

平成 22年 5月 24日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2008-2009
 課題番号：20052013
 研究課題名（和文） RNAの運命決定制御とヘテロクロマチンにおける転写装置の役割
 研究課題名（英文） Regulation of fate-determination of RNA and role of transcriptional machinery in heterochromatin formation
 研究代表者
 村上 洋太（Murakami Yota）
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授
 研究者番号 20260622

研究成果の概要（和文）：

RNAポリメラーゼ II により転写された RNA は mRNA、non-coding RNA (ncRNA) は様々な形のプロセッシングを受け、異なる運命をたどる。この運命決定機構について解析をおこない、転写伸長制御因子が分裂酵母ヘテロクロマチン ncRNA の運命決定に関与することを明らかにした。さらに、分裂酵母ヘテロクロマチンにおいて ncRNA が DNA:RNA ハイブリッド形成を通じてクロマチン近傍に残りヘテロクロマチン形成に寄与するという新規の機構を発見した。また転写伸長制御因子が転写伸長を制御する分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

mRNA and non-coding RNA, both of which are transcribed by RNA polymerase II, have different fate with different RNA processing processes. We analyzed the mechanism for the fate-determination mechanism and found that transcriptional elongation factors were involved in fate-determination process of heterochromatic ncRNA in fission yeast. We also found that fission yeast heterochromatin ncRNA formed DNA:RNA hybrid to remain on chromatin and plays a role in heterochromatin formation. In addition, we revealed the mechanism to regulate elongation of transcription by transcriptional elongation factors.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,000,000	0	14,000,000
2009年度	14,000,000	0	14,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	28,000,000	0	28,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：転写 RNAポリメラーゼ II クロマチン RNAプロセッシング

1. 研究開始当初の背景

| RNAポリメラーゼ II (RNAPII)により転写

された RNA は mRNA、non-coding RNA (ncRNA)あるいは何らかの原因で不要な RNA といった RNA それぞれの性質に応じた様々な形のプロセッシングを受け、異なる運命をたどる。このような RNA 運命決定は遺伝情報デコードを制御する非常に重要なステップである。最近の解析結果から「転写とプロセッシングの共役」、すなわち転写伸長途中の RNAPII 上で様々な RNA プロセッシング反応が起こることが示唆され、「RNA の運命決定の過程が転写と共役する。」という概念が生まれつつあった。しかし、この「転写と RNA の運命決定の共役」の分子機構はようやく研究の端緒についたところで、その詳細はほとんど解明されていない。

研究代表者の村上は RNAi システムに依存する分裂酵母のヘテロクロマチン形成の解析を行なって来た。このシステムではヘテロクロマチン領域で転写される ncRNA から合成される siRNA がヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしている。そして興味深いことに siRNA 合成はヘテロクロマチンに依存しており、クロマチン構造が何らかの形で ncRNA の運命を決定していることになる。村上はこのシステムに関し、RNAPII がこの ncRNA の転写を行うだけでなく、ncRNA からの siRNA 合成を誘導することを示すという結果を得ていた。一方分担者の山口は転写の伸長反応の制御に関わる転写伸長因子群の同定と解析を行ってきた。そして、その過程で、これら転写伸長因子が RNA 切断にも関与することを示す証拠を得ていた。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究課題では、「転写と共役しておこる RNA 運命決定の制御」の分子機構を明らかにする事を目的にすした。このために代表者、分担者は今までの研究成果をふまえ、それぞれ異なるアプローチを用いて転写に共役した RNA 運命決定機構の共通原理の解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) 村上:「ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の運命決定と動態」

分裂酵母のヘテロクロマチンはヘテロクロマチン内で転写される ncRNA は mRNA と

同じ RNA ポリメラーゼ II により転写されるが、転写後 RNAi 因子により siRNA へとプロセッシングを受け、mRNA とは異なる運命をたどる。以下の二点に焦点を絞って解析を進めた。

① ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の運命決定

ncRNA の転写をおこなう RNA ポリメラーゼ II を中心とする転写装置のなかで、RNA の運命決定にかかわる可能性のある因子を選択し、遺伝子破壊を系統的におこない、ヘテロクロマチンに異常が生じるかどうかを検討する。さらに異常が生じた破壊株について分子遺伝学的解析を進め、ncRNA の運命決定に関与するかどうかを解析する。

② ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の動態

RNAi に依存するヘテロクロマチン形成のモデルでは転写後 ncRNA がクロマチンに結合し RNAi 因子結合のプラットフォームとして機能していることが予想されている。しかし、そのことは実験的に定められていなかった。そこで、ヒストンを免疫沈降したときにヒストンとともに沈降する RNA を解析することで、ncRNA のクロマチン結合を確認できると考えた (ヒストン RIP 法)。またその手法を使用することでクロマチン結合の分子機構の解明を試みる。

(2) 山口:「転写伸長因子を介しておこる転写伸長制御と様々な RNA 切断反応の制御メカニズム」

① 転写伸長因子による転写伸長制御機構

転写伸長を制御する DSIF(Spt4,5 複合体)は転写の初期段階で転写を一時停止させ、pTEFb によるリン酸化により、転写伸長を再開させ逆に転写伸長を促進する。この DSIF による転写伸長促進機構を解明するため、試験管内転写系を用いて、DSIF による転写伸長促進に必要な因子を精製同定する。さらに、その因子が *in vivo* で果たす役割について培養細胞中の遺伝子上での局在、転写活性の測定を中心におこなった。

② 転写伸長と共役して機能する RNA プロセッシング因子の構造機能解析

転写伸長と共役して RNA プロセッシングをおこなう因子が数多くあるが、その中のいくつかについて、結晶構造解析を含めた構造・機能解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 村上:「ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の運命決定と動態」

① ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の運命決定

分裂酵母ヘテロクロマチン ncRNA の運命決定に関わることが予想される RNA ポリメラーゼ II と協調的に働く各因子について遺伝子破壊をおこない解析をおこなった。その結果 Csk1 キナーゼを候補として同定した。

Csk1 は RNA ポリメラーゼ II の C 末リピートドメイン(CTD)および DSIF の Spt5 をリン酸化する酵素 Cdk9 (pTEFb のホモログ) を活性化するキナーゼである。Csk1 変異株ではヘテロクロマチンそのものの構造や転写抑制機能は影響を受けないが、転写された ncRNA の分解が異常をきたしており、Csk1 が ncRNA の分解の制御に関わることが示唆された。Spt4 の破壊株(Spt5 は必須タンパク質で遺伝子破壊をおこなえない)は Csk1 と同じ表現型を示すことから、Csk1-Cdk9 による DSIF/Spt4-5 のリン酸化がヘテロクロマチン ncRNA の分解制御に深く関与することが明らかとなった。この結果は転写伸長制御因子がヘテロクロマチン ncRNA の運命決定に重要であることを明確に示す物で、今後の展開が期待できる。

② ヘテロクロマチン形成にかかわる ncRNA の動態

ヒストン RIP 法により、ヘテロクロマチン ncRNA が実際にクロマチンに結合していることを明確に示した。また、この結合は転写された ncRNA の一部が鋳型 DNA と DNA:RNA ハイブリッドを形成することでクロマチン近傍にとどまっていることがわかった。さらに、このハイブリッド形成がヘテロクロマチンの形成に必要であることを示した。また、DNA:RNA ハイブリッド形成の機構について検討を行い以下の知見を得た (図 1)。(a) DNA:RNA ハイブリッド形成は RNAi 因子に依存する (b) ハイブリッド形成は ncRNA の特定の RNA 配列に依存する。このハイブリッド形成はヘテロクロマチンには依存しない (c) (b) の RNA エLEMENT が転写産物でもヘテロクロマチン内で転写されることにより DNA:RNA ハイブリッ

