

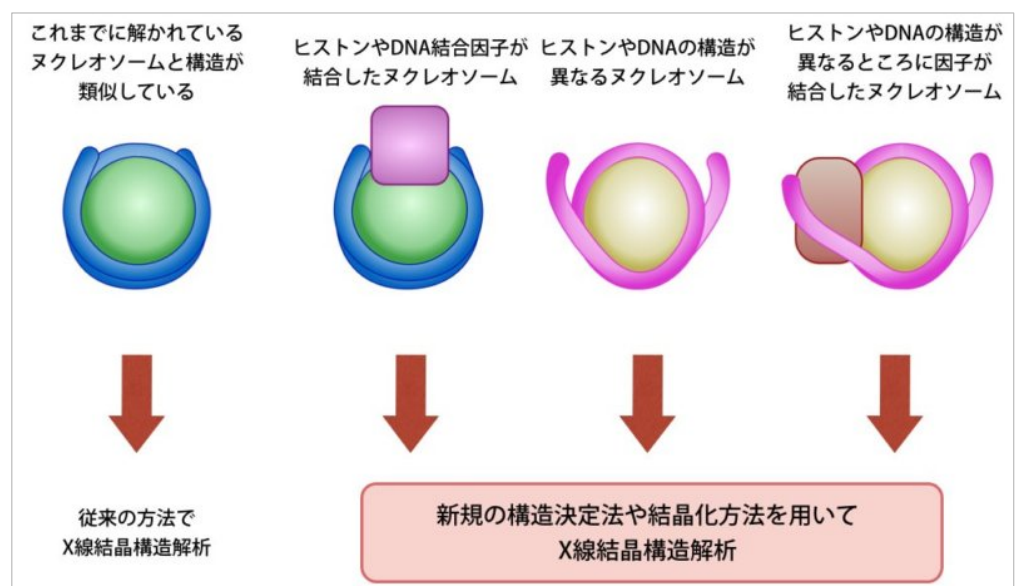
1. 公募研究の紹介：明星大学・香川 亘、国立遺伝学研究所・荒木 弘之
2. クロマチン動構造 第3回 領域会議の報告
3. 受賞：米田悦啓計画研究代表が紫綬褒章を受章しました。
4. 成果紹介：①齊藤(典)計画研究代表らの領域内共同研究による論文が、Nature Comm 誌に掲載されました。
 ②原口計画研究代表らの領域内共同研究による論文が、PNAS 誌に掲載されました。
5. 寄稿：オックスフォード大学・野島孝之
6. 今後の予定

1. 公募研究の紹介

【ヌクレオソームの多様な構造を解析する技術の開発】

研究代表者：香川 亘（明星大学 理工学部）

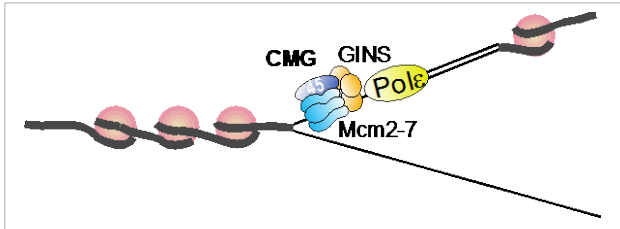
クロマチン構造のダイナミクスを研究する上で、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームに起こる構造変化を原子レベルで明らかにすることは重要な課題である。これを可能にしてくれる X 線結晶構造解析は、現在生体分子の立体構造を原子分解能で明らかにする最も強力な方法であるが、機能的な状態（構造）で生体分子を結晶化することは依然としてボトルネックとなっている。ヌクレオソームの X 線結晶構造解析については、これまでの研究により数多く報告されているが、そのほとんどが結晶中で同じ並び方をしており、ヌクレオソームの外側に巻きついている DNA が密にパッキングしている。近年、ヌクレオソームは、それを構成するヒストンと DNA、そして結合因子によって多様な構造を形成することが明らかになりつつある。本研究では、このような機能的で多様なヌクレオソーム構造やヌクレオソームとその結合因子との複合体の構造解析を、X 線結晶構造解析法を用いて行うための新たな結晶化方法や解析方法の開発を行っている。本研究を通じて、新たな構造解析技術を創出し、領域内で行われている様々な X 線結晶構造解析に役立てることができればと考える。



