2Cre による PRC1 の条件的欠失システムでは、40HT 添加による PRC1 の欠失に数日間を要するため、PRC1 欠失直後の状態で細胞を観察するのが困難であった。この問題を解決するためにデグロンシステムを用いた PRC1 の条件的欠失細胞の作製を試みた。

3. 研究の方法

「2. 研究の目的」に記載した各項目を検証するために、以下の実験を行った。

(1) PRC1 に依存してクロマチンに結合する non-coding RNA を同定するために、RNA-DNA の結合をゲノムワイドに解析できる RADICL-seq(Ref1)を実施した。40HT 添加により PRC1 を条件的に欠失できるメスのマウス TS 細胞 (図 1) を用いて PRC1 を持つ条件と欠失した条件で RADICL-seq を行い、2 つのサンプル間で差が生じた RNA-DNA 結合の解析を行った。

(2) Xist RNA を GFP シグナルとして可視化するために、我々が以前に開発した Bgl アプタマーシステム(Ref2)を用いた。すでに作製済みであった Xist 可視化マウスに PRC1 を条件的に欠失できる遺伝子改変(Ring1A^{-/-}, Ring1B^{fl/fl}, ERT2Cre/+)を加え、作製されたマウスからメスの TS 細胞を樹立した。この細胞を用いて PRC1 有り無しの条件で Xist RNA の GFP 蛍光シグナルに対する生細胞イメージングを行った。

(3) PRC1 欠失下での Xist RNA の拡散と細胞周期の関わりを調べるために、細胞周期を生細胞で可視化できる Centrin-GFP のシステムを用いることとした。Centrin は centrosome を構成するタンパク質でありその形態が細胞周期によって変化することから細胞周期の各フェーズを見分けることが可能となる。また、ERT2Cre による PRC1 の欠失誘導は 40HT の培地への添加から PRC1 の欠失までに数日を要するため、PRC1 が欠失した直後の状態を解析することが困難である。そこで我々はデグロンシステムにより数時間程度の間 PRC1 の欠失を誘導できる細胞系(PRC1 デグロン)の構築を行い、Centrin-GFP、Xist RNA 可視化システム、PRC1 デグロンの三者を組み合わせることで、PRC1 欠失時の細胞周期を通した Xist RNA の拡散の様子を捉えることができるだけでなく、細胞周期の各フェーズで PRC1 を迅速に欠失させた時の Xist RNA の挙動を観察できる実験系の構築を試みた。

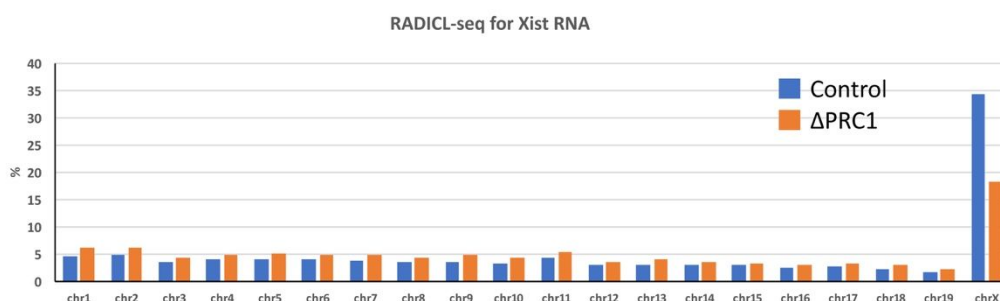
Ref1: RADICL-seq identifies general and cell type-specific principles of genome-wide RNA-chromatin interactions., Nature Commun., 2020 (doi: 10.1038/s41467-020-14337-6)

Ref2: Live-imaging of Xist RNA., Methods Mol Biol., 2018 (doi: 10.1007/978-1-4939-8766-5_6)

4. 研究成果

(1) TS 細胞を用いた RADICL-seq の結果から、PRC1 欠失時にクロマチン DNA への結合量が変化する non-coding RNA として Xist RNA を含む 11 種類を同定した。これらの中には Xist RNA も含まれ、コントロールである PRC1 を持つ細胞では Xist RNA は X 染色体の DNA 配列への強い結合を示したが、PRC1 を欠損した細胞 (Δ PRC1) では X 染色体への結合量はコントロールの半分程度に減少していた (図 2)。この結果は RNA FISH で得られた結果 (図 1) と一致すると考えられた。現在、再現性の確認と、ES 細胞(Embryonic stem cells; ESCs)などの他の細胞種を用いた RADICL-seq 解析を進めている。

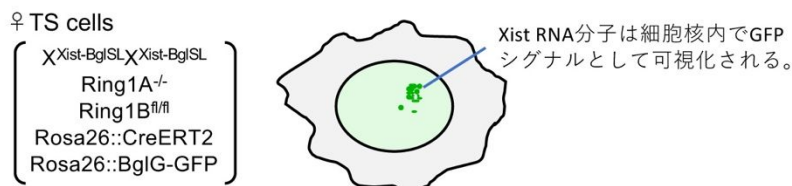
図 2: RADICL-seq: PRC1欠損によりXist ncRNAのX染色体への結合は減弱する



RADICL-seqにより同定された、Xist RNAと結合するDNA配列の染色体ごとの分布を示す。コントロール細胞(40HT非添加)に比べ、 Δ PRC1細胞(40HT、5日間添加)ではXist RNAのX染色体への結合量が半分程度減少する。その減少分は常染色体に均等に分配されることが観察された。

