

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07287

研究課題名（和文）ゲノムDNAを鋳型とする試験管内遺伝子転写系を用いた新奇SOX2複合体の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel SOX2 complex using in vitro gene transcription system employing genomic DNA as template

研究代表者

中川 武弥（NAKAGAWA, Takeya）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・助教

研究者番号：50363502

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：SOX2はiPS細胞の作製に用いる遺伝子の一つである。その機能の理解は再生医療への貢献が期待される。本研究課題では、我々が発見したSOX2タンパク質複合体の機能解析を行った。複合体に含まれるタンパク質の中から特に遺伝子の転写調節にとって重要な遺伝子であるTBPに着目した。試験管内で人工的に遺伝子転写を再現する実験手法を用いることにより、SOX2とTBPが協調してリボソームRNAの転写を活性化することを明らかにした。SOX2とTBPはゲノム上のリボソームRNA転写制御領域の構造変化を引き起こすことも明らかにした。これらの成果より、SOX2はリボソームRNAの転写を制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の分化を人工的にコントロールし、例えば心筋細胞、脳神経細胞、肝細胞など疾患の治療に利用できる細胞を作製することは国民の健康維持のために非常に有益だと考え得る。本研究課題では細胞の分化を抑える役割を担う遺伝子であるSOX2の機能の一部を明らかにした。このような細胞分化のコントロールに関する知見を積み重ねていくことが、将来的な細胞や臓器を再生し移植する再生医療の実現へと繋がって行く。

研究成果の概要（英文）：SOX2 is one of the genes used to generate iPS cells. Understanding its function is expected to contribute to regenerative medicine. In this project, we performed a functional analysis of novel SOX2 complex. Because TBP is an important gene for gene transcriptional regulation, we focused on TBP among proteins included in the SOX2 complex. We demonstrated that SOX2 and TBP cooperatively activate transcription of ribosomal RNA by using an experimental method that reproduces gene transcription in vitro. It was also revealed that SOX2 and TBP cause structural changes in the region of ribosomal RNA gene transcriptional regulation on the genome. These results revealed that SOX2 regulates ribosomal RNA transcription.

研究分野：生化学

キーワード：遺伝子転写 細胞分化 クロマチン 細胞の初期化 iPS細胞 再生医療 リボソームRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SOX2 は iPS 細胞作製に使われる転写因子、山中 4 因子の一つである。SOX2 は幹細胞特異的な遺伝子の発現を活性化することにより多能性の維持を行っていると考えられているが、クロマチンレベルでの詳細な転写制御のメカニズムは不明な部分が多い。我々は SOX2 が複合体を形成することにより協調して働いている因子を同定し、その因子の持つ機能を手掛かりとしてこの点を明らかにしようと試みた。マウス E14 ES 細胞株で SOX2 の強制発現を行い、Flag-Tag、HA-Tag を用いて SOX2 と共に複合体を形成するタンパク質を精製した。質量分析の結果、TBP が SOX2 と複合体を形成することを明らかにした。TBP は基本転写因子の TFIID のサブユニットであり、RNA Polymerase II の転写開始複合体を形成する。SOX2 - TBP 複合体には TBP 以外の TFIID サブユニットは含まれていないことから、複合体中の TBP は基本転写因子とは異なる機能を果たしていると考えられた。

2. 研究の目的

全ゲノム DNA を鋳型とする試験管内遺伝子転写法を確立し、この方法を用いて SOX2 複合体の標的遺伝子の同定とその転写制御機構の解析を行う。既に SOX2 が基本転写因子 TFIID のサブユニットである TBP と複合体を形成することを明らかにしている。この複合体の機能解析を生体内で行うには困難を伴う。そこで当研究課題では試験管内遺伝子転写法をゲノム全体を鋳型とできるように改良し、SOX2 - TBP 複合体の標的遺伝子の同定と転写制御機構の解析を行う。