【DNA 複製フォークでのクロマチン構造維持機構】

研究代表者：荒木 弘之（国立遺伝学研究所）

染色体上のクロマチン構造は、DNA 複製時に確実に保持される。これは複製因子とクロマチン構造に関わる因子が協調して働き、複製時にクロマチン構造を維持しているためだと考えられているが、その詳細な機構は明らかではない。我々は、出芽酵母の *in vitro* DNA 複製系と精製タンパク質からなる再構成系を用いてこの問題に挑戦している。



DNA 複製がおこる複製フォークでは左図に示すように、ヘリカーゼが先頭になり DNA の 2 本鎖 DNA を 1 本鎖にほどく。真核生物の複製ヘリカーゼは、ヘリカーゼ活性のコアとなる Mcm2-7 ヘテロヘキサマーに Cdc45 タンパク質と GINS ヘテロヘキサマーが強く結合した Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体であり、リーディング

鎖の鋳型上を 3'→5'に移動する。我々は、ヘリカーゼとヌクレオソームの関係を調べるため、出芽酵母ヒストンからヌクレオソームを再構築し、精製した CMG 複合体を用いてヘリカーゼ活性を測定した。その結果、ヌクレオソームはヘリカーゼの活性を阻害することが分かった。これはリーディング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) を加えて DNA 合成を行わせても同様であった。次に、複製フォークにあることが知られているヒストンシャペロン yFACT を精製して加えたが効果はなかった。現在は、種々のヒストンシャペロンの効果とともに、*in vitro* 複製系でのクロマチン化した鋳型の挙動を調べており、複製フォークでのヌクレオソームの挙動の詳細が明らかになることを期待している。

2. クロマチン動構造 第 3 回 領域会議の報告

⇒北海道にも新緑の季節が訪れる 5 月に、7 日から 9 日の日程で、クロマチン動構造の領域会議が、北海道ルスツリゾートで開催されました。計画研究及び公募研究からの 72 名の参加に加えて、評価委員として森川耿右、柴田武彦、木村暁の各先生、および学術調査官として水品善之、嶋田睦の両先生に参加いただき、爽やかな森の空気のなかで領域会議が開始されました。領域代表の挨拶に続き、計画研究、公募研究あわせて 33 題の研究結果が報告されました。個々の研究内容については、ニュースレターや領域ホームページ、あるいは公表論文として追々紹介されるものと思いますが、全体的に見て、昨年度から大幅に領域内共同研究が増加していることと、論文として公表される本領域の研究が増えてきたことが印象的でした。すべての報告について、活発な質疑応答が行われたことは言うまでもなく、その質疑応答の中から新たな共同研究の芽が見出された報告も一つや二つではありませんでした。

領域会議第 2 日には、総括班会議が、総括班員その他、評価委員および学術調査官の先生方も参加して行われました。領域主催の集会として、第 3 回「クロマチン動構造」若手のワークショップ (2015 年 7 月 29 日、早稲田大学)、クロマチン動構造国際会議 (2015 年 8 月 23 日-26 日、淡路夢舞台国際会議場)、第 4 回班会議 (2016 年 7 月頃、北海道)、第 3 回一般公開シンポジウム (2016 年 8 月頃、東京) について、開催準備状況の報告や、開催に向けた意見交換などが行われました。評価委員の先生方には、本領域の活動の評価を願ひ、「領域内共同研究が上手く進んでおり、研究成果の論文としての公表も順調である」、「領域全体の連携や活性化が感じられる」、「ニュースレターなどの広報やアウトリーチが活発である」等、全体としてこれまでの活動について高い評価をいただきました。一方で、「多様な研究成果を普遍的原理に収斂させる努力」といった宿題もいただき、今後はこのような意識を持ちつつ領域活動を展開するの必要を感じました。また、今年度は本領域が中間評価の対象となることから、中間評価報告書やヒアリングについての準備状況の確認や、意見交換が行われました (中間評価に向けての具体的な対応は、領域会議終了後の総括班会議で