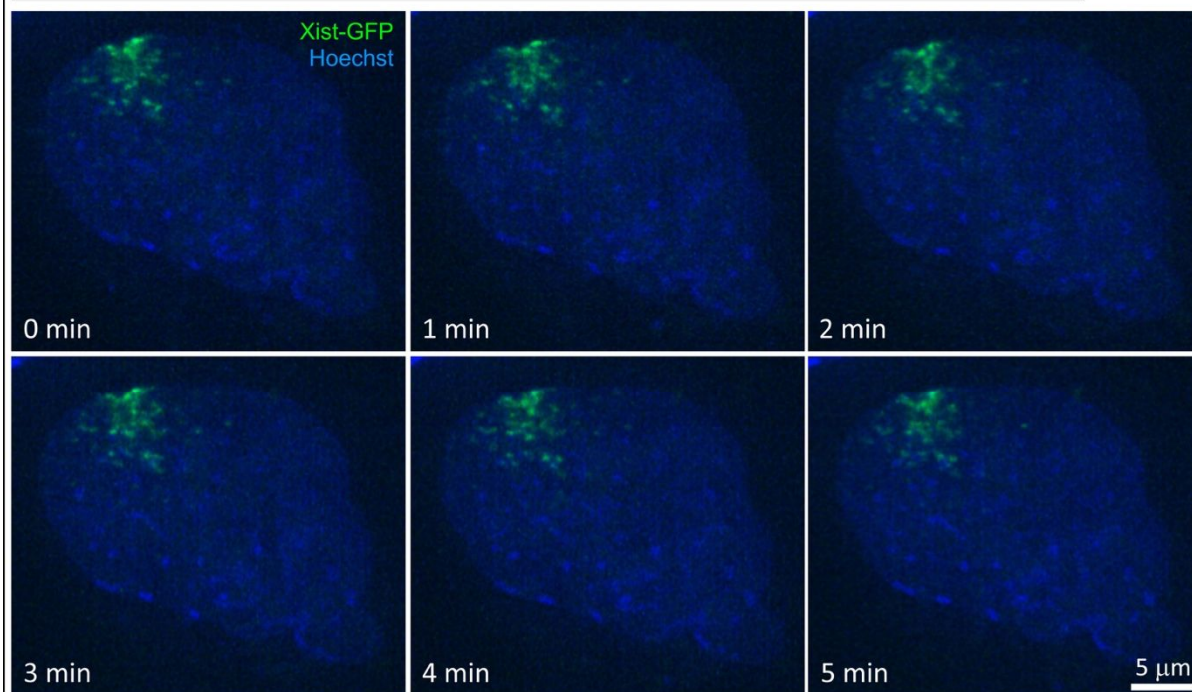
(2) Xist RNA 可視化マウスに PRC1 を条件的に欠損できる遺伝子改変を加え、そこからメスの TS 細胞の樹立を行った (図 3)。この細胞は Xist RNA の各分子を GFP シグナルとして発現しており、蛍光顕微鏡で解析することが可能となる。この細胞に 4OHT を添加して PRC1 の欠損を誘導し、1 分間隔のインターバルで生細胞イメージングを行った (図 4)。その結果、細胞核内に分散した Xist-GFP のシグナルは、1 分間隔、5 分間の撮影においては大きな移動を示さないことが明らかになった。このことから、Xist RNA は PRC1 欠失により細胞核内に分散はするが、細胞核内で自由運動を行いながら浮遊しているのではなく、分散した状態を保ちながらその場所に留まる状態であることが示唆された。RADICL-seq の結果は、PRC1 欠損時に Xist RNA は X 染色体への結合が減少し、代わりに常染色体への結合が増すことを示しており (図 2)、生細胞イメージングの結果と考え合わせると、PRC1 欠損時に細胞核質内に分散した Xist RNA は常染色体クロマチンに結合した状態で安定に保持されると考えられた。

図 3 : PRC1欠損時におけるXist ncRNA生細胞イメージング



Bgl stem loop (BglSL) 配列を Xist に、BglSL へ特異的に結合する BglG-GFP を Rosa26 にノックインすることで Xist RNA を GFP シグナルとして可視化した。さらに PRC1 を条件的に欠失できるように遺伝子改変を加えて、PRC1 欠失時の Xist RNA の生細胞イメージングを行った。

図 4 : Xist ncRNA は PRC1 欠損細胞において細胞核内に分散した状態でも安定した挙動を示す



4OHT 添加後 6 日目の TS 細胞を用いて、1 分間隔で生細胞イメージングを行った。1 分間隔の時間軸では Xist RNA 分子は大きな移動を示すことなく、同じ場所からほとんど移動しないことが明らかになった。

(3) PRC1 デグロンとして Ring1A 変異と Ring1B 遺伝子への dTag ノックインを持ち、さらに Xist RNA 可視化システムを組み合わせた遺伝子改変マウスの作製を進めており、2023年6月の時点で最終段階にある。今後、TS、ES などの細胞を樹立して、さらに Centrin-mCherry (GFP は Xist RNA 可視化に用いるので、ここでは mCherry を使用する) を発現させた細胞を作製し、各細胞周期での Xist RNA の局在と挙動を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Osamu Masui
2. 発表標題 Polycomb complexes PRC1 and PRC2 are each essential for maintenance of X inactivation in extra embryonic lineages
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osamu Masui
2. 発表標題 Polycomb complexes PRC1 and PRC2 are each essential for maintenance of X inactivation in extra embryonic lineages
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	加藤 雅紀 (Kato Masaki) (10625437)	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 (82401)	

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