

令和 4 年 3 月 31 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07293

研究課題名（和文）HUSH complexの転写抑制機能とRNA結合能の関連の解明

研究課題名（英文）Investigation into physical and functional interaction between HUSH complex and RNA

研究代表者

浜田 京子（Hamada, Kyoko）

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・特別協力研究員

研究者番号：90450410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年の研究でRNA結合が様々なクロマチン因子の局在や機能を制御することがわかってきた。本研究では、HUSH complexと呼ばれる新規の転写抑制複合体の構成因子の一つであるMPP8とRNAの物理的・機能的相互作用について検証した。その結果、MPP8がRNA結合能を有し、細胞内では一部のZNF遺伝子座からの転写産物に結合することがわかった。また、MPP8-ZNF RNA間の相互作用とZNF RNAの核内滞留に比較的強い相関があることから、MPP8もしくはHUSH complexが一部のZNF遺伝子の転写後制御に関与していることが示唆された。よって、MPP8の新規機能の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、一部の標的遺伝子に対するMPP8もしくはHUSH complexの転写後遺伝子発現制御機能という新規機能を示唆することができた。よって、エピジェネティクス関連分野において新たな知見を生み出すことができた。また、MPP8やHUSH complexはがんや神経変性疾患、感染症との関連が示されていることから、これらの因子の新たな機能が明らかになる事で上記疾患に対する創薬シード探索や創薬研究に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Recent studies suggest that RNA-binding regulates localization and functions of various chromatin proteins. Here we investigated physical and functional interaction of RNA and MPP8, which is a component of the transcriptional repressor complex called HUSH complex. We found that MPP8 possesses the RNA-binding activity and it interacts with transcripts from a subset of ZNF genes. Furthermore, there was a relatively strong correlation between MPP8-ZNF transcript interaction and nuclear retention of the transcripts. These results indicate that MPP8 or HUSH complex may post-transcriptionally regulate a subset of ZNF genes, implying a novel function of MPP8.

研究分野：エピジェネティクス

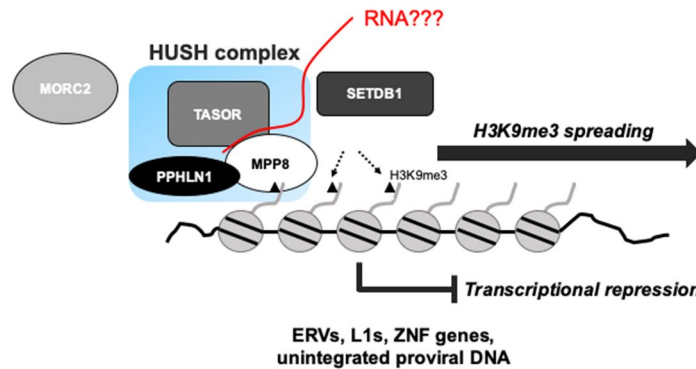
キーワード：クロマチン RNA 遺伝子発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムはクロマチンと呼ばれる DNA、タンパク質と RNA の複合体として細胞核内に収納されている。クロマチンが様々な高次構造に折りたたまれることによって、転写因子のアクセスを制御できることから、クロマチン構造と転写制御は密接な関係にあることが知られている。特にヘテロクロマチンと呼ばれる非常に凝集したクロマチン構造の形成・維持はゲノムの安定性や転写抑制に重要である。ヘテロクロマチンはヒストン H3K9 や DNA のメチル化などのクロマチン修飾が豊富な領域で、これらの修飾を特異的に認識するタンパク質が結合して転写抑制やクロマチン凝集などの効果を引き起こすことが分かっている。

Human Silencing Hub (HUSH) complex は数年前に発見された新規の転写抑制複合体で、主に TASOR, MPHOSPH8 (MPP8) と Periphilin (PPHLN) で構成されている。HUSH complex は SETDB1 や MORC2 などのクロマチン修飾因子やリモデリング因子と共に作用し、主に LINE-1 等のレトロトランスポゾンや Zinc Finger Protein をコードする遺伝子座 (ZNF 遺伝子群) のメチル化ヒストン H3K9 (H3K9me) レベルの維持と転写抑制に寄与することが知られている (図 1)。また、MPP8 は N 末端のクロモドメインを介して H3K9me を特異的に認識しクロマチンに結合することがわかっており、HUSH complex の標的遺伝子座へのターゲティングに必須とされている。しかし、HUSH complex や MPP8 による転写抑制の分子機構は未知な部分が多い。



