

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16098

研究課題名(和文) Sensitive and highly multiplexed assessment of lncRNA interactions with chromatin

研究課題名(英文) Sensitive and highly multiplexed assessment of lncRNA interactions with chromatin

研究代表者

柴山 洋太郎 (Shibayama, Youtaro)

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：60815819

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)：この研究では、RNAが人間の細胞のどこに運ばれ、細胞がさまざまな刺激によるストレスを受けたときにそれがどのように変化するかを調査した。ほとんどのRNAはストレス条件下でも適切な局在を維持するが、私はそうでないRNAを特定した。異なるストレスは、異なるRNAの局在変化を誘導し、場合によっては、同じRNAの局在変化を異なるパターンで誘導した。私たちのゲノムに存在する様々な種類のRNAのうち、ストレスによって局在が変化するのは、ロングノンコーディングRNAと呼ばれるRNAが支配的であった。クロマチンに結合したRNAをさらに調べ、局在の変化が細胞の機能に関連していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

One way by which genes function properly is by ensuring RNA travels to intended locations within the cell, a mechanism with important implications in health and disease. My results suggest a possible underlying reason for some diseases and may also provide a point of intervention.

研究成果の概要(英文)：Our bodies function properly when our genes function as intended by nature. Proper functioning of genes is controlled at many levels. One of these is ensuring that RNA, molecules which carry information contained in genes, travel to proper locations inside our cells. I investigated where RNA from every single gene occurs in the human cell and how that changes when the cell is stressed from various stimulations. Where most RNAs keep their proper localization in stressed conditions, I identified a group of RNAs which do not. Remarkably, different kinds of stress induce different members of RNA to change localization, and in some cases, induce the same members of RNA to change localization in different patterns. Upon many classes of RNA that exist in our genome, a group of RNA called long non-coding RNA were the most dominant among those RNA that change localization upon stress. With a chromatin-bound RNA, I have shown that change in localization has functional relevance for the cell.

研究分野：Genomics

キーワード：RNA localization long noncoding RNA Gene expression Subcellular localization

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景:

遺伝子発現はさまざまなレベルで制御されており、転写物の細胞内局在の適切な制御もその一つである。ゲノムワイドでは、RNA の細胞内局在の特徴が十分に解明されていないだけでなく、それが細胞へのストレスや刺激によってどのように変化するかについても十分に理解されていない。このプロセスはどのくらい動的なのか?また、遺伝子発現を調節する細胞の一般的なメカニズムなのか?これらを解明することは、遺伝子発現についての理解を深めるだけでなく、発達や疾患における潜在的な制御機構を特定するためにも、答えを見つけるべき重要な質問であった。

2. 研究の目的:

(1) この研究の目的は、RNA の細胞内局在をゲノム全体のレベルで特徴づけ、それが細胞ストレスによってどのように変化するかを特徴付けることであった。

(2) もう一つの目的は、RNA の細胞内局在におけるそのような変化の機能的結果があれば、それを示すことであった。

3. 研究の方法:

(1) DNA 複製、転写、DNA 修飾、ヒストン修飾、翻訳などの必須経路を標的とする7種類の摂動試薬による細胞刺激下で、RNA の細胞内局在を調査した。これらの試薬で刺激した条件で培養したヒト皮膚線維芽細胞を、細胞質、核質およびクロマチンに画分した。これらの各画分に関連する RNA を CAGE シーケンシング(Shiraki et al., 2003)によって評価した。刺激した細胞とコントロール細胞とでこれら3つの画分の RNA の濃縮を比較することで、刺激によって局在が変化した RNA とその変化を特定するための計算パイプラインを確立した。

(2) 検証は、単一分子蛍光 in-situ ハイブリダイゼーション (single molecule fluorescence in-situ hybridization, smFISH) によって行った。

