

研究終了報告書

「ゲノム構造化を司るインシュレーターの動的な転写制御機構の解明」

研究期間：2021年10月～2022年8月

研究者：余越萌

1. 研究のねらい

近年の Hi-C に代表されるクロマチン相互作用解析法によって、ゲノムは Topologically Associating Domain (TAD) と呼ばれるループ構造を基本単位として緻密に折り畳まれていることが理解されてきた。ゲノムの空間的な構成は、転写、複製、DNA 修復などの核の基本的なプロセスに影響を与えていると考えられており、ゲノムの三次元的な組織化を形成するメカニズムを理解することは非常に重要である。実際にゲノム構造の大黒柱として存在するインシュレーターは、種を超えたゲノム構造の中心的な構成要素の一つである。しかし、「ゲノム構造は遺伝子発現にとってどこまで重要なのか？」という問いについて明解な答えは未だ無く、ますますゲノム構造やインシュレーターと転写活性化の因果関係に対する理解は混乱を極めている。この問題の根本的な要因は、ゲノムがダイナミックに変動する構造体であるにも関わらず、これまでスナップショット的な解析や、均一ではない培養細胞から出された平均的な状態を算出していたためであると考えた。本研究では、TAD の境界に存在するインシュレーターに焦点を当て、ゲノム構造形成のダイナミクスを1細胞でリアルタイムに測定し、ゲノム構造変化が転写のアウトプットに与える影響を個体レベルで可視化できる新たな定量的計測システム技術の開発を試みる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、ゲノム構造化に欠かせないインシュレーターとその結合タンパク質に着目し、ゲノム構造のダイナミクスと転写活性の因果関係を1細胞かつ時間情報を含めた四次元で定量化する技術の構築を目指した。そのために、まずゲノムはどの程度ゆらいでいる存在なのか、つまりインシュレーターによる構造化のダイナミクスと転写反応の不連続性はどのように共鳴しているのかという定量的理解のために、MS2/PP7 多色ライブイメージングによるゲノム構造モニタリングシステムを開発した。共焦点顕微鏡でのライブイメージング解析の結果、ハエゲノムに導入した全長約 25 kb の人工遺伝子システムにおいて、挿入した2つのインシュレーターが相互作用することでループが形成されたことを示唆する転写アウトプットを確認した。また、インシュレーターの位置を変えることで、ゲノム構造がダイナミックに変化していることを示す転写活性アウトプットも確認された。さらに、インシュレーター配列の種類を変えると、配列特有の遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなり、配列の違いでループ形成能力が大きく異なる可能性が示唆された。また、インシュレーター結合タンパク質にも焦点を当て、転写制御機能解析のためのテザリングシステムの構築を行なった。代表的な5種類のインシュレーター結合タンパク質を人工レポーター遺伝子に結合させたとこ

る、特定のモチーフ配列をもつインシュレーター結合タンパク質が転写活性を制御していることを新たに見出した。

(2) 詳細

○ 研究テーマ A 「MS2/PP7 多色ライブイメージングによるゲノム構造モニタリングシステムの開発」

TAD の内側と外側でそれぞれの遺伝子の構造変化による転写活性変化を可視化するため、バクテリオファージ由来の MCP/PCP タンパク質と RNA ステムループ MS2/PP7 間の特異的なタンパク質-RNA 相互作用を利用した多色イメージング法を開発した。インシュレーター配列には、ハエ初期胚発生に必須な *eve* 及び *fushi tarazu (ftz)* の遺伝子座に存在するインシュレーターを採用した。マイクロインジェクションによりレポーター遺伝子を発現するショウジョウバエ系統を作出し、初期胚発生過程における転写活性を1細胞レベルでイメージング解析を行なった。その結果、2つのインシュレーター同士が相互作用することでループが形成されたことを示唆する転写アウトプットを確認した。また、インシュレーターの位置を変えることで、ゲノム構造がダイナミックに変化していることを示す転写活性アウトプットも確認された。よって、本システムはゲノム構造モニタリングシステムとして応用可能であり、開発に成功したと考え、現在、これら2つのインシュレーターの組み合わせにおいて、どの程度構造変化の頻度や転写活性化能力が異なるのか解析中である。

○ 研究テーマ B 「インシュレーター結合タンパク質の転写制御機能解析のためのテザリングシステムの構築」

ショウジョウバエは、ヒトでは未発見のインシュレーター結合タンパク質が多数存在することが知られているが、転写制御を指揮するマスター因子は決定されていない。そこで、その中でも高密度の顆粒構造を形成することが報告されている5種類のインシュレーター結合タンパク質に着目し、各因子の転写制御機能を定量するために、酵母由来の GAL4-UAS 系による人工的に遺伝子レポーターにテザリングできるシステムを創出した。その結果、特定のドメインをもつインシュレーター結合タンパク質が転写活性を大きく減少させる機能をもつことを発見した。現在はそのドメインを削った変異体を作成中であり、同様の実験を行うことで、重要な機能性配列であるどうか検討中である。

3. 今後の展開

インシュレーターDNA の配列の違いによって、転写のアウトプットが大きく異なることから、今後は、結合タンパク質の違いを考慮しつつ、ループ形成能力についてより詳細な定量解析を行っていく予定である。

4. 自己評価

私的な都合で10ヶ月という短い研究期間となってしまったが、発案していた人工遺伝子コンストラクトを全て作製できたことで、インシュレーター配列やその結合タンパク質の違いにより、ゲノム構造化ダイナミクスと転写活性化能が大きく異なることが示唆されるデータを得ることが

できた。よって、研究のスケジュールでは想定通りかそれ以上進めることができたと考えている。将来的には、より詳細な定量解析を行うことで、論文として発表することが可能であると考えており、ぜひ実現させていきたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. **Moe Yokoshi**, Koji Kawasaki, Manuel Cambón, Takashi Fukaya. Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Research*. 2022, 50(1), 92-107

転写制御におけるコアプロモーターの働きを生きたハエ初期胚において直接可視化するライブイメージング技術を開発した。詳細な定量画像解析の結果、エンハンサーとは独立して、コアプロモーター自身も転写バーストの制御において重要な役割を担うことを新たに見出した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living *Drosophila* embryos, 第44回日本分子生物学会年会(日本, 横浜), 2021/12/1