

非コード RNA による転写因子結合制御機構の解明

Mechanism of non-coding RNA transcription coupled chromatin remodeling

(分子生物学会推薦)

代表研究者	首都大学東京	廣田耕志	Tokyo Metropolitan University	Kouji HIROTA
協同研究者	首都大学東京	浅田隆大	Tokyo Metropolitan University	Ryuta ASADA
	首都大学東京	千松賢史	Tokyo Metropolitan University	Satoshi SENMATSU

Long noncoding RNAs (lncRNAs) transcribed across gene promoters have been detected. These regulate transcription by mechanisms that have not been fully elucidated. We showed that the chromatin configuration is altered into an accessible state within 290 bp downstream from the initiation site of metabolic-stress-induced lncRNAs (mlonRNAs) in the promoter of the fission yeast *fbp1* gene, whose transcription is massively induced upon glucose starvation. Chromatin upstream from *fbp1* is progressively altered into an open configuration, as a cascade of transcription of three overlapping mlonRNA species (-a, -b and -c in order) occurs with transcriptional initiation sites progressing 5' to 3' upstream of the *fbp1* promoter. Initiation of the shortest mlonRNA (mlonRNA-c) induces chromatin remodeling around a transcription factor-binding site and subsequent massive induction of *fbp1*. We identify the *cis*-element (mlon-Box) required for mlonRNA-c initiation, and by changing the distance between mlonRNA-initiation site and the transcription factor-binding site, we showed that mlonRNA-initiation effectively induces chromatin remodeling in a limited distance within 290 bp. Moreover, we showed that this element can induce mlonRNA transcription coupled chromatin remodeling in *ade6* locus and thereby activates meiotic recombination. These results indicate that mlonRNAs transcription plays roles as a short-range inducer for local chromatin alterations and suggest that this mechanism plays pivotal roles in the regulation of general genome functions in fission yeast.

研究目的

タンパク質をコードしない転写物 (非コード RNA) は、ヒトゲノムの広範な領域において転写されている。非コード RNA の中で遺伝子プロモーター領域において発現する転写物は、プロモーター非コード RNA と呼ばれており、遺伝子制御において機能することが知られている。このような RNA 転写は酵母からヒトにいたる広範な真核細胞に見られ、その重要性が注目されている。これまでのプロモーター非コード RNA による遺伝子制御の研究では、RNA 分子そのものが足場となってクロマチン制御タンパク質の動員を制御する機構が中心的に解析されてきた。一方、非コード領域の RNA ポリメラーゼ通過によるクロマチン制御の分子機構は未解明のままであっ

た。申請者は分裂酵母 *fbp1* 遺伝子の転写活性化時に働くプロモーター領域上流で発現する長鎖非コード RNA(mlonRNA)を発見し、クロマチン再編成を活性化することを通じ、遺伝子本体の制御に不可欠な働きをもつことを示した(Hirota *et al.* 2008)。その後、このような非コード RNA は様々な生き物でも発見されている。これまでに、申請者は mlonRNA 転写に沿って転写領域のクロマチン構造が変化する際に、ヒストンアセチル化が誘導されることや、クロマチン再編成因子 Snf22 と Hrp3 が相補的に mlonRNA 転写と共役したクロマチン再編成に関わっていること、クロマチン再編成因子 Snf22 と Hrp3 とヒストンアセチル化は相互に依存関係にあることを明らかにしている(Adachi *et al.* 2018)。一方、mlonRNA 転写と共役

したクロマチン再編成機構が、生命の普遍的システムなのかどうかなど、不明の点が多く残っている。本研究では、mlonRNA 転写によるクロマチン再編成の分子機構解明とゲノム制御における普遍性の検証のため、転写開始制御と減数分裂期組換え開始制御について調べた。

研究経過

1: mlonRNA 転写の転写開始領域の特定

mlonRNA 転写は、転写領域のクロマチン再編成を誘導することや転写開始領域に明確な TATA box が見当たらないことなど、通常の mRNA 転写と異なることが知られている。このような転写がどのような転写開始制御を受けているのか解明するにはその転写開始エレメントを特定する必要がある。この特定のために3種の mlonRNA のうちの最も短い転写物であり、転写活性化因子結合部位のクロマチン再編成に必須の役割を持つ mlonRNA-c の転写開始を含む上流領域 150 bp を 10 bp ごとに配列置換した変異細胞を作製した。これらの変異細胞から、mlonRNA-c が完全に不良となる細胞を見つけることができた。置換された配列は、「ATCTTATGTA」の 10 bp であり、この配列が mlonRNA 転写の開始に必須であることがわかった。