(3) クロマチンで高度に濃縮されるように局在が変化する long noncoding RNA (lncRNA)は、そのクロマチン結合領域を確立するためにChIRP-seq (Chiu et al., 2011)によって特徴付けた。この lncRNA は、ノックダウンおよび定量免疫蛍光イメージングによってさらに特徴付けた。

4. 研究成果:

(1) 初代ヒト皮膚線維芽細胞の細胞質、核質、およびクロマチン画分からの RNA の CAGE シーケンシングリードを正規化し、三項プロットを使用して比較し、トランスクリプトームワイドで相対存在量を示した(図1)。 mRNA は3つの画分に広がっていたのに対し、lncRNA はクロマチン画分に濃縮されており、これは lncRNA がクロマチンで作用して転写を調節するという以前の報告 (Werner et al., 2017) と一致していた (Werner et al., 2017)。

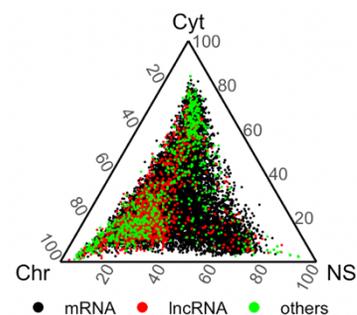


図1. 細胞質、核質、クロマチン間の転写物の相対存在量。

(2) 細胞刺激により細胞内局在が変化する RNA をスクリーニングするために、細胞を 7 つの経路定義薬物 (アクチノマイシン D、4E1RCat、シクロヘキシミド、シクロスポリン A、5-アザ-2'-デオキシシトシン、バルプロ酸、ドキシソルビシン) で処理した。各刺激について、正規化された CAGE 読み取り値をビヒクル対照からの読み取り値と比較した。三項プロット上のそれらの位置を使用して、刺激された条件下で局在が変化する RNA をスクリーニングするための計算パイプラインを確立した (図 2)。実験は二重に行われ、各 RNA が三項プロット上の 4 つの点 (ビヒクルコントロールから 2 つ、刺激条件から 2 つ) で表す。各反復実験について、コントロールの条件下の状態を表す点から刺激された条件下の状態を表す点までの距離をベクトル距離 (vector distance) と呼び、同じ条件下での 2 つの反復点間の距離をギャップ距離 (gap distance) と呼んだ。簡単に言うと、ベクトルの絶対距離 (三項プロット上の最大距離 1.0 のうち ≥ 0.2) と平均ベクトル距離と平均ギャップ距離の比 (≥ 2.0) に閾値を設定した。

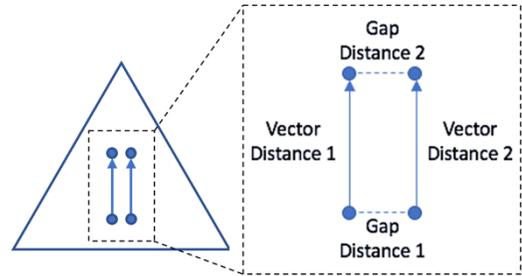


図 2. 三項プロット上で一貫して置換された RNA のフィルタリング。

上記のフィルタリング方法により、反復実験間で局在化のシフトが一致した RNA を同定することができた。注目すべきことに、各刺激は RNA 変位の異なるパターンを引き起こし (図 3)、これがそれぞれの特定の刺激に対する反応であることを示唆した。アクチノマイシン D 処理下での RNA の置換は一般的であり、ベクトルはクロマチンに向かって進むものが目立った。これは以前に報告された現象 (Hirabashi et al., 2019) であるため、ポジティブコントロールとして機能した。さらに、すべての処理において、lncRNA が、置換された RNA の中で最も優勢な RNA クラスであり (図 4)、他の RNA クラスと比較して独特の置換パターンを示した (図 5)。これは、三項プロットから XY プロットの原点まですべてのベクトルを正規化することで視覚化できた。

