

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14638

研究課題名(和文) 転写・クロマチン制御に関与するnon-coding RNAの網羅的探索

研究課題名(英文) Screening of no-coding RNA that can control transcription and chromatin

研究代表者

村上 洋太 (Murakami, Yota)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20260622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母を用いて、転写を制御するnon-coding RNAのスクリーニングするために、RNA結合蛋白質MS2を利用してnon-coding RNAをレポーター遺伝子のプロモーターに呼び込むシステムの構築を試みた。しかし、MS2がそれ自身で転写活性を持つことが判明したため、この系の実用化を断念した。そこで、CRISPR-dCAS9を応用してRNAをクロマチン上にリクルートする系の構築を試みた。dCAS9とguide RNAの複合体を分裂酵母のゲノムの標的領域に結合させることには成功したが、その効率が低いためスクリーニングに用いるには至っていない。現在効率を高めるための条件設定を行っている。

研究成果の概要(英文)：To screen non-coding RNAs that have an ability to control transcription in fission yeast, we tried to construct a screening system using structure-specific RNA binding protein MS12 that enable tether non-coding RNAs to the promoter of reporter genes. However, we gave up to use MS12, because MS2 itself shows transcription stimulation activity. We next try to utilize CRISPR-dCAS9 to tether RNAs onto the promoter. We succeeded to recruit CRISPR-dCAS9 to the target region of fission yeast genome, but its efficiency is still low. We are trying to improve the efficiency.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：non-coding RNA 転写制御 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では多くの non-coding RNA(ncRNA)の転写がおこなわれているが、その機能の多くは不明である。一部の ncRNA では転写・クロマチン制御タンパク質と複合体を作り標的遺伝子の転写を制御することが示されている。例えば Polycomb 複合体は HOTAIR RNA と複合体を作り、標的遺伝子にヘテロクロマチンを形成することで転写を抑制する(1)。また、HOTTIP RNA は WRD5/MLL と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。HOTTIP RNA の解析の過程で図1に示す様な系を用いて、この ncRNA が転写活性可能をもつことが示された(2)。すなわち HOTTIP RNA を RNA 結合タンパク質 λN の認識配列である boxB 配列と融合させた形で発現し、この RNA を λN と DNA 結合蛋白質 GAL4 の融合タンパク質を用いて、レポーター遺伝子上流に結合させると、転写活性化が起きたのである。

私が研究対象としてきた分裂酵母は高等真核細胞と類似した転写・クロマチン制御機構をもつ。特にその RNAi に依存するヘテロクロマチン形成機構では、ヘテロクロマチン領域から転写される ncRNA がクロマチン上で RNAi 因子と複合体を形成しヘテロクロマチン形成を促す。この系の解析の過程で私は、Moazed たちが開発した、RNA 結合蛋白質とその認識配列を用いて、RNAi 因子を人為的に標的遺伝子に結合させ、ヘテロクロマチン形成を誘導する実験系を用いていた(3)(4)。

これらの背景のもと、上記 HOTTIP の結果から、このシステムを分裂酵母で応用することで、転写・クロマチン制御因子と複合体を作り機能する ncRNA をターゲットとするスクリーニングが可能になるとの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母をモデル生物として、レポーター遺伝子上流に人為的に ncRNA を結合させるシステムを構築し、転写・クロマチン制御に参与する ncRNA の網羅的スクリーニングをおこなう。スクリーニングに際しては、転写を正および負に制御する RNA をそれぞれ探索できるシステムの構築をおこなう。有望な ncRNA が同定できた場合、そのいくつかについて、どのようなタンパク質因子と複合体を作っているのか、標的遺伝子の同定など、詳細な機能解析をおこなう。

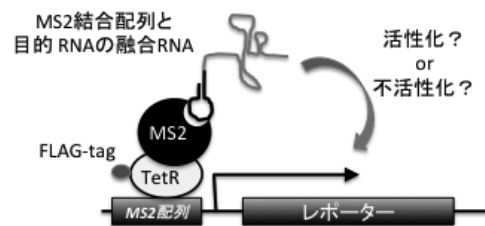
3. 研究の方法

図1に示すように、転写活性化あるいは不活性化をモニターできるレポーター遺伝子上流に配列特異的 DNA 結合蛋白質 TetR と RNA 結合蛋白質 MS2 の融合タンパク質を結合させ、目的 RNA に MS2 認識配列をもたせることで、その RNA をプロモーター領域に呼び込み、転写調節機能をレポーター遺伝子の発現によりモニターできる系を構築する。転写活性化

能をもつ RNA をスクリーニングするためのレポーターとして TetR が認識する *tetO* 配列 7 コピーと出芽酵母 *cyc1* の TATA 配列を G418 耐性遺伝子(*kanMX*)につないだものをゲノムに挿入した株を用いる。抑制をおこなう RNA のスクリーニングには CaMV プロモーター上流に *tetO* 配列 3 コピーを挿入したプロモーターで *ura4* および *can1* 遺伝子を発現する株を用いる。*ura4* の発現が抑制された場合は FOA、*can1* の発現が抑制された場合はカナバミンという薬剤に耐性を示すようになる。