2: mlonRNA 転写によるクロマチン再編成の効果領域の特定

1 の研究で特定した配列「ATCTTATGTA」を欠損すると、mlonRNA-c の転写が完全に誘導不良となった。一方、上流から転写される mlonRNA-a および b の転写は正常であった。しかし、この変異細胞では転写因子結合領域のクロマチン再編成が不良であり、転写因子の結合量が低下し、その結果 *fbp1*-mRNA の誘導が不良となっていた。この事実は、mlonRNA 転写によって誘導できるクロマチン再編成の領域には、転写開始部位から誘導できる範囲があることを示唆している。そこで、この効果範囲を特定するために mlonRNA-b から転写因子結合領域の距離を、190, 240, 290, 340, 390, 500 bp と段階的に変化させて、どの程度離れるとクロマチン再編成や転写誘導に影響が出るのか調査した。その結果、190-290 bp 離れた変異細胞ではクロマチン再編成が正常に誘導されるが、340 bp 以上離すと離れた距離に応じてクロマチン再編成が不良化することがわかった。この結果か

ら、クロマチン再編成は mlonRNA 転写開始部位から 290 bp の範囲で効果的に引き起こされることが示唆された(Senmatsu *et al.* 2019)。

3: mlonRNA 転写の転写開始シスエレメント mlon-Box の特定

1 の研究で特定した配列「ATCTTATGTA」のコンセンサスエレメントを同定するために、この 10 bp を系統的に他の塩基に置換した 30 種の変異細胞を作製し、mlonRNA-c の転写誘導について調査した。置換の結果、mlonRNA-c の転写量が不良となった配列を排除することで、mlonRNA 転写に必須のコンセンサス配列を決定し、「A/T, A/C, T, T/G, A, T/C/G, G, T, A/G」の 9 bp からなる配列であることが判明した。

4: mlon-Box の他の遺伝子座での転写誘導能力の調査

3 の研究で mlonRNA 転写の誘導に必要なコンセンサス配列「A/T, A/C, T, T/G, A, T/C/G, G, T, A/G」が特定できた。この配列の mlonRNA 誘導における普遍性を調べるために、他の遺伝子座に移植する実験を行った。*ade6* 遺伝子座において、ナンセンス変異として知られている *ade6-M26* 変異部位下流 200 bp に移植した。*ade6-M26* 変異は、点変異の結果 Atf1 と呼ばれる転写活性化因子の結合部位が生成し、この転写因子に依存してストレスや減数分裂期にこの部位からの新しい転写が引き起こされることが知られている(Hirota *et al.* 2008)。また、この Atf1 に依存したストレス応答性の転写によってこの領域のヒストンアセチル化やクロマチン再編成が誘導され、減数分裂期の組換えが 50 倍ほど上昇することも知られている(Yamada *et al.* 2004)。このような状況は *fbp1* 遺伝子に存在する mlonRNA 転写部位の上流に存在する UAS1 転写因子結合領域での Atf1 の働きと酷似するため、この領域への移植を試みた。その結果、*ade6-M26* でも移植した mlon-Box からの新たな転写誘導がストレスや減数分裂時に見られることが判明し、この配列が他の遺伝子座においても機能し得ることがわかった。なお、この誘導には *M26* 変異が必須であり、Atf1 との共同的作用で転写誘導がなされることが示唆された。

5: mlonRNA 転写に必要な転写因子

4 の研究で、mlon-Box は *fbp1* 遺伝子座以外でも機

能し得ることや、Atf1 との共同で転写誘導する実態が明らかとなった。他の転写因子との連携についても検討するため、移植した *mlon-Box* 上流の *M26* 変異を変化させて他の転写因子結合部位に変化させる実験を行った。その結果、Atf1 以外の Rst2 や Php5 などの転写因子が結合する配列でも同様に *mlon-Box* からの転写がストレス依存的に起こることがわかった。

6: *mlonRNA* 転写に共役したクロマチン再編成の減数分裂期組換え誘導での機能

mlonRNA 転写によるクロマチン再編成制御を介して、*fbp1* 遺伝子座では転写制御がなされていることが知られている(Hirota *et al.* 2008)。それでは、転写制御以外のゲノム機能の調節にも関与するのだろうか? 4, 5 の研究で *mlon-Box* は *ade6* 遺伝子座でも機能し、Atf1 などの転写因子との共同で転写誘導する実態が明らかとなった。*ade6-M26* は減数分裂期の組換え部位となることが知られている。そこで、*mlon-Box* の移植による組換えへの影響について調査した。その結果、*mlon-Box* 挿入細胞では変異して機能しない *mlon-Box* を挿入した細胞(対照細胞)と比べ、有意に高い組換え価を示すことが明らかとなった。減数分裂の誘導において、初期に組換え領域を決定する重要なイベントは、染色体 DNA への 2 重鎖切断の誘導である。この誘導は Spo11 (分裂酵母では Rec12) と呼ばれる蛋白質による DNA の切断反応によるものである。*mlon-Box* の挿入部位近傍に対照細胞に比べ有意に高いレベルの DNA 2 重鎖切断がされているとともに、高いレベルの Spo11 の結合が見られることがわかった。この事実から、*mlonRNA* 転写に共役したクロマチン再編成は転写のみならず、減数分裂期組み換えの制御にも関わり得ることが示唆され、広範なゲノム機能の調節に重要な働きを持つ可能性が浮上した。