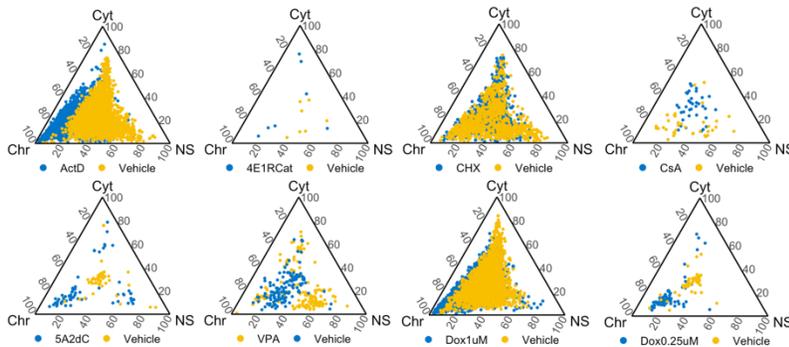


図 3. 各刺激下で置換された RNA。スペースの制約のため、ベクトル矢印は除外されている。

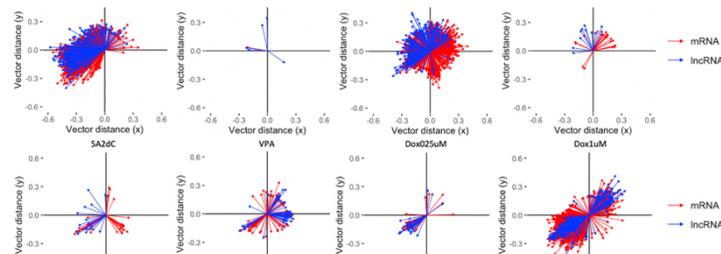


図 5. 三項プロットからの置換された RNA のベクトルは、長さと同方向によりよく視覚化するために XY プロットの原点に対して正規化された。mRNA と lncRNA はベクトルの方向が異なる。

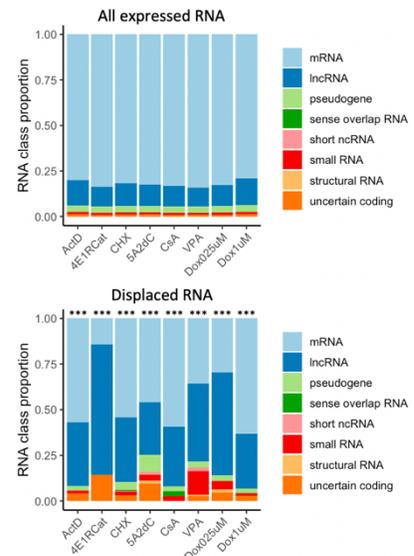
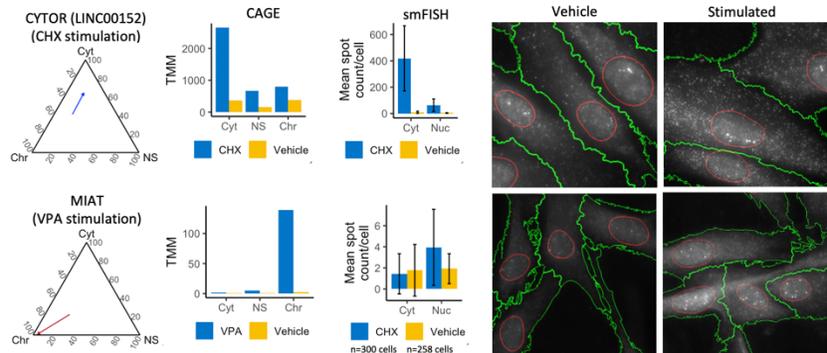