3. 研究の方法

SOX2-TBP 複合体の標的遺伝子の同定とその転写制御のメカニズムを明らかにするために以下の実験を行った。

- (1) 全ゲノム DNA を用いて作製したクロマチンを鋳型とする試験管内遺伝子転写産物の、次世代型シーケンサーによる解析法の確立。
- (2) 全ゲノム DNA からの試験管内遺伝子転写産物を次世代型シーケンサーで解析することにより、SOX2-TBP 複合体により転写活性化される標的遺伝子の同定。
- (3) SOX2-TBP 複合体標的遺伝子転写へのクロマチン構造変化の影響の解析。
- (4) in vivo の実験で得られた成果の in vitro での確認。

4. 研究成果

SOX2-TBP 複合体の標的遺伝子を同定するために、全ゲノム配列を鋳型とした試験管内遺伝子転写法を確立した。ゲノム DNA は HeLa 細胞から抽出したものを用いた。このゲノム DNA から HeLa のコアヒストン、NAP-1、ACF を用いてクロマチンの再構築を行い、試験管内遺伝子転写に利用した。転写に必要な RNA ポリメラーゼや基本転写因子は HeLa の核抽出液で補った。転写の際には基質として BrUTP を混合し、転写終了後に抽出した RNA から抗 BrdU 抗体に特異的に結合する試験管内で合成された新生 RNA を精製し、抽出液中の細胞由来の RNA の除去を行った。精製した RNA から次世代型シーケンサーで解析するためのライブラリー作製を試みた。適切なサイズへの RNA 切断が困難であると予想していたが、切断時間の調節を行うことにより解決することができた。作製したライブラリーを用いて次世代型シーケンサーによる解析を行ったが、SOX2 を加えたことによる既知の遺伝子の転写活性化を確認する事ができなかった。用いたレコンピナント SOX2 タンパク質が何らかの理由で活性を失っていた可能性と、HeLa 細胞の核抽出液は、通常未分化細胞で働く SOX2 による標的遺伝子の転写活性化に適していなかった可能性が考えられる。SOX2 の標的遺伝子の同定に用いることはできなかったが、全ゲノム DNA からの遺伝子転写を検出する事は出来ており、今後様々な遺伝子の転写制御機構解析への応用が期待できる。

試験管内の実験により SOX2-TBP 複合体の標的遺伝子を同定することはできなかったが、同時に行った in vivo のデータを解析することにより標的遺伝子の同定を試みた。すでに報告されている利用可能な SOX2 と TBP の ChIP-seq のデータを解析した結果、この二つはリボソーム RNA (rRNA) の転写調節領域に共局在していることが明らかになった。そこで SOX2-TBP 複合体の rRNA 転写制御への関与を確認する為に、試験管内遺伝子転写法を利用した。rRNA 転写調節領域を含むプラスミド DNA を作製し、クロマチン再構築したものを鋳型としての HeLa 核抽出液による転写量をリアルタイム RT-PCR 法で定量した。その結果、SOX2 と TBP が協調し rRNA の転写を活性化することを明らかにし

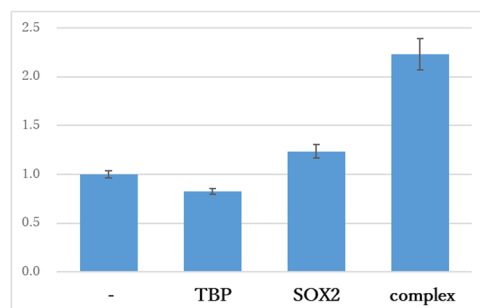


図 1
rRNA の試験管内遺伝子転写を RT-qPCR で定量。SOX2-TBP による転写促進が観測された

た(図1)。この転写活性化は SOX2 および TBP 単独では見られない。

SOX2-TBP 複合体による rRNA 転写活性化のメカニズムを明らかにするために、クロマチン構造への影響を解析した。試験管内で rRNA 転写調節領域を含むプラスミド DNA を用いてクロマチンを作製し、SOX2-TBP 複合体を加えた際のクロマチン構造の変化をマイクロコッカルヌクレアーゼによる DNA 切断パターンの変化として検出しようと試みた。その結果、SOX2-TBP を加えることによる rRNA 転写調節領域のクロマチン構造の再構築が確認された(図2)。このクロマチン再構築も SOX2 および TBP 単独では見られない。