7: 天然の *mlon-Box* の転写や減数分裂期組換えの制御での機能の可能性のゲノム情報学的解析

6 の研究で、*mlonRNA* 転写に共役したクロマチン再編成は広範なゲノム機能の調節に重要な働きを持つことが示唆された。そこで、分裂酵母ゲノムに天然に存在する *mlon-Box* を調査した。その結果、*mlon-Box* は転写開始部位や減数分裂期組換え部位と、有意にオーバーラップしていることが判明した

(Figure 1, 2)。このゲノム情報学的解析により特定した、天然の *mlonBox* を有する減数分裂期組換え領域の、SPBC24C6.09C では、*mlon-Box* に依存して減数分裂期に転写が誘導されていることや、*mlon-Box* を変異により不活性化すると、減数分裂期 DNA 2 重鎖切断が導入されなくなることが判明した(Figure 3)。これらの事実から、*mlonRNA* 転写によるクロマチン再編成機構は、分裂酵母ゲノムの転写や組換えといった、ゲノム機能の調節に重要な働きを持つことが示唆された。

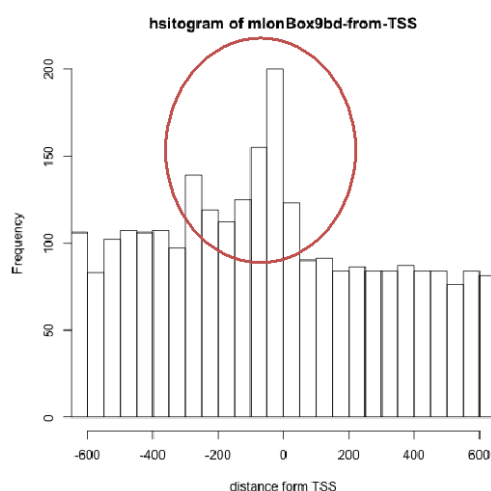


Figure1 The histogram showing relationship between *mlon-Box* and TSS (Transcription start site). Distance from TSS was indicated in X-axis (bp), while number of *mlon-Box* was indicated in Y-axis.

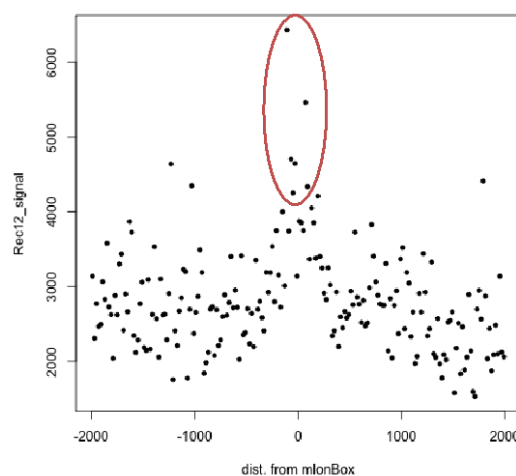


Figure2 The dot-plot showing relationship between *mlon-Box* and Rec-12-flagment (meiotic recombination site). Distance from *mlon-Box* was indicated in X-axis (bp), while number of rec12-flagment was indicated in Y-axis.

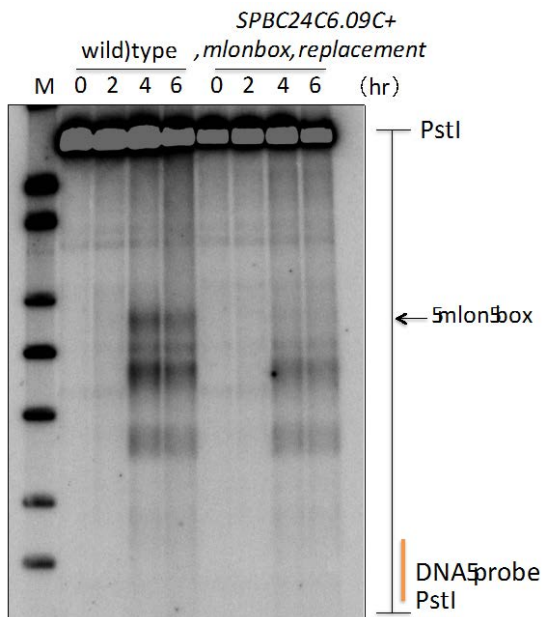


Figure3 DNA double strand breaks are induced meiotically around mlon-Box.

