

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23714

研究課題名（和文）非コードRNAによるクロマチン転写制御機構

研究課題名（英文）Mechanism of transcriptional regulation on Chromatin by non-coding RNA

研究代表者

藤田 理紗 (Fujita, Risa)

東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：10845291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物のゲノムDNAはクロマチン構造を形成して核内に収納されている。本研究では、非コードRNAがクロマチン上の転写を制御する機構の解明を目的とした。そこで、非コードRNAが引き起こすヌクレオソーム構造の変化および非コードRNAによるRNAポリメラーゼIIの転写活性への影響を構造生物学的および生化学的解析を行った。その結果として、非コードRNAがヌクレオソームの安定性を変化させることを明らかにした。また、非コードRNAがヌクレオソーム上での転写活性や転写中のヌクレオソーム構造に影響を及ぼす可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非コードRNAは発生や疾患と関連して、クロマチン上での遺伝子発現制御に寄与する。これまでクロマチン制御因子を介さない非コードRNAの機能には焦点が当てられていなかった。その新たな観点からクロマチンに対する非コードRNAの影響を解明する本研究は、非コードRNAの機能に関する新規知見を提供する。本研究では、試験管内で非コードRNAとヌクレオソームのみが存在する環境を作り出すことで、RNAのクロマチンへの直接的な作用とその作用機序の原子レベルでの検証が可能となった。非コードRNAは、疾患に関連した重要な治療標的として着目されており、その機能の理解は治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic genomic DNA forms a chromatin structure in the nucleus. The purpose of this study was to elucidate the mechanism by which non-coding RNA regulates transcription on chromatin. Therefore, structural biology and biochemical analysis were performed on the changes in nucleosome structure caused by non-coding RNA and the effects of non-coding RNA on the transcriptional activity of RNA polymerase II. As a result, it was revealed that non-coding RNA alters the stability of nucleosomes. We also found that non-coding RNAs may affect transcriptional activity on nucleosomes and nucleosome structure during transcription.

研究分野：クロマチン構造

キーワード：クロマチン 非コードRNA 転写制御

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 DNA は、細胞核内に収納される際にクロマチン構造を形成している。クロマチンの基盤構造単位であるヌクレオソームは、4 種類のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)をそれぞれ二分子ずつ含んで形成されるヒストン八量体に、DNA が約 1.6 回転巻きついた構造である。ヌクレオソームが数珠状に連なることで、高次のクロマチン構造が形成されている。クロマチンの構造は、ヌクレオソーム中のヒストンの解離やヒストンバリエーションとの交換、ヒストン翻訳後修飾、DNA 上のヌクレオソームの形成位置によって多様に変化する。そのクロマチンの構造変化が、転写、複製、組換えなどの DNA 上で生じる反応を制御している。これまでに報告されているクロマチンの構造変化を誘起する因子としては、クロマチンリモデラー、ヒストンシャペロン、ヒストン修飾後因子などが挙げられる。それらに加えて近年では、非コード RNA についてその役割が着目されている。

非コード RNA はタンパク質をコードしないゲノム領域から転写され、タンパク質に翻訳されずに機能する RNA である。そのうちの一部は核内に係留され、クロマチン上に集積する。細胞生物学的解析や網羅的なゲノム解析から非コード RNA がクロマチン上の反応の制御に関与することが示唆されている。先行研究より非コード RNA はクロマチン制御因子と結合して、目的領域への集積や集積した因子の足場としてクロマチンに対して間接的に作用する機能を有することが報告されている。転写制御においては、クロマチンに集積した非コード RNA が近傍の遺伝子の転写活性化もしくは抑制化に寄与すると考えられている。この知見から、クロマチン上での転写制御機構において非コード RNA 自体が何らかの機能を有する可能性が考えられる。しかし、その詳細な機構や非コード RNA 自体のクロマチンに直接作用するような機能について不明な点が残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クロマチン上での転写制御における非コード RNA のクロマチンおよびヌクレオソームに対する機能の解明である。上述のように、非コード RNA 自体がクロマチンに直接作用するような機能はこれまで着目されていなかった。そこで、本研究ではその点を明らかにするために、試験管内で再構成したヌクレオソームを用いた構造生物学的解析および生化学的解析により非コード RNA の新たな機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、クロマチン上での遺伝子発現に関与する非コード RNA として、エレノア RNA を用いた解析を行った。再発乳がん細胞で高発現するエレノア RNA は、乳がんの原因となるエストロゲン受容体をコードする ESR1 遺伝子近傍の非コード DNA 領域から転写される。エレノア RNA は、ESR1 遺伝子周辺に留まり、ESR1 遺伝子の発現を過剰に活性化することが細胞生物学的解析から明らかにされている。そこで、転写活性化におけるエレノア RNA のクロマチン構造への影響に着目し、生化学的手法とクライオ電子顕微鏡を用いた構造生物学的手法により下記の研究を遂行した。

(1) 非コード RNA がヌクレオソーム熱安定性に及ぼす影響の解析

解析を行うにあたって、ヒト由来のヒストンを大腸菌のリコンビナントタンパク質として精製し、それを用いて試験管内でヌクレオソームを再構成した。また、エレノア RNA は試験管内転写系によって合成した。非コード RNA のヌクレオソームの構造への影響を評価するために、リアルタイム PCR システムを用いたヌクレオソームの熱安定性試験を行った。本試験では、蛍光色素とヌクレオソームを混合した溶液に熱を加えていった際に、ヌクレオソームから解離したヒストンに蛍光色素が結合して発する蛍光が検出される温度の違いによってヌクレオソームの安定性を比較する。この実験系を用いて、エレノア RNA やその他の RNA の有無によるヌクレオソームの安定性の変化を評価した。