も行われました)。水品、嶋田両学術調査官には、総括班員の疑問に答える形で中間評価に関する有用な情報提供をいただきました。この場を借りて、感謝いたします。

研究成果報告や会議の合間には、コーヒープレーク、意見交換会、フリーディスカッションなどが、タイミング良く、かつ場所を変えてスケジュールされており、北海道のリゾート地の開放的な雰囲気と相まって、領域内メンバーのオープンな情報交換や若手の交流が大いに活性化されました。このような素晴らしい領域会議をオーガナイズしてくれた小布施班員と研究室メンバーに感謝します。



3. 受賞

米田悦啓計画研究代表が紫綬褒章を受章しました。紫綬褒章は、科学技術分野における発明・発見や、学術及びスポーツ・芸術文化分野において優れた業績を挙げた者に対して、天皇陛下から授与されるものです。

4. 成果紹介

① 齊藤(典)計画研究代表らによる論文が、Nature Communication 誌に掲載されました。これは、大川計画研究代表との領域内共同研究による成果です。

A cluster of non-coding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation

Tomita S, Abdalla MOA, Fujiwara S, Matsumori H, Maehara K, Ohkawa Y, Iwase H, Saitoh N, and Nakao M.

Nat. Comm. 6: 6966, 2015.

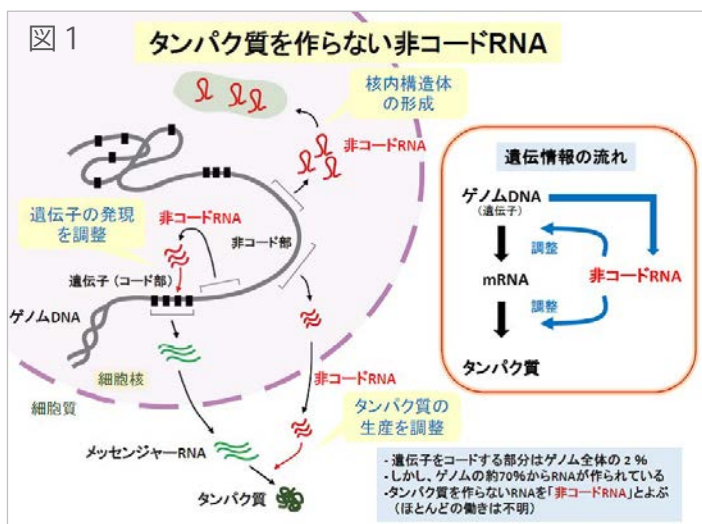
<http://www.nature.com/ncomms/2015/150429/ncomms7966/full/ncomms7966.html>

乳がんの増殖・発生には、女性ホルモンのエストロゲンと、エストロゲンの働きを介在するエストロゲン受容体 (ER) が鍵となります。乳がんの約 60~70%は ER を発現する、ER 陽性と呼ばれるタイプです。この種類の乳がん細胞はエストロゲンの存在下で増殖するので、エストロゲンを阻害するようなホルモン治療が有効です。しかし、ホルモン治療が長期にわたると乳がん細胞の性質が変化して、エストロゲンがない状態でも増殖できるようになり、疾患が頻繁に再発することが大きな問題となっています。この治療耐性の原因のひとつに、ER が過剰に発現されることが示唆されていましたが、詳細は不明で、しくみを理解することが再発防止への重要なステップになると期待されてきました。

