

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18580

研究課題名(和文) 一分子解析とオミックス解析の統合による核小体静的クロマチン構造の解明

研究課題名(英文) Dissection of nucleolar silent chromatin structure by proteomics and single-molecule imaging

研究代表者

井手 聖 (IDE, Satoru)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号：50534567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核小体の形態異常は、遺伝病(リボソーム病)を引き起こす要因となることが知られている。本研究では、核小体クロマチン内に新たに同定した因子が局在する凝集構造体に着目し、そこに含まれる因子群を一分子顕微鏡で観察した。その結果、RNAポリメラーゼIがブラウン運動しながらも、ある一定の範囲でまとまる様子が観察されたことから、凝集構造体は液滴様の塊であることが判明した。さらに、リボソーム病の原因であるRNAポリメラーゼの変異アレルを異所的に発現させることで、液滴様凝集構造体を再構築することができた。このことから、本研究で着目した凝集構造体の液滴様性質が、遺伝疾患の一因になっている可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The RNA polymerase I (Pol I) transcription machinery in the nucleoli is an integral component for ribosome biogenesis, the defect of which is related to human genetic disorders called ribosomopathies. While the structural integrity and mapping of the molecules have previously been revealed, it remains unclear about the dynamics of the molecules reflecting the physical property in vivo. We establish the single-molecule imaging system of Pol I in living cells. Our particle tracking analysis find that the transcription machineries embed in the transcription factories are immobile for efficient transcription. After inducing a new nucleolar silencer, TopBP1, Pol Is are released from the factories, and moves more rapidly by Brownian motion around nucleolar periphery. We propose that the defect of immobility of Pol I anchored to the transcription factory induces the droplet-like self-assembly of Pol I, thereby causing the perturbation of ribosome biogenesis in the human genetic disorder.

研究分野：分子生物学

キーワード：核小体 サイレンシング RNAポリメラーゼ 一分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

核小体内のリボソーム RNA 遺伝子 (rRNA) のクロマチン構造は、二種類あると考えられている。一つ目は転写が活性化されているオープンクロマチンで、二つ目は転写が抑制されているサイレントなクロマチンである。既知の転写抑制は、DNA のシトシンのメチル化によるものが知られている。本研究では、核小体クロマチンのプロテオミクス法によって同定したプロモーター結合因子の一つ TopBP1 に着目したところ、集団中の2割程度の細胞で、TopBP1 が核小体内でフォーサイを形成し、オープンクロマチンの一部が凝集した、大きな構造体が観察された。そこでは転写が停止しており、核小体内のオープンクロマチンが、全て転写されているというこれまでの理解とは異なっていた。本研究で着目しているサイレントなオープンクロマチンは、DNA のメチル化もなく、通常のスクレオソーム構造をとらない、新たな**第三のクロマチン**であることが推定されていた。

2. 研究の目的

(1) 静的クロマチンの凝集構造体の実態の解明と再構成

細胞集団中の一部にのみ観察された核小体内の凝集構造体の実態を明らかにする。具体的には、①凝集構造体を構成する因子の網羅的同定、②凝集構造体の物理的性質、③凝集構造体の再構築を目指した。

(2) 凝集構造体が関与する高次生命現象の探索

本研究で着目した凝集構造体がどのような高次の生命現象に関わるのかを明らかにすることを目的とした。特に転写が抑制されるという性質に着目し、以下に示す二点について検証した。

- ①ヒト細胞のプロジェリア様老化現象との関係
- ②ヒト遺伝病、トリーチャーコリンズ症候群との関係 (研究目的(1)の③と密接に関与)

3. 研究の方法

(1) サイレントなオープンクロマチンの人為的な誘導系の確立

凝集構造体の実態を調べるためには、細胞内にまれに出現する凝集構造体を人為的に召喚し、その出現頻度を上昇させる必要がある。そこで各解析に応じた細胞株において TopBP1 のテトラサイクリン誘導発現系の作製を試みた。

①凝集構造体の構成因子を同定するために代表者自身が留学先で確立した核小体クロマチンのプロテオミクスを用いる。その凝集構造体の誘導前後での核小体クロマチンの構成因子を比較するために、の核小体クロマチン精製の細胞株、MEL(マウス赤白血病)細胞において、TopBP1 の発現誘導系をレンチウイルスベクターを用いて導入した。