(2) 非コード RNA 存在下のヌクレオソーム上での RNA ポリメラーゼ II 転写試験系の改良

(1)の結果を受けて、エレノア RNA がヌクレオソーム上での RNA ポリメラーゼ(RNAPII)の転写活性に影響を与えるか解析した。既存の再構成ヌクレオソーム上の RNAPII 転写試験系を基に、エレノア RNA 添加時の転写試験系の確立を目指し、反応溶液の組成や反応時間や反応温度の検討を行った。さらに、定量性を高めるために反応系の改良を行い、エレノア RNA の有無による RNAPII の転写活性への影響を評価した。

(3) 非コード RNA 添加時の RNAPII-ヌクレオソーム複合体の立体構造解析

これまでにエレノア RNA 存在下におけるヌクレオソームの熱安定性試験やゲルシフト法によって、エレノア RNA がヌクレオソームの状態を変化させることを見出している。そこで、エレノア RNA がヌクレオソームにどのような構造変化を引き起こすかをクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって明らかにする。試料調製においては、エレノア RNA とヌクレオソームと RNA ポリメラーゼ複合体を混合し、スクロースの密度勾配遠心法と化学架橋を組み合わせ

た GraFix 法により試料を調製した。GraFix 法を行うことで、余剰のエレノア RNA や複合体を形成していないヌクレオソーム分子や RNAPII を取り除くことが可能となる。それにより、電子顕微鏡像中で目的の粒子を選別する際の妨げになるバックグラウンドノイズが減少する。また、エレノア RNA により構造変化したヌクレオソームは、通常のヌクレオソームよりも不安定であると考えられ、構造を維持するために GraFix 法の過程で架橋を行った。試料を調製した後に、氷包埋法によるグリッド作製の適切な凍結条件を探索した。最適なグリッドを用いて、クライオ電子顕微鏡により大量の電子顕微鏡像を撮影した。電子顕微鏡像から抽出した単粒子画像を用いて、2 次元、3 次元の平均像を取得し精密化を行うことで、非コード RNA 存在下でのヌクレオソーム-RNAPII 複合体の単粒子解析を行った。

4. 研究成果

本研究では、非コード RNA の中でもクロマチン上に集積するエレノア RNA を用いて、ヌクレオソームに対する影響を解析した。熱安定性試験では、エレノア RNA を加えていないヌクレオソームではヒストン H2A-H2B の解離が 75 度付近であったのに対し、エレノア RNA を加えた際には 65 度付近であった。この結果より、エレノア RNA はヌクレオソーム中のヒストン H2A-H2B の解離を促進する活性を有することを明らかにした(Fujita, Yamamoto et al., Commun. Biol. 2020)。これはエレノア RNA がヌクレオソームの構造を変化させることで転写制御に機能する可能性を示唆している。

続いて、エレノア RNA によって引き起こされたヌクレオソームの構造変化が、ヌクレオソームにおける RNAPII の転写活性に関係するか解析した。試験系の確立においては、既存の系を改変して、転写活性を定量的に評価するために、非コード RNA を加えていない状態の転写量の底上げを目指した。その際に、反応溶液の塩濃度や界面活性剤の有無、転写因子の有無、反応温度や反応時間の検討を行った。それにより、エレノア RNA の有無による RNAPII の転写活性への影響の評価が可能となった。エレノア RNA 添加時のヌクレオソーム-RNAPII 複合体の構造解析において、試料調製の過程では、GraFix 溶液の組成検討や反応濃度の検討、グリッド作製の凍結条件の検討によりクライオ電子顕微鏡で観察できるサンプルの調製を実現した。その後、顕微鏡像を取得し、複数回のデータセットを用いて解析を行うことで複数の構造情報が得られ、RNAPII 転写過程におけるヌクレオソームの構造について詳細な解析が可能となった。本研究では、非コード RNA の新規機能の解明に向けて、クロマチンやヌクレオソームに対する直接的な作用に着眼した。それによって、非コード RNA のクロマチン制御における機能に関して基盤情報を得られた。

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 1件）

1. 著者名 Fujita Risa, Yamamoto Tatsuro, Arimura Yasuhiro, Fujiwara Saori, Tachiwana Hiroaki, Ichikawa Yuichi, Sakata Yuka, Yang Liying, Maruyama Reo, Hamada Michiaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0784-9	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 -

1. 著者名 Ariyoshi Mariko, Makino Fumiaki, Watanabe Reito, Nakagawa Reiko, Kato Takayuki, Namba Keiichi, Arimura Yasuhiro, Fujita Risa, Kurumizaka Hitoshi, Okumura Ei ichi, Hara Masatoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 40
2. 論文標題 Cryo EM structure of the CENP A nucleosome in complex with phosphorylated CENP C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105671	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 藤田 理紗、胡桃坂 仁志	4. 巻 71
2. 論文標題 特集 細胞機能の構造生物学 .細胞分裂・核の構造細胞生物学 ヌクレオソームによるクロマチンの構造多様性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 343 ~ 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425201187	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 理紗、山本 達郎、江原 晴彦、有村 泰宏、関根 俊一、斉藤 典子、胡桃坂 仁志
2. 発表標題 クロマチン転写制御において非コードRNAがヌクレオソームに及ぼす影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田理紗、山本達郎、江原晴彦、有村泰宏、鯨井智也、 関根俊一、斉藤典子、胡桃坂仁志
2. 発表標題 非コードRNAが引き起こすヌクレオソームの構造変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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