ゲノム DNA には、mRNA へと転写されて将来タンパク質となるコード領域と、タンパク質をコードして

いない非コード領域があります (図 1)。近年まで非コード領域は、RNA に転写されることもなく、そこからタンパク質が産生されることもないため、存在意義が全く不明でジャンク (ガラクタ) DNA とよばれることもありました。

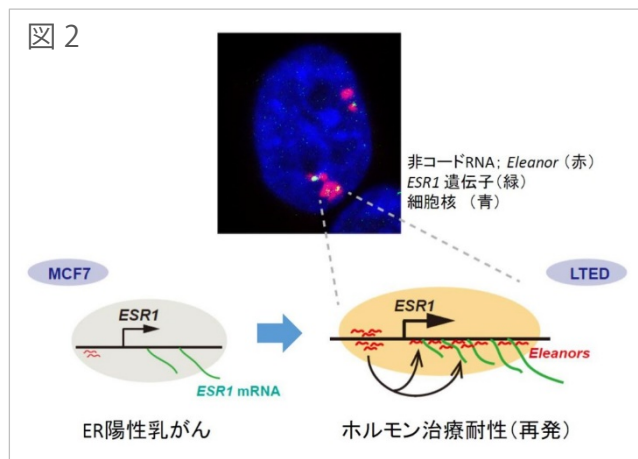
本研究グループは、ER 陽性乳がんのモデル細胞 MCF7 と、再発モデル細胞 LTED (Long Term Estrogen Deprivation) を使い、RNA-Seq と呼ばれる大規模塩基配列解析を駆使して、それぞれの細胞内で生産される RNA を網羅的に調べました。その結果 LTED 細胞では、ER をコードしている ESR1 遺伝子座からさ



かに mRNA が転写されるのと協調して、非コード領域から大量の RNA が産生されていることを発見し、この非コード RNA を Eleanor (エレノア) と命名しました。顕微鏡観察したところ、Eleanor は、細胞核内の ESR1 遺伝子が転写されている場からみつくように蓄積し、大きな RNA のかたまり (RNA クラウド) を種とする、新規の核内構造体を形成していました (図 2)。この Eleanor RNA クラウドは、ER 陽性の乳がん患者さん由来の標本でも顕著に観察されました。細胞内で Eleanor を作れないようにすると、ESR1 遺伝子の活性が減り、乳がん細胞は増殖できなくなりました。興味深いことに、ポリフェノール的一种であるレスベラトロールを細胞に投与すると、Eleanor の産生が抑えられ、それにより ER の産生が著しく低下し、同様に、乳がん細胞の増殖を停止させることができました。

本研究では、クロマチンに相互作用して転写活性な核内構造体を形成する非コード RNA、Eleanor を発見しました。さらに、非コード RNA を介した、新たな遺伝子の転写活性のメカニズムを明らかにしました。この成果は、難治性・再発性乳がんを攻略する鍵であるエストロゲン受容体の発現の機序を解明したことから、新しい診断および治療法の確立につながるものです。

本研究の内容は毎日新聞、熊本日日新聞、日刊工業新聞、産経新聞、NHK ニュース、KAB ニュース、RKK ニュース、日経電子版などで報道されました (H27. 4/29~5/8)。



② 原口計画研究代表らによる論文が、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌に掲載されました。これは、平岡公募研究代表との領域内共同研究による成果です。

BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to exogenous DNA avoiding autophagy.