②凝集構造体内の物理的性質を知る為に、核小体内分子の動きを一分子顕微鏡で観察する系を確立する。ゲノムにコードされた RNA ポリメラーゼや核小体クロマチンタンパク UBF にゲノム編集技術を用いて、一分子イメージング用のタグ HaloTag を融合する。さらに、それら一分子観察用の付着細胞に TopBP1 の発現誘導系を同じくゲノム編集技術を用いて、ゲノム内の「安全な」領域である *AAVS1* 遺伝子を標的として導入した。

③凝集構造体の構成成分やその分子の振る舞いからキーファクターを推定し、それを発現誘導することで再構築する。具体的には、下記の(2)②に示す方法と同じで、変異型 RNA ポリメラーゼ I の条件的に発現させた。

(2) 凝集構造体の一つのマーカーである TopBP1 の核小体への局在やその出現頻度を①ヒトプロジェリア様の老化細胞や②ヒト遺伝病、トリーチャーコリンズ症候群の疾患変異を挿入した細胞で免疫染色法を用いて調べる。

①ヒトのプロジェリア様の老化は、千葉大学松浦教授の協力のもと、スプライシング欠損のラミン A を任意に誘導することができる細胞株を用いて、調べた。

②トリーチャーコリンズ症候群の患者で検出された変異、すなわち RNA ポリメラーゼの活性部位近傍の変異を挿入した遺伝子アレルを任意に誘導することができる細胞株を用いて、調べた。

4. 研究成果

(1) ①核小体クロマチン精製の細胞株 MEL 細胞に GFP-TopBP1 のテトラサイクリン誘導発現系の導入を試みたが、薬剤耐性のコロニーは生えてくるものの、どのクローンにおいても TopBP1 誘導条件においても GFP のシグナルが検出されるものは皆無であった。そのため、凝集構造体の構成因子の網羅的同定は断念した。

②ゲノム編集技術を用いて、核小体内の分子 (RNA ポリメラーゼ I、UBF、転写開始因子等) に HaloTag タグを融合し、安定に発現する細胞を作製することに成功した。この細胞株を一分子顕微鏡によって観察することにより、各タンパク質の一分子レベルの動きを追跡できるようになった。この一分子イメージング用の細胞株に、ゲノム編集技術を用いて TopBP1 を一過的に強制発現させ、人為的に凝集構造体を誘導する系を作製した。凝集構造体内の分子の動きを一分子レベルで観察したところ、転写している領域に比べて、分子の動きが大きく上がっていた (図 1)。

次に転写ファクトリーの存在の有無を検討するために、転写装置の密集具合を測定したところ、凝集構造体内では RNA ポリメラーゼが疎 (バラバラ) になっていた。このことから、凝集構造体内

では転写ファクターという留め金がなくなった結果、RNAポリメラーゼやクロマチンがより大きなブラウン運動をしていると考えられた。

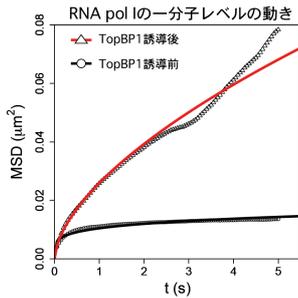
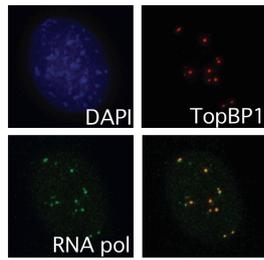


図1 TopBP1の発現誘導時、共局在するRNAポリメラーゼI(上図)とRNAポリメラーゼIの分子の動き(下図、X軸:秒、Y軸:動いた距離(MSD:平気二乗変位))。

③次に、RNAポリメラーゼIのサブユニットの一つに変異を挿入し、強制発現させたところ、核小体の淵に転写装置が集まった塊、TopBP1の強制発現によってできる凝集構造体と同じ類のものが観察された(図2)。実際、この塊の中では、転写が起こっておらず、rRNA遺伝子やTopBP1が集まり、分子が激しく動き回っていた。