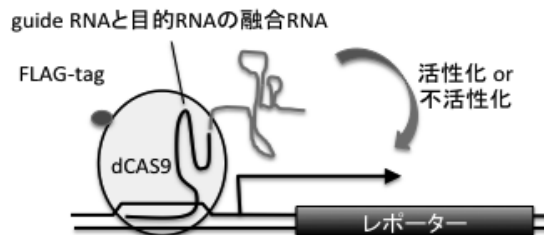
その後細胞から調整した RNA が MS2 結合 RNA を融合したものを発現ライブラリーを作成し、転写調節を持った RNA のスクリーニングをおこなう。

図1 本研究で提案するスクリーニングシステム



しかし、研究成果の項で述べるように、図1のシステムに問題が発生したため、図2に示すスクリーニング系の構築を目指した。この系では CRISPER-dCAS9 を用いる。nuclease 活性を点変異により失った CAS9 は guide RNA 配列な相補的な配列をもつ標的 DNA に安定に結合する。そこで、適当な guide RNA の配列を設定する事で dCAS9-guide RNA を図1と同様にレポーター遺伝子プロモーターに結合させることができる。guide RNA に目的 RNA を融合させることにより、RNA の転写制御能をモニターする系の構築を試みた。

図2 CRISPER-dCAS9のシステム



4. 研究成果

(1) TetR-MS2 融合タンパク質を用いたシステムの構築

転写制御型 ncRNA スクリーニングのためのレポーター系の構築をおこなった。すなわち、転写活性化に機能する ncRNA のスクリーニングのための *tetO* 配列 7 コピーと出芽酵母 *cyc1* の TATA 配列を G418 耐性遺伝子(*kanMX*)につないだものをゲノムに挿入した株を作成した。また、転写抑制に機能する ncRNA のスクリーニングのための CaMV プロモーター上流に *tetO* 配列 3 コピーを挿入したプロモ

ーターで *ura4* および *can1* 遺伝子を発現する株を作成した。さらに *tet0* 配列に結合する TetR タンパク質 (FLAG タグ付き) に既知の転写活性化ドメイン (VP16) および転写抑制ドメイン (Tup11) を融合したタンパク質の発現系を導入した。すると TetR-VP16 は *cyc1-kanMX* 遺伝子を活性化し G418 耐性を細胞に付与した。一方、TetR-Tup11 融合タンパク質の発現により CaMV-*ura4* あるいは CaMV-*can1* 遺伝子の発現が抑制され、それぞれ FOA 耐性、カナバミン耐性を示した。FOA 耐性の方がより顕著な耐性を示したため、CaMV-*ura4* を用いることとした。

次に RNA 結合蛋白 MS2 を融合した TetR-FLAG タンパク質を発現し、それぞれのプロモーターへの影響を調べたところ、この融合タンパク質は弱いながらも転写活性化能を示した。これはスクリーニングにおいて障害となることが予想されるため、これを回避する方法の開発が必要であると考えた。

(2) CRISPER-dCAS9 を用いたスクリーニング系の構築

DNA 結合ドメインとして TetR ではなく、CRISPER-dCAS9 により、RNA をレポーター上流に導入する系 (図 2) の構築を試みた。

この系では guide RNA の標的認識配列を変更することで簡単に dCAS9-guide RNA 複合体の標的を変更できる点で (1) の TetR-MS2 融合タンパク質を用いるシステムより自由度が高くなる。ただし一方で、以下のような考慮すべき点がある。

- ・ 分裂酵母での dCAS9 を使用する報告がない。
 - ・ 通常 guide RNA の発現には RNA ポリメラーゼ III で転写される U6 snRNA プロモーターを用いるが分裂酵母では U6 snRNA は RNA ポリメラーゼ II が転写するため使用できない。
 - ・ guide RNA に RNA を結合することで dCAS9 との複合体形成に影響を受ける可能性があり、この点の条件検討が必要。
- 以上をふまえて以下の解析をおこなった。

出芽酵母を用いた dCAS9 の解析

まず CRISPER-CAS9 が機能することがわかっている出芽酵母を使い、dCAS9 をゲノムの任意の場所に効率良くリクルートできることを確認した。標的としては CAN1 遺伝子を選び *can1* 遺伝子プロモーター領域を標的とする guide RNA と dCAS9 (Flag tag 付き) を同時に発現し、抗 Flag 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により dCAS9 の標的領域への結合を検討した。その結果、guide RNA の発現依存的に dCAS9 が CAN1 遺伝子領域に結合する事が確認できた。さらに CAN1 遺伝子の ORF を標的とする guide RNA を用いると CAN1 遺伝子の発現が減少しカナバミンに耐性を示した。これは dCAS9 が ORF に結合することにより、転写が阻害されていることを