Tchasovnikarova et al. (2015); Tchasovnikarova et al. (2017); Liu et al. (2018); Zhu et al. (2018)

図 1. HUSH complex の構成因子と既存の転写抑制機構 但し、RNA の関与は未知である。

非常に興味深い事に報告者が過去に行った RNA 結合クロマチン因子の網羅的な解析や既知の RNA 結合因子のプロテオミクス解析から全ての HUSH complex 構成因子が RNA 結合能を有する事が示唆された(データ未発表)。近年の研究から、RNA 結合によって様々なクロマチン因子の局在、機能、またはタンパク質の安定性が制御される事がわかってきた。よって、RNA が HUSH complex やその構成因子の機能調節に深く関与している事を期待して本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では HUSH complex の構成因子の一つである MPP8 に着目し、MPP8 と RNA の物理的および機能的相互作用について解析を行い、RNA 結合が MPP8 もしくは HUSH complex のクロマチン結合や転写抑制機能にどのように、どのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)まず、in vitro 試験で MPP8 自身が RNA 結合能を有するの否かを確かめるために、大腸菌や Sf9 昆虫細胞を用いてリコンビナントタンパク質を作製し、アフィニティークロマトグラフィー法で精製した。また、in vitro transcription の系を使用してヒト β -satellite 配列や β -actin の配列を含む RNA プローブを準備した。これらの材料を用いて electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を実施し、in vitro で MPP8 の RNA 結合能を確認した。

(2)また、細胞内での MPP8 の RNA 結合を確認するために MPP8 に対する抗体等を用いて RNA immunoprecipitation (RIP) とクロマチンへの局在を確認するために Chromatin immunoprecipitation (ChIP) を行った。その後、標的遺伝子座に対するプライマーを使用して RT-qPCR もしくは qPCR を行い、MPP8 と目的 RNA または DNA との相互作用を解析した。加えて、転写と MPP8 の RNA 結合もしくは局在の関連性を検証するために、転写伸長の阻害剤として認知されている 5,6-ジクロロベンゾイミダゾール-1- β -D-リボフラノシド (DRB) を用いて、転写伸長を阻害した細胞とコントロールの細胞を用いて RIP 実験を行った。尚、本研究では細胞を用いた実験には、文献で HUSH complex の解析における使用実績がある K562 細胞を使用した。

(3)これらに加え、MPP8 の RNA 結合と核内滞留の関係を検証するために、K562 細胞を細胞質と核に分画し RNA を抽出した。その後、目的転写物に対するプライマーを用いて RT-qPCR を行い細胞質と核内の目的 RNA の量の相対定量を行なった。

(4)また、MPP8 および HUSH complex の機能をより深く理解するために、MPP8 と別の HUSH complex 構成因子である TASOR に結合する因子を同定することを試みた。手順としては、MPP8 または TASOR

に対する抗体を用いて共免疫沈降を行い、PAGE で共免疫沈降されたタンパク質を分離後、ゲルからタンパク質を抽出して質量解析を行い、MPP8 もしくは TASOR と共免疫沈降されたタンパク質を同定した。質量解析で新規 MPP8/TASOR 結合因子として同定されたタンパク質の一部に対しては、ウエスタンブロットを実施し、質量解析結果の再現性と正確性を検証した。

(5)更に、新規 MPP8/TASOR 結合因子 (2 種) と HUSH complex との機能的相互作用を検証する為に siRNA を使用してこれらの因子をノックダウンした細胞から抽出した RNA を用いて RT-qPCR を行い、MPP8/HUSH complex の標的遺伝子の発現に変化があるか、調べた。

4. 研究成果

(1)EMSA の結果から、少なくとも *in vitro* で全長及び N 末端部位のみ (1-300) を含む MPP8 が RNA に結合することを確認できた (図 2)。また、N 末端のリジンを多く含む部位 (K-rich region) のリジンをアラニンに置換すると (K A) RNA 結合能が低下したことから、この K-rich region が MPP8 の RNA もしくは核酸結合に寄与することが分かった。