考察

本研究では、申請者が独自に分裂酵母 *fbp1* 遺伝子座において発見したプロモーター非コード RNA である *mlonRNA* のクロマチン再編成誘導での分子機構の一端と、*fbp1* 遺伝子座以外での普遍的な機能について解明した。本研究により、*mlonRNA* 転写によるクロマチン再編成が、転写開始部位からの限られた領域のみで起こることがわかった。このことから、転写開始複合体がプロモーターから乖離して転写開始するクリアランス過程において、クロマチン再編成が誘導されている可能性が考えられる。*mlon-Box* は TATA ボックスとは異なる配列を有するとともに、このように通常の mRNA 転写開始とは異なりクロマチン再編成を誘導することから、*mlonRNA* 合成開始複合体は既知の転写ユニットとは異なる複合体からなることが予想される。*mlon-Box* と相互作用する因子の系統的解析を今後行うことで、*mlonRNA* 転写と共役したクロマチン再編成機構の詳細を明らかにしたい。

本研究では、*mlonRNA* 転写によるクロマチン再編成現象が分裂酵母ゲノムの調節機能において普遍的に機能することが示唆された。上記の *mlonRNA* 転写開始複合体の系統的な解析で制御因子が特定できれば、動物細胞における相同因子の解析を行うこと

で、高等生物にまで本研究成果を展開できることが期待できる。

引用文献（参考文献）

1. Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, Murofushi H, Shibata T, Ohta K Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J* 23: 1792-803 (2004)
2. Hirota K, Mizuno K, Shibata T, Ohta K Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot *ade6-M26*. *Mol Biol Cell* 19: 1162-73 (2008)
3. Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K Stepwise chromatin remodeling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456: 130-4 (2008)
4. Adachi A, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K Interplay between chromatin modulators and histone acetylation regulates the formation of accessible chromatin in the upstream regulatory region of fission yeast *fbp1*. *Genes Genet Syst* 92: 267-276 (2018)
5. Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K lncRNA transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Sci Rep* 9: 299 (2019)

研究の発表

ポスター発表

1. 浅田隆大, 廣田耕志, 局所的ゲノム高次構造を介した転写因子の標的配列結合タイミング制御機構の解析, クロマチン動構造ワークショップ (北海道 2017 6 月)
2. 千松賢史, 廣田耕志, 長鎖 non-coding RNA 転写による クロマチン構造制御メカニズムの解明, クロマチン動構造ワークショップ (北海道 2017 6 月)
3. 千松賢史, 廣田耕志, metabolic stress-induced

lncRNA(mlonRNA) 転写によるクロマチン再編成は、転写と減数分裂期組換えを活性化する、染色体ワークショップ (愛知 2017 11 月)

4. Satoshi Senmatsu, Ryuta Asada, Arisa Oda, Charles S. Hoffman, Kunihiro Ohta and Kouji Hirota The novel *cis*-acting element for metabolic stress-induced lncRNA (mlonRNA) and meiotic recombination in fission yeast. 3R&3C Symposium (Kanazawa, Japan November, 2018)

口頭発表

1. 廣田耕志, 非コード RNA の転写開始によって誘導されるクロマチン再編成の転写や組換えにおける役割, 遺伝研研究会 (静岡 2017 10 月 2 日)
2. 千松賢史, 廣田耕志, metabolic stress-induced lncRNA(mlonRNA)転写はクロマチン再編成を誘導し、転写と減数分裂期組換えを活性化させる, 分子生物学会 (神戸 2017 12 月 7 日)
3. Ryuta Asada and Kouji Hirota, Transcriptional activation via “catch-and-release” translocation of transcription factor Rst2 between activation sites is

mediated by local higher-order genome structure., The 9th International Fission Yeast Meeting (カナダ 2017 5 月)

誌上発表

1. Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K lncRNA transcriptional initiation induces chromatin remodeling within a limited range in the fission yeast *fbp1* promoter. *Sci Rep* 9: 299 (2019)
2. Adachi A, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K Interplay between chromatin modulators and histone acetylation regulates the formation of accessible chromatin in the upstream regulatory region of fission yeast *fbp1*. *Genes Genet Syst* 92: 267-276 (2018)
3. Umeda M, Tsunekawa C, Senmatsu S, Asada R, Abe T, Ohta K, Hoffman CS, Hirota K Histone-chaperone *Asf1* is required for the establishment of repressive chromatin in *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene repression. *Mol Cell Biol* (2018)