示していると思われる。

分裂酵母における CRISPR-dCAS9 系の構築
分裂酵母においてまず CRISPR-dCAS9 の構築を試みた。前述のように分裂酵母では U6 snRNA プロモーターを guide RNA の発現に用いることはできない。そこで、すでに報告のある、RNA ポリメラーゼ II により転写される 5' RNA プロセッシングがおきる *rrk1* プロモーターとリボザイムによる 3' 自己切断を組み合わせた発現系 (3) を用いた。まず、変異が入ると低アデニン培地で赤いコロニーを作る *ade6* 遺伝子を標的にした guide RNA と CAS9 を同時に発現すると、高頻度で赤いコロニーが出現した。赤コロニーの出現は CAS9 および guide RNA 発現に依存していて、CAS9 が guide RNA 依存的に変異を導入していることが確認できた。次に *ade6*-guide RNA と Flag タグ付き dCAS9 を発現し、*ade6* 領域への dCAS9 を ChIP 法により検討した。その結果、*ade6* 遺伝子領域への dCAS9 のリクルートは確認できたが、その効率が出芽酵母の 1/10 程度であった。一つの原因として dCas9 とガイド RNA の発現バランスが問題となっていることが示唆されたので、これをコントロールすることをおこない、最終的に出芽酵母の 1/3 程度の効率まで引き上げることができた。

dCAS9-guide RNA を介した RNA によるプロモーター制御の検討

このシステムが機能するか確認するため、ガイド RNA の 3' 末端に特異的 RNA 結合を示す MS2 タンパク質の結合配列を融合し、同時に MS2 と分裂酵母で機能する転写活性化ドメイン VP16 の融合タンパク質を発現する。これにより、dCas9 を介して MS2-VP16 がレポーター遺伝子 ((1) で作成した *cyc1-kanMX*) 上流にリクルートされ転写が活性化されるかを検討した (図 3)。

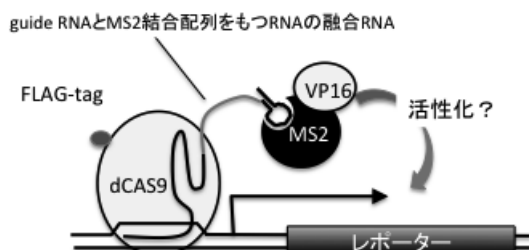
ChIP 法により MS2 がレポーターへの微量ながらレポーター上にリクルートされていることは確認できた。しかし、レポーターの活性化すなわち G418 耐性を示す細胞の出現は観察できなかった。またこれは、もともとの dCas9 のターゲティング効率が低く、転写活性化にいたるに十分な MS2 をリクルートできていない可能性がある。また、dCAS9 の局在を MS2-RNA を融合した guide RNA と融合していない RNA を発現する場合と比較すると、MS2-RNA を発現した場合の dCAS9 の局在が 1/2 程度まで減少していた。これは guide RNA に異種 RNA を結合させることにより dCAS9-guide RNA 複合体の形成が阻害されている可能性を示している。したがって、融合する際に複合体形成を阻害しないリンカー RNA を検討するなどの工夫が必要と思われる。

(3) 今後の展望

以上、本研究で目指した転写制御をおこな

う RNA のスクリーニングには至らなかった。しかし、その過程で分裂酵母で dCAS9 のシステムが使用できることがわかった。まだ、この系は guide RNA の発現系など工夫すべき点はあるが、十分 genome editing を含む各種目的に CRISPR を使用することができると思われる。

図3 CAS9-guide RNAを介したRNAによるプロモータ制御の検討



分裂酵母で転写機能をもつ RNA のスクリーニング系を構築するには、さらなる条件検討など時間を要するが、これに取り組んでいきたい。さらに、より確実に dCAS9 が機能する事を見いだした出芽酵母を用いて、スクリーニングをおこなうためのシステムを構築する。出芽酵母のクロマチン制御機構は分裂酵母に比べヒトを初めとする他の生物と異なる側面はあるが、そこでの機能性 RNA スクリーニングから ncRNA の機能について十分普遍性のある情報が得られると考えている。

< 引用文献 >

- (1) Rinn et al. *Cell* (2007) 129:1131-1323
- (2) Wang et al. *Nature* (2011) 472:120-124
- (3) Buhler et al. *Cell* (2006) 125:873-886
- (4) Oya et al. *Plos Genet.* (2013) 9:e1003677
- (5) Jacobs et al. *Nat Commun.* **5**, 5344 (2014).

5 . 主な発表論文等

[その他]

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~bo/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村上 洋太 (MURAKAMI Yota)
北海道大学・理学研究院・教授
研究者番号：20260622

(3)連携研究者

高畑 信也 (TAKAHATA Shinya)
北海道大学・理学研究院・助教
研究者番号：50381588