(2)更に、RIP の結果から細胞内で MPP8 は一部の ZNF 遺伝子、特に ZNF594 からの転写産物と結合している事が分かった (図 3、A)。また、DRB で転写の伸長を阻害すると、ZNF594 遺伝子座における MPP8 の局在が 50%程度減少したことから (図 3、B)、当該遺伝子座への MPP8 の局在は on going で伸長されている転写産物が関与していることが示唆された。

(3)興味深い事に、MPP8 と ZNF 遺伝子からの転写産物間の結合とこれらの転写産物の核内滞留に比較的強い相関がある事がわかった (図 4、A)。加えて、MPP8 を siRNA でノックダウンすると、核内滞留する ZNF 遺伝子の転写産物量が低下する事が示された (図 4、B)。この現象は、MPP8 との結合能が高い転写産物でより顕著に見られた。一方、MPP8 と標的遺伝子の転写産物間の結合と H3K9me レベルの相関は確認できなかった (データ未公開)。よって、これらの結果から、MPP8 が ZNF RNA の核内滞留に寄与していることや、クロマチンを介さず、核内滞留という新規メカニズムを介して遺伝子発現制御に関与している可能性が推測された。

(4)MPP8 または TASOR に対する抗体を用いて、これらの因子と結合するタンパク質を共免疫沈降し、質量解析によって同定したところ、MPP8 及び TASOR が転写抑制因子のみならず、多種多様な RNA 結合因子と結合していることが明らかになった。一部の同定されたタンパク質について、質量解析の結果をウエスタンブロットで検証したところ、核内エクソソームの構成因子である SKIV2L2 やスプライシング因子である RPRF8 と MPP8 や TASOR との相互作用が確認できた (図 5)。

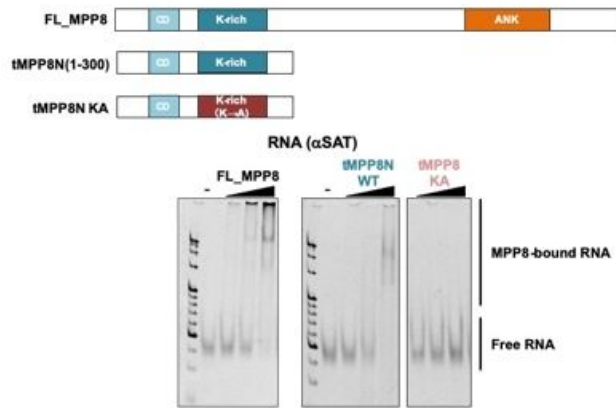


図 2. リコンビナント MPP8 を用いた *in vitro* binding assay (EMSA) の結果

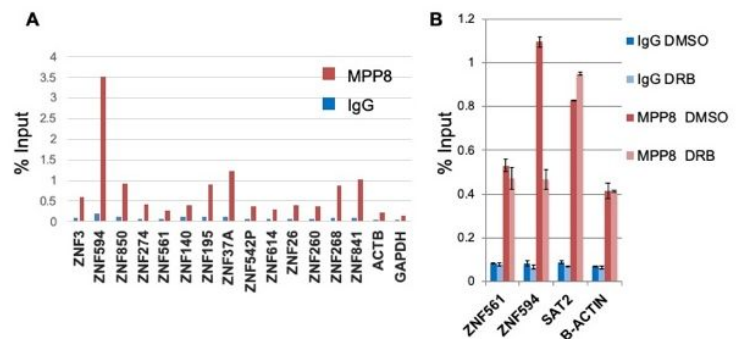


図 3. A) RNA 免疫沈降を用いた細胞内における MPP8 の ZNF RNA に対する結合能の検証結果、B) 転写伸長阻害時の MPP8 の ZNF 遺伝子座への局在の検証結果