Kobayashi S, Koujin T, Kojidani T, Osakada H, Mori C, Hiraoka Y, Haraguchi T.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112(22): 7027-7032, 2015

<http://www.pnas.org/content/112/22/7027.full.pdf?with-ds=yes>

細胞が、細菌感染やウイルス感染を受けた場合には、外から入ってきたそれらの“異物”を迅速に捉えて、適切に処理することが、その生存に極めて重要なことである。一方、遺伝子治療を行いたい場合や、効率よく遺伝子改変を行いたい場合には、用意した DNA を何らかの方法で細胞内に入れる必要がある。これまで、DNA が、細胞の外から細胞の内に入ってきた時に、細胞がどのように応答するかについては、ほとんどわかっていなかった。今回、我々は、数マイクロメートルの人工ビーズに DNA を結合させた DNA ビーズを細胞質内に入れ、その挙動を可視化することに成功した。細胞に侵入した DNA ビーズは、まず、酸性のエンドソームに取り込まれるが、その状態では、本当の意味で細胞内 (細胞質内: タンパク質が合成される場所) に入ったとは言えない。細胞質とは膜で隔たれたエンドソーム内に留まっているからである。我々は、DNA ビーズに、特殊な試薬 (環境の酸性度を蛍光の有無で識別できる試薬: pHrodoTM) を結合させ、その蛍光を経時的に観察することによって、DNA ビーズが酸性エンドソームから、中性の細胞質に入った瞬間を捉えることに成功した。DNA ビーズが細胞質内に入るとすぐに (秒のオーダーで)、細胞内に存在するバリアーツオートインテグレーションファクター (BAF) と呼ばれるタンパク質が、DNA に結合することを発見した。この解析により、BAF が、細胞質に侵入した DNA を捉える DNA センサー分子として働くことが初めて明らかになった。

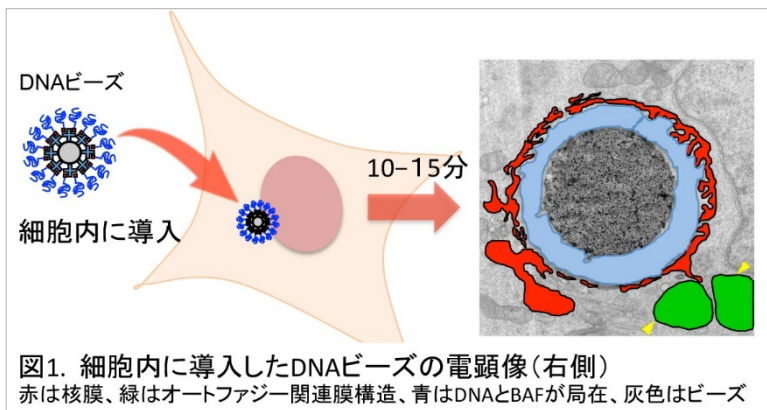
次に、DNA ビーズに BAF が集合すると、10-15 分程度で、ビーズ周辺に核膜に似た膜構造が形成されることが分かった (図 1)。ほぼ同時期に、オートファジー膜も、DNA ビーズ周辺に集まったが、核膜に似た膜が形成されたビーズでは、オートファジー膜はビーズを“喰う”ことはなく、次第になくなっていった。BAF の量を減少させた細胞では、このような効果 (BAF 集積による核膜形成と、その後のオートファジー膜回避) は見られなかった。これらの結果は、BAF 依存的に形成される核膜によってオートファジーが回避されることを示している。

今回の発見は、細胞内に入った DNA がどのような運命を辿るか、その最初の部分を解き明かしたものである。BAF は、クロマチン結合因子として知られ、ウイルス感染の際には生体防御システムとして働くと考えられている分子である。一方、オートファジーもまた、細菌感染の際に細胞内免疫として働くと考えられている。今回の研究からは、DNA が細胞質内に侵入した場合には、細胞は、オートファジーによる分解よりも、核膜で DNA を囲い込んで閉じ込めてしまうことを優先するということが分かったのである。

ウイルス感染を防ぐことを目指す場合には、人為的に外来 DNA を排除することが求められる。一方、遺伝子治療の場合には、人為的に外来 DNA を細胞核内に伝送することが求められる。いずれの場合であっても、