図 4. すべての発現された RNA (左) と置換された RNA (右) を構成するクラス。

(3) 細胞分画およびCAGEシーケンシングからのRNAの局在化における上記観察された変化を検証するために、smFISHを実施した(図6)。主にlncRNAが置換されたRNAクラスであることが示されたため、複数の刺激および広範囲の発現レベルにわたって、合計12個の置換されたlncRNAに対してsmFISHを実行した。なんと、12のターゲットのうち、11がCAGEデータと一致した。11のうち2件を以下に示した。smFISHは、2桁にわたる発現レベルのRNAの変位を検証した。



(4) RNA置換の機能的関連性を示すために、lncRNA MIAT(図6)を選択した。MIATは、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸で細胞を処理すると、クロマチンに高度に濃縮された。

図6. lncRNA置換のsmFISH検証。12件の検証のうち2件を表示している。

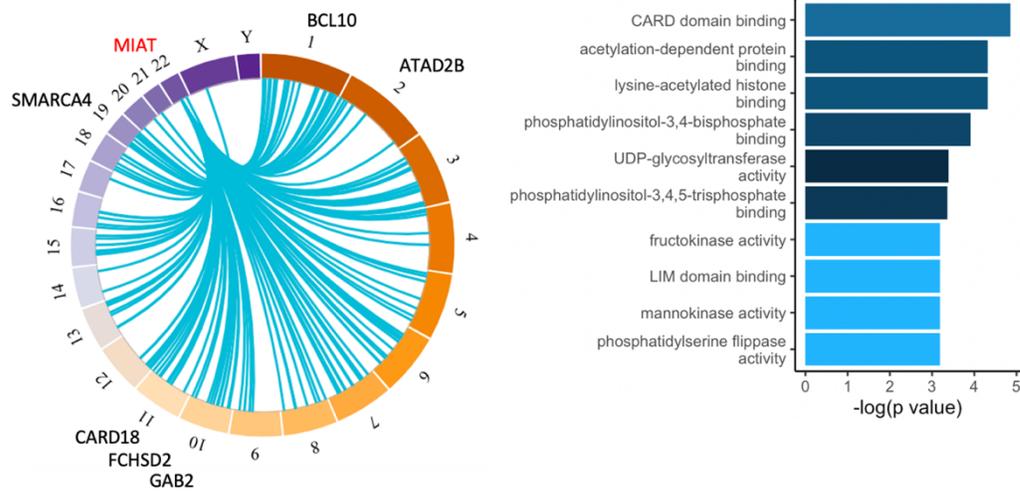


図7. ChIP-seqによって同定されたMIATが結合するゲノム遺伝子座といくつかの遺伝子例(左)。MIATによって結合された遺伝子間の強化された経路(右)。

MIATのクロマチンパートナーは、バルプロ酸処理細胞に対してChIP-seq(Chu et al., 2011)を行い同定し、ゲノム全体に広がっていることを示した(図7)。MIATが結合する遺伝子の経路解析(遺伝子オントロジー)により、上位3つの分子プロセスとしてCARDドメイン結合、アセチル化依存性結合、およびリシンアセチル化ヒストン結合が示された。バルプロ酸は、H3K27での過剰アセチル化を引き起こすヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるため、MIATが結合するヒストンアセチル化に関与する2つの遺伝子、SMARCA4およびATAD2Bをさらに調査した。SMARCA4は転写活性化因子であり、H3K27acを調節することが以前に報告されているSWI/SNF複合体の中心的メンバーである(Alver et al., 2017)。MIATをsiRNAを使用してノックダウンし(図8A)、H3K27acレベルに対する効果を定量免疫蛍光イメージングによって測定した。まず、予想通り、バルプロ酸による処理により、ヒト線維芽細胞のH3K27acレベルが上昇した(図8B)。注目すべきことに、バルプロ酸処理細胞におけるMIATのノックダウンは、H3K27acレベルの減少をもたらした(図8C)。