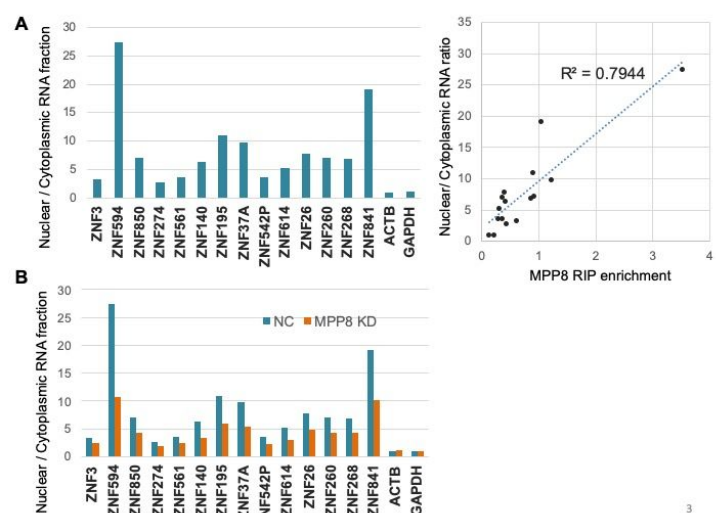


図 4. A) ZNF RNA の核内滞留率の解析結果 (左) と MPP8 結合 (RIP シグナル) との相関関係の検証結果 (右)、B) MPP8 ノックアウト時の ZNF RNA の核内滞留率の解析結果

SKIV2L2 やスプライシング因子である RPRF8 と MPP8 や TASOR との相互作用が確認できた (図 5)。

(5)また、新規 MPP8 結合因子として同定された SKIV2L2 を siRNA を用いたノックダウンによって欠乏させると MPP8/HUSH complex の標的遺伝子である ZNF594 の脱抑制が見られた(図 5)。この結果と上記 4) の結果を踏まえ、MPP8 と SKIV2L2 が協調して ZNF 遺伝子の発現制御に寄与していることが示唆された。尚、PRPF8 については、knock によって強い細胞毒性が示したため、明確な結果は得られなかった。

上記(1)~(5)の結果から、MPP8 もしくは HUSH complex は一部の ZNF 遺伝子からの転写産物に結合し、核内滞留や核内エクソソームによる分解などを促進することで、これらの転写産物の転写後調節に寄与している事が考えられる。MPP8 もしくは HUSH complex がどのように一部の ZNF RNA に選択的に結合し、核内滞留やエクソソームによる分解を制御しているのかを解明するためには、更なる研究が必要であるが、本研究によって、新たな MPP8/HUSH complex による転写抑制の分子機構が示唆することが出来たと考える。

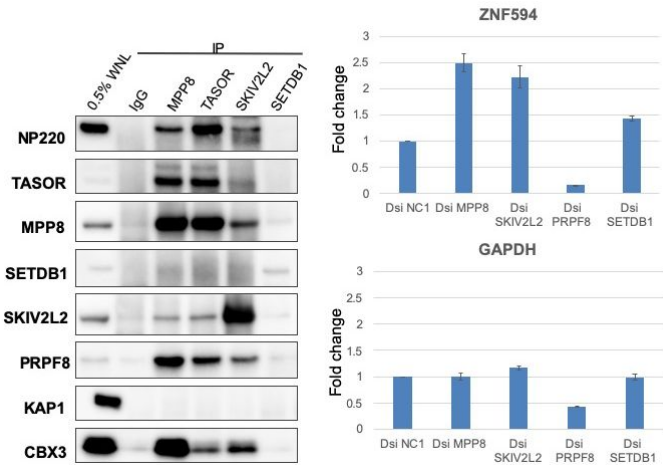


図5. ウェスタンブロットによる新規 MPP8 結合因子と HUSH complex 構成因子の相互作用の検証結果(左)と RT-qPCR による MPP8 もしくは MPP8 結合因子ノックアウト時の ZNF 遺伝子およびコントロール遺伝子 GAPDH) の脱抑制状態の解析結果(右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishibuchi Gohei, Machida Shinichi, Nakagawa Reiko, Yoshimura Yuriko, Hiragami-Hamada Kyoko, Abe Yusuke, Kurumizaka Hitoshi, Tagami Hideaki, Nakayama Jun-ichi	4. 巻 165
2. 論文標題 Mitotic phosphorylation of HP1 regulates its cell cycle-dependent chromatin binding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 433 ~ 446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy117	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 Hiragami-Hamada Kyoko, Tani Naoki, Nakayama Jun-ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Proteomic analysis of RNA-dependent chromatin association of nuclear proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioRxiv	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） 10.1101/391755	査読の有無 無
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 Hiragami-Hamada Kyoko, Nakayama Jun-ichi	4. 巻 165
2. 論文標題 Do the charges matter?-balancing the charges of the chromodomain proteins on the nucleosome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 455-458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz004	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0件

〔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
---------	---------