細胞の性質を正しく理解する必要がある。今回の研究成果は、細胞内のクロマチンの機能や構造の維持のメカニズムとして重要な知見を与えてくれるだけでなく、安全・安心な感染症治療・遺伝子治療、高効率な遺伝子デリバリーを実現する上で有用な知見を提供するものと考えられる。

本研究の成果は、毎日新聞、朝日新聞、日経産業新聞、日刊工業新聞、Yahoo!ニュースなど、多数の新聞・ネットニュースで報道されました。



5. 寄稿

次世代新生 RNA ワールドへ

オックスフォード大学サーウィリアムダン病理学研究所
野島孝之 (taka.nojima@path.ox.ac.uk)

Mammalian NET-seq reveals genome-wide nascent transcription coupled to RNA processing

Nojima T, Gomes T, Grosso AR, Kimura H, Dye MJ, Dhir S, Carmo-Fonseca M and Proudfoot NJ
Cell 161, 526-540, 2015

RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写は単純ではない。その一因として、Pol II 最大サブユニットのカルボキシル末端 (C-terminal domain, CTD) の生化学的性質が挙げられる。Pol II CTD は特徴的なリピート構造 YSPTSPS (ヒトでは 52 回、酵母では 26 回繰り返す) を有しており、転写サイクルにおいて複雑にリン酸化状態を変化させる (Heidemann et al., 2013)。そのリン酸化状態の変化は、試験管内反応やクロマチン沈降法を主とした多くの報告から、RNA プロセシング複合体をリクルートするために重要であると示唆されている (Moore and Proudfoot, 2009)。ただ、RNA プロセシングは RNA が転写されてすぐに起きると考えられており、その中間産物は非常に分解されやすいため、現存の方法ではその姿を正確に捉えることは困難であった。筆者は、転写と共役した RNA プロセシングを解析することを目標に、2013 年から解析系の開発を始めた。

近年の目覚ましい高速シーケンサーの発達により、多くの生物種の転写産物の情報が比較的簡単に手に入るようになってきた。しかしながら、多くの解析は安定的な転写産物を検出することを目的としており、今まさに転写されている RNA (新生 RNA) については情報が少なかった。新生 RNA の代表的解析方法としては、Lis らが開発した Global Run On sequencing (GRO-seq) (Core and Lis, 2008) やその改良法である Precision Run On sequencing (PRO-seq)

(Kwak et al., 2013) が挙げられる。これらは、培養細胞から核を単離し、修飾塩基と共に Run On 転写反応を行うことによって、新生 RNA を標識、精製する方法である。これらの方法により、Pol II は一時停止と解除を繰り返しながら遺伝子上を前進していることが明らかになっている。また、酵母では Native Elongating Transcript sequencing (NET-seq) 法が Weissman 研究室から報告されている (Churchman and Weissman, 2011)。NET-seq 法では、Flag タグが付加された Pol II サブユニットの ORF が酵母ゲノムに挿入されている株から、Flag 免疫沈降にて Pol II 転写複合体を単離することによって、複合体中の新生 RNA を一塩基レベルで調べることができる。

これら上記した反応系は、新生 RNA の動態を調べる方法として優れているが、CTD のリン酸化と共に調べることができない。理論的には、酵母 NET-seq 法に修飾 Pol II 抗体を適用し、様々な CTD リン酸化状態特異的な新生 RNA を見分けることができそうではあるが、どういうわけか Flag タグ抗体以外は用いることができない。しかも、哺乳類細胞を用いて NET-seq 法を確立した例は今までなかった。幸運にも筆者は、試行錯誤の末、哺乳類細胞用の NET-seq 法の開発に成功し、その方法を mammalian NET-seq (mNET-seq) 法と名付けることができた。