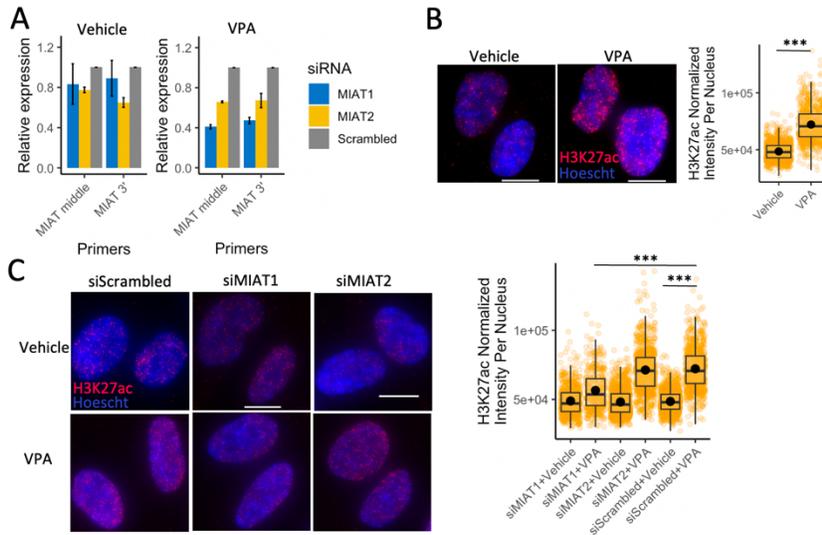


図 8. (A) siRNA ノックダウン後の MIAT 発現。 (B) ビヒクルおよび VPA 処理細胞の H3K27ac の免疫蛍光イメージング。 (C) MIAT ノックダウン細胞における H3K2ac の免疫蛍光イメージング。

(5) まとめて、この研究プロジェクトは、RNA の異なる細胞内局在化が広範囲の細胞ストレス下で発生し、lncRNA の間で最も一般的であることを示した。これは、遺伝子発現の重要な層である可能性があとともに、動的かつ状況依存のプロセスであり、これにより、細胞は必要に応じて既存の遺伝子レパートリーの下で機能的な遺伝子産物の数を増やすことができることになる。lncRNA MIAT の場合、実験により、ゲノム全体の複数の遺伝子と相互作用し、バルプロ酸処理時の H3K27 の高アセチル化を助けることが示された。最後に、この結果から、RNA の局在化とその誤った制御が発達と疾患に関係しているのではないかと推測したくなる。

引用文献:

1. Shiraki T, Kondo S, Katayama S, Waki K, Kasukawa T, Kawaji H, Kodzius R, Watahiki A, Nakamura M, Arakawa T, Fukuda S, Sasaki D, Podhajska A, Harbers M, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y. Cap analysis gene expression for high-throughput analysis of transcriptional starting point and identification of promoter usage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Dec 23;100(26):15776-81. doi: 10.1073/pnas.2136655100. Epub 2003 Dec 8. PMID: 14663149; PMCID: PMC307644.
2. Chu C, Qu K, Zhong FL, Artandi SE, Chang HY. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell*. 2011 Nov 18;44(4):667-78. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.027. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21963238; PMCID: PMC3249421.
3. Werner MS, Sullivan MA, Shah RN, Nadadur RD, Grzybowski AT, Galat V, Moskowitz IP, Ruthenburg AJ. Chromatin-enriched lncRNAs can act as cell-type specific activators of proximal gene transcription. *Nat Struct Mol Biol*. 2017 Jul;24(7):596-603. doi: 10.1038/nsmb.3424. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28628087; PMCID: PMC5682930.
4. Hirabayashi, S., Bhagat, S., Matsuki, Y. *et al.* NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed *cis*-regulatory elements. *Nat Genet* **51**, 1369–1379 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0485-9>.
5. Alver BH, Kim KH, Lu P, Wang X, Manchester HE, Wang W, Haswell JR, Park PJ, Roberts CW. The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat Commun*. 2017 Mar 6;8:14648. doi: 10.1038/ncomms14648. PMID: 28262751; PMCID: PMC5343482.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------