ドを形成する。以上の結果は今まで想定されていなかったメカニズムである。真核生物ではゲノムのほとんどの領域で ncRNA が転写されることが示され、その機能が注目されているが、少なくともその一部はクロマチン構造制御に関わることが示唆されている。我々の結果はこれらクロマチン構造制御に関与する ncRNA を考える上で重要な貢献をすると思われる。

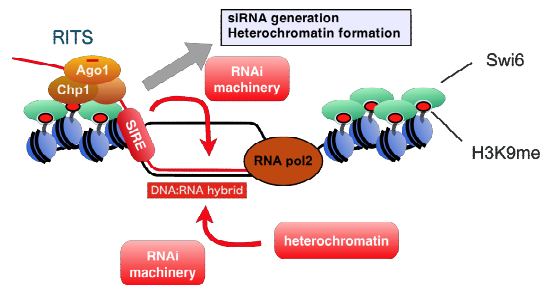


図 1 ヘテロクロマチンでのハイブリッド形成

(2) 山口:「転写伸長因子を介しておこる転写伸長制御と様々な RNA 切断反応の制御メカニズム」

① 転写伸長因子による転写伸長制御機構

DSIF による転写促進活性に必要な因子を試験管内転写系を利用して精製をおこない、Paf1 複合体と Tat-SF1 を得た。両者は DSIF を介して協調的に転写伸長を促進する。また、細胞内の fos 遺伝子の転写を解析したところ Paf1, Tat-SF1 が DSIF 依存的に転写されている fos 遺伝子に局在し、fos 遺伝子の効率良い転写に必要であることがわかった。この結果は今まで未知であった DSIF による転写伸長活性化機構をはじめて明らかにする物である。さらに今まで転写されているクロマチン構造制御にかかわると考えられていた Paf1 複合体が直接転写伸長反応促進にも関与することをはじめて示した物である。

② 転写伸長と共役して機能する RNA プロセシング因子の構造機能解析

DSIF はリン酸化依存的に RNA 品質管理因子 Dom3 と結合することがわかっていたが、その結合に必要なドメインの詳細な解析をおこない、結合に必要な Dom3 のアミノ酸を決定した。さらにコロンビア大学の Tong 研究室と共同で、DSIF のリン酸化ペプチドと Dom3 の共結晶構造を解析した。一方、プロセ

シング因子 CFI_m の機能・構造解析を行ない、CFI_m が (25)2-59-68 というヘテロ 4 量体を形成すること、そして細胞内において多数の遺伝子上で選択的ポリ(A)付加を制御するユニークな役割を果たしていることを明らかにした。これらの結果は今後、未知の領域である転写と RNA プロセシングの協調的制御の解明の基礎となる重要な知見である。

以上の解析を通じて、今まで個々に解析が進んでいた、転写伸長制御、RNA のプロセシングの協調的制御機構解明や、未知であった RNA の運命決定制御の解明の糸口になる結果である。また DNA:RNA ハイブリッド形成という発見は今後ゲノム調節全体に大きなインパクトを与える可能性があると考えている。

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 9 件)

すべて査読有り。

- ①. Shimada A. and Murakami Y., Dynamic regulation of heterochromatin via phosphorylation of HP1-family proteins., **Epigenetics** 5: 30-33 (2010)
- ②. Chen Y., Yamaguchi Y., Tsugeno Y, Yamamoto J., Yamada T, Nakamura M, Hisatake K. and Handa H. DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have non-redundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation. **Genes & Dev.** 23: 2765-77 (2009)
- ③. Kume K., Iizumi Y., Shimada M., Ito Y., Kishi T., Yamaguchi Y. and Handa H. Role of N-end rule ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 in regulating the leucine-mTOR signaling pathway. **Genes Cells** 15: 339-49 (2009)
- ④. Shimada A., Dohke K., Sadaie M., Shinmyozu, K., Nakayama, J-I., Urano, T. and Murakami Y.; Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. **Genes & Dev.** 23:18-23 (2009)
- ⑤. Yung T., Narita T., Komori T., Yamaguchi Y. and Handa H. Cellular

dynamics of the negative transcription elongation factor NELF. **Exp. Cell. Res.** 315:1693-705 (2009)