では、mNET-seq 法で何がわかるのか？ mNET-seq 法では、酵母 NET-seq 法同様、Pol II 複合体中の新生 RNA を一塩基の解像度で、転写方向特異的 (センス鎖/アンチセンス鎖) にマッピングすることができる。この方法の最も大きな利点としては、あらゆる Pol II 抗体が使えること、すなわち酵母 NET-seq 法で不可能であった、Pol II 複合体中に含まれる新生 RNA を CTD リン酸化状態特異的に区別できることである。驚いたことに、CTD リピートの 5 番目のセリン (S5) に対する抗体で mNET-seq 法を行うとエクソンの 3' 末端に一塩基ピークが検出される。詳細な解析により、このピークはスプライシングの中間産物であることがわかった。つまり、多くのスプライシングは転写と共役して起きており、中間産物である上流エクソンは CTD S5 のリン酸化によって転写複合体に保持されていることがわかった。

さらに、CTD リピートの 2 番目のセリン (S2) に対する抗体を用いると、転写終結点 (TES) 直後にピークが観察される。これは、我々が報告した転写終結のための Pol II 一時停止を支持している (Nojima et al., 2013; Skourti-Stathaki et al., 2011)。興味深いことに、ポリ A 付加複合体構成因子 (CPSF73, CstF64/CstF64 tau) をノックダウンすることにより、TES 直後のピークが減少し、転写終結障害 (Termination defect) が検出されるようになる。この結果から、ポリ A 付加複合体は正しく転写を終結させるため、Pol II の転写スピードを TES で遅く調節していることが示唆された。mNET-seq 法はこれらの他にも、マイクロ RNA 前駆体生合成のキネティクスや転写開始点における新生 RNA 代謝の新しいモデルを提唱した。ここではすべてで説明することができないので、筆者の論文を是非ご覧いただきたい。

今回の報告はオックスフォード大学の Nick Proudfoot 研究室とリスボン大学の Carmo-Fonseca 研究室の共同研究の成果である。筆者が解析系を立ち上げ、軌道に乗り始めた際にバイオインフォマティシャンが突然去った時は青ざめたが、Nick が主催した学会で Carmo と出会い、共同研究まで漕ぎ着けることができたのは非常に幸運であった。現在筆者は、今回の論文で報告することができなかった、転写と共役したスプライシング機構のより詳細な解析、その他のリン酸化 Pol II CTD (Y1P, T4P, S7P など) 特異的な新生 RNA プロファイルや分解されやすいノンコーディング RNA の発現制御などを中心に解析しているところである。mNET-seq 法により、今まで覗くことができなかった、Pol II CTD コードが織りなす新生 RNA ワールドへの扉は今開かれたばかりである。mNET-seq 法が新生 RNA 研究のスタンダードとなり、未だに謎多き哺乳類遺伝子発現の全貌を明らかに出来る日を楽しみにしている。

References

- Churchman, L.S., and Weissman, J.S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature* 469, 368-373.
- Core, L.J., and Lis, J.T. (2008). Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 319, 1791-1792.
- Heidemann, M., Hintermair, C., Voss, K., and Eick, D. (2013). Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta* 1829, 55-62.
- Kwak, H., Fuda, N.J., Core, L.J., and Lis, J.T. (2013). Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science* 339, 950-953.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.
- Nojima, T., Dienstbier, M., Murphy, S., Proudfoot, N.J., and Dye, M.J. (2013). Definition of RNA polymerase II CoTC terminator elements in the human genome. *Cell Rep* 3, 1080-1092.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol Cell* 42, 794-805.