今回得られた成果から、SOX2 と TBP が協調して rRNA 転写調節領域のクロマチン構造の再構築を行い、その結果 rRNA の転写が活性化されるという制御機構がモデルとして浮かび上がる。リボソームはタンパク質合成装置であり、その多寡は細胞の活動レベルに大きな影響を与える。RNA ポリメラーゼ による rRNA 転写はリボソーム量、ひいてはタンパク質合成能を決定する重要なプロセスである。未分化な胚性幹細胞(ES 細胞)では rRNA の転写が活発であるが、細胞分化が開始される際には rRNA の転写抑制が起こる。この転写抑制は必須であり、阻害されると細胞の分化は開始されない。この様に rRNA の転写調節は細胞分化制御に大きな影響を与えている。また、増殖の盛んな癌細胞はより多くのタンパク質合成を必要とするため、rRNA の転写が亢進されている。この癌細胞のリボソーム要求性の高さを利用したリボソーム合成阻害によるがん治療の可能性が探られている。rRNA 転写異常は癌以外の疾患でも報告されている。このようにリボソーム量の変化は分化の開始や癌化という細胞の運命を大きく転換する際に起こっている。従って rRNA 転写及びリボソーム形成制御機構の解析は、個体発生や癌の悪性化の仕組みをより深く理解するために重要である。rRNA の転写制御に関しては長年研究が進められており、基本的な転写制御のメカニズムに関する知見は深まっている。近年ではヒストン修飾によるクロマチン構造変化の重要性や、non-coding RNA を介した転写抑制システムの存在が明らかになっている。しかしながら状況に適した rRNA 合成量調節の主役となり得る個別の転写因子に関する知見がまだ十分に得られていなかった。我々の研究により SOX2 という転写因子が TBP と協調して rRNA の転写を活性化することがそのメカニズムも含めて明らかになった。この成果は関連疾患の病態解明、治療法の開発にとっても重要な一歩となり得るものである。

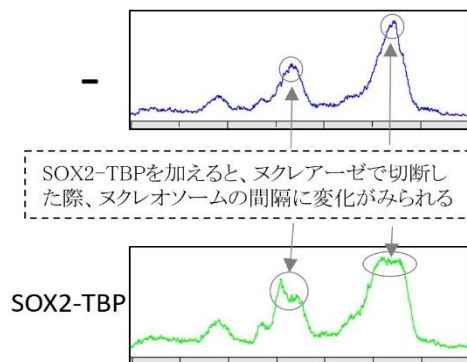


図2
rRNA 転写調節領域の DNA 切断パターンのプロファイル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasui Kiyoshi, Izumida Mai, Nakagawa Takeya, Kubo Yoshinao, Hayashi Hideki, Ito Takashi, Ikeda Hiroaki, Matsuyama Toshifumi	4. 巻 501
2. 論文標題 MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 833～837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.04.159	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 Maeda Katsutoshi, Yoneda Mitsuhiro, Nakagawa Takeya, Ikeda Kazuhiro, Higashi Miki, Nakagawa Kaori, Miyakoda Mana, Yui Katsuyuki, Oda Hiroaki, Inoue Satoshi, Ito Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Defects in centromeric/pericentromeric histone H2A T120 phosphorylation by hBUB1 cause chromosome missegregation producing multinucleated cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 828～838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12630	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 Kato M, Yoneda M, Takeshima Y, Amatya V, Higashi M, Nakagawa T, Ito T	4. 巻 62
2. 論文標題 The MAP3K2-ERK5 pathway upregulates cyclin D1 expression through histone H2A (Thr120) phosphorylation by VRK1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta medica Nagasakiensia	6. 最初と最後の頁 15-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakagawa Takeya, Yoneda Mitsuhiro, Higashi Miki, Ohkuma Yoshiaki, Ito Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancer function regulated by combinations of transcription factors and cofactors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 808～821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12634	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 Higashi Miki、Yoneda Mitsuhiro、Nakagawa Takeya、Ikeda Masaaki、Ito Takashi	4. 巻 511
2. 論文標題 miR-222 regulates proliferation of primary mouse hepatocytes in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 644 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.093	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	今村 優子 (IMAMURA Yuko) (50610937)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	