(2)①スプライシングに異常がおきたラミンAを強制発現することで、ヒト細胞においてプロジェリア様老化を誘導できる細胞株において、TopBP1の核小体への局在を調べた。結果、TopBP1の核小体への局在に有意な上昇は観

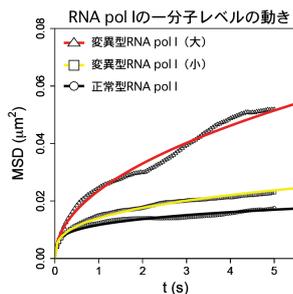
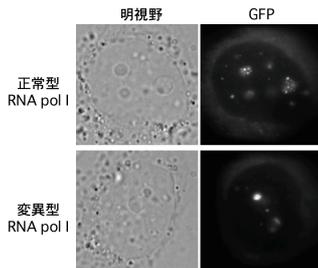


図2 正常型、または変異型RNAポリメラーゼIが発現した時のタンパクの局在(上図)とRNAポリメラーゼIの分子の動き(下図、X軸:秒、Y軸:動いた距離(MSD:平気二乗変位)、大:大きいフォーサイ、小:小さいフォーサイ)。

察されなかった。

②(1)③で転写装置のサブユニットに挿入した変異は、ヒト遺伝病の一つ下顎顔面異骨症(トリーチャー・コリンズ症候群の一種)の優性原因因子として知られているものであり、変異型RNAポリメラーゼIを発現させ、凝集構造体の再構築する試みの際、それが遺伝病患者由来の変異アレールであった。本研究で着目した凝集構造体は、ヒトの発生過程でrRNAの合成を阻害し、遺伝疾患の引き起こす一因になっている可能性が考えられる。

<まとめ>

本研究によって、TopBP1によってマークされた静的クロマチンの正体は、転写に従事していないRNAポリメラーゼIの塊に取り込まれたものであることがわかった。転写していないRNAポリメラーゼI分子は、絶えず動きながら自己集合しまとまる、所謂液滴を形成する性質を保有していた。そして、TopBP1は、RNAポリメラーゼIの液滴化のスイッチとして働く分子の一つであることが判明した(図3)。さらに、RNAポリメラーゼIの凝集構造体は、ヒト遺伝病、トリーチャー・コリンズ症候群の発症の一因となっていることが示唆された。トリーチャー・コリンズ症候群の中には、原因遺伝子がわかっていない症例も全体の10%ほどあり、TopBP1の発現量のバランスがその一因となっている可能性が考えられる。

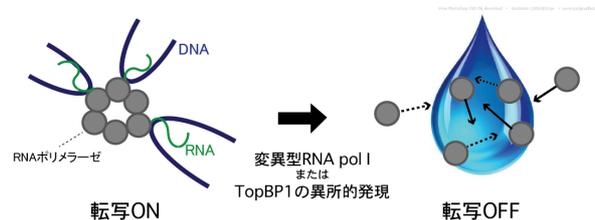


図3 転写が起こっている時に固い転写ファクターが形成される。一方、転写が止まると分子が絶えず動きながら自己集合しまとまる、所謂液滴を作る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計5件)

①井手聖、前島一博「分子の動態から見えてきた転写装置と鋳型DNAが織り成す形」転写研究会・冬の若手ワークショップ、2017年1月30日-2月1日、一宮シーサイドオーツカ

②井手聖、前島一博「核小体クロマチンの動態と形態」遺伝研研究会、2016年10月27日-28日、国立遺伝学研究所

③井手聖 「rRNA 遺伝子状での包括的 DNA-タンパク相互作用情報が照らし出す新たな転写制御」転写研究会・冬の若手ワークショップ、2016年2月4日-6日、山中湖ホテル清溪

④Satoru Ide & Jerome Dejardin, A method to dissect protein composition on regulatory DNA sequence and the future
第38回分子生物学会年会、2015年12月1日-4日、神戸ポートアイランド

⑤ Satoru Ide et al., Transcription regulation of mammalian ribosomal RNA gene revealed by proteomic analysis for local chromatin configuration. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function 23th-26th Aug 2015, 淡路夢舞台

[図書](計1件)

①井手聖他、羊土社、実験医学別冊「エピジェネティクススタンダード」2017、398(370-378)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井手 聖 (IDE, Satoru)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・助教

研究者番号:50534567