図. mNET-seq 法 の 概 念

mNET-seq 法は特定の Pol II 抗体を用いることにより、特定のリン酸化 CTD Pol II 複合体に含まれる新生 RNA を単離することが出来る。オレンジの浮き輪が着いた船はリン酸化 CTD 抗体ピーズ、オレンジのドットが付いた黒い魚はリン酸化 CTD 複合体、赤線は新生 RNA を表している。S、転写開始点、E、転写終結点

6. 今後の予定

① 第25回 細胞生物学ワークショップ

蛍光顕微鏡トレーニングコース1-初級から中級-

7月27-31日(月-金) 国立研究開発法人 情報通信研究機構 未来ICT研究所

(オーガナイザー: 原口 徳子、平岡 泰 講師: 木村 宏)

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/workshop/25workshop.pdf

② 第3回 クロマチン動構造 若手の会 ワークショップ

クロマチン研究最前線 -海外での研究生活で学んだことを活かして-

7月29日(水) 早稲田大学 先端生命医科学センター TWIns

<http://nucleosome.kyushu-u.ac.jp/workshop/20150729.html>

③ クロマチン動構造国際会議

“Chromatin Structure, Dynamics, and Function”

8月23-26日(日-水) 淡路夢舞台国際会議場

<http://www.knt-ec.net/2015/iscsdf/>

演題登録×切: 7月17日(金) ※延長しました

参加登録×切: 7月31日(金)

Overseas invited speakers:

Frederic Berger (GMI, Austria)

Kerstin Bystricky (Univ. Toulouse, France)

Philippe Collas (Univ. Oslo, Norway)

Jessica Downs (University of Sussex, UK)

Roland Foisner (MFPL, Austria)

Peter Fraser (Babraham Inst., UK)

Martin W. Hetzer (Salk Inst., USA)

Anthony Imbalzano (Univ. Mass, USA)

Joachim Lingner (EPFL, Switzerland)

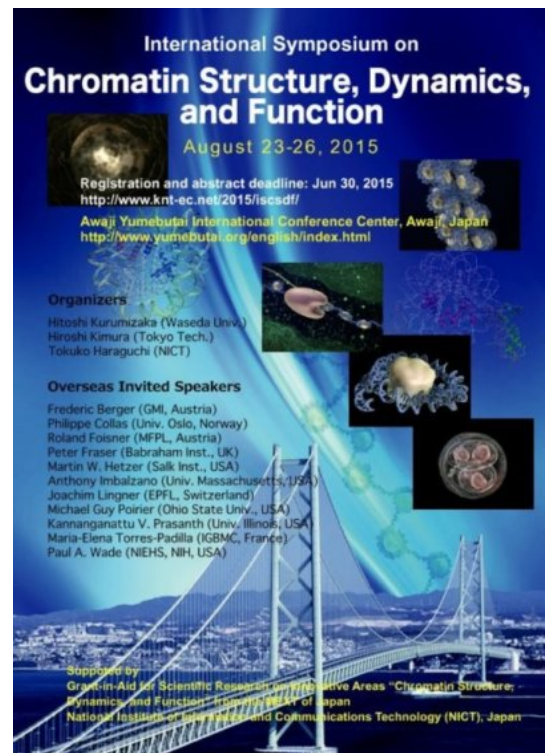
Michael Guy Poirier (Ohio State Univ., USA)

Kannanganattu V. Prasanth (Univ. Illinois, USA)

Timothy J. Stasevich (Colorado State University, USA)

Maria-Elena Torres-Padilla (IGBMC, France)

Paul A. Wade (NIEHS, NIH, USA)



④ Chromatin and Epigenetics -Dr. Robert T. Simpson memorial meeting-

8月29日(土) 早稲田大学 先端生命医科学センター TWIns

http://www.eb.waseda.ac.jp/kurumizaka/memorial_meeting15-2.html

講演者: Paul Wade, Kerstin Bystricky, 網代 廣三, 清水 光弘, 木村 宏, 胡桃坂 仁志

編集後記: 梅雨の季節となりましたが、皆様いかがおすごでしょうか。私は高い湿度のせいか、筆の進みも湿りがちです。。。第3回領域会議や中間報告用の書類作成では、皆様には大変お世話になりました。国際会議もよろしくお願ひします(演題登録は、まだ間に合います!)

Hiki