- ⑥. Komori T., Inukai N., Yamada T., Yamaguchi Y. and Handa H. The role of human transcription elongation factor DSIF in the suppression of senescence and apoptosis. **Genes Cells** 14: 343-45 (2009)
- ⑦. Ando K. Hirao S., Kabe Y., Ogura Y. Sato I., Yamaguchi Y. and Handa H. A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF- κ B and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. **Nucleic Acids Res.** 36: 4327-36 (2008)
- ⑧. Dohke K., S. Miyazaki, Tanaka, K., Urano, T., Grewal, S. and Murakami Y.; Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. **Genes to Cells**, 13:1027-43 (2008)
- ⑨. Kato H., Matsunaga, F., Miyazaki S., Yin, L., D'Urso, G, Tanaka, K., and Murakami Y.; *Schizosaccharomyces pombe* Orc5 plays multiple roles in the maintenance of genome stability throughout the cell cycle. **Cell Cycle**, 7:1083-1094 (2008)

[学会発表] (計 13 件)

- ①. Yamaguchi Y., 「Potential role of transcription elongation factors and elongation control in differentiation and maintenance of ES cells.」 Japan-Israel Workshop on Stem Cells, Feb. 25, 2010., Jerusalem, Israel.
- ②. 村上洋太, 「Dynamic Regulation of heterochromatin structure/function in the cell cycle」 第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体倍加装置のダイナミクス」、2009 年 12 月 9-12 日、神奈川県 横浜市
- ③. Murakami Y., 「Dynamic Regulation of Heterochromatin」 The fifth International Fission Yeast Meeting, 2009 年 10 月 26-31 日、東京都

- ④. Yamaguchi Y. 「Mechanism of phosphorylation-dependent elongation activation by DSIF.」 EMBO Workshop on Messenger RNA 3' Ends & Gene Expression, Sept. 18, 2009., Oxford, UK
- ⑤. Yamaguchi Y. 「DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have non-redundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation.」 CSHL Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Aug. 27, 2009., New York, USA
- ⑥. 村上洋太, 「Dynamic Regulation of Heterochromatin」、第24回 内藤カンファレンス “Nuclear Dynamics and RNA [II]」、2009年6月23-26日、札幌市
- ⑦. 山口雄輝 「転写伸長反応制御のメカニズム」第31回日本分子生物学会年会 2008年12月9-12日 神戸
- ⑧. 村上洋太, 「ヘテロクロマチンのダイナミクス」 蛋白研セミナー 2008年10月30-31日 大阪
- ⑨. Murakami, Y., 「Dynamic organization of heterochromatin」 Chromosome segregation: Centromeres & Kinetochores, Archachon, Bordeaux, France, 27 Sept.-2 Oct., 2008
- ⑩. Yamaguchi, Y., Chen, Y., Tsugeno, Y., and Handa, H. 「DSIF, the Paf1 complex, and Tat-SF1 have non-redundant, cooperative roles in RNA polymerase II elongation」 The 8th EMBL Transcription Meeting, 2008年8月23-27日 Heidelberg, Germany
- ⑪. Shimada, A., Sadaie, M., Nakayama, J-I., Murakami Y., 「Regulation of heterochromatin function by phosphorylation.」 Asia-Pacific Regional *S.pombe* Meeting, Singapore 25-27 July, 2008
- ⑫. Yamaguchi Y. 「Multifaceted gene regulation by transcription elongation factors」 The 21st Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA [I] 2008年6月24-27日 山梨

- ⑬. 村上洋太, 「RNAiに依存するヘテロクロマチン形成における non-coding RNAの転写とダイナミクス」 第2回日本エビジェネティクス研究会年会 2008年5月9-10日 三島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 洋太 (MURAKAMI YOTA)
北海道大学・先端生命科学研究院・教授
研究者番号：20260622

(2) 研究分担者

山口 雄輝 (YAMAGUCHI YUKI)
東京工業大学・生命理工学部・准教授
研究者番号：50345360