

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14632

研究課題名(和文) PML bodyによる新規雄性遺伝子群の転写制御メカニズムと生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Uncovering the role of PML bodies in transcription of male specific genes

研究代表者

栗原 美寿々 (Mori, Misuzu)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特別研究員)

研究者番号：40763074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内構造体の1つであるPML bodyは遺伝子転写制御の場として働くと考えられている。しかし、PML bodyのターゲット遺伝子及び、転写制御機構はほとんど明らかになっていない。本研究はPML bodyの近傍微小空間を生きた細胞内で特異的にラベルし、そこに含まれるクロマチンを分離精製するための新規技術「ALaP(APEX mediated Chromatin Labeling and Purification)法」を開発し、PML bodyが雄性遺伝子群の転写を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、遺伝子の転写制御の研究は、シグナリングや転写因子、エピジェネティクスなどを含むクロマチン構造に焦点をあて行われてきた。しかし、クロマチン構造の解析だけでは、すべての転写制御の仕組みを解明することはできない。本研究によって、転写制御における役割が未解明であった核内ボディによる転写制御メカニズムが明らかになったことで、転写制御分野の更なる発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：PML body is one of nuclear domains and considered to regulate gene expression. However, its role in transcription remains unclear. By developing a new technology “ALaP (APEX mediated Chromatin Labeling and Purification)”, which enables us to identify the interactions between PML body and chromatin, we uncovered that PML body activates transcription of male specific genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内構造体 PML body 遺伝子転写制御 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内では、クロマチンの空間的な分布がダイナミックに変化することによって、機能的な核内ボディ(PML body、核小体、核スペックルなど)とクロマチンとの相互作用が生み出される。「核内ボディとクロマチンの相互作用」は、遺伝子の転写を制御する重要な要素の一つとして考えられているが、その詳細は不明である。

PML body は球状の構造体で、細胞のガン化やアポトーシスなどに関与することが示唆されている。また、その構成因子には多くのクロマチン関連因子が含まれていることから、遺伝子転写制御の場としても働くと考えられている。しかし、PML body が具体的にどのような遺伝子をどのように制御しているのかはほとんど明らかにされていない。本研究は PML body の近傍微小空間を生きた細胞内で特異的にラベルし、そこに含まれるクロマチンを分離精製するための新規技術「ALaP (APEX mediated Chromatin Labeling and Purification)法」を開発することで、PML body の転写制御における役割を解明した。

2. 研究の目的

ALaP-seq によって PML body と相互作用するゲノム領域を明らかにすることで、PML body が転写を制御する遺伝子を見出し、その制御メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

APEX は、細胞内においても強い酵素活性を有する改変型ペルオキシターゼタンパク質である[Rhee *et al.*, Science, 2013]。APEX を目的タンパク質と融合させ、基質である Biotin-Phenol と反応させると、APEX のペルオキシターゼ活性により Biotin のラジカル化が起こる。ラジカル化された Biotin は、目的タンパク質の近傍ナノ空間内(半径~20nm)に存在するタンパク質や RNA と共有結合する(図1)。本技術の最大の特徴は、相互作用の強度に関わらず、目的タンパク質の近傍空間に局在する因子を生きた細胞内でビオチンラベルできることである。従って、生体内での「リアル」な相互作用を明らかにすることができる。我々は APEX 技術を次世代シーケンス解析と組み合わせることにより、核内構造体と相互作用するゲノム領域をゲノムワイドに同定することに成功した。

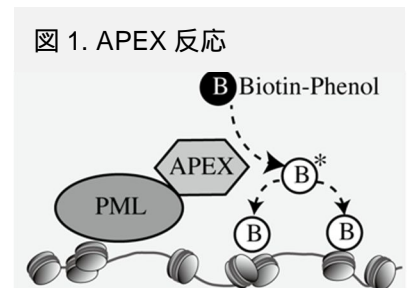


図 1. APEX 反応

4. 研究成果

我々は、ALaP 法によって分離精製したゲノムDNA を次世代シーケンス解析することで、PML body と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定した。その結果、PML body が Y染色体の短腕領域(Yp)と相互作用することを新たに見出した(図2)。さらに、野生型ES 細胞とPML body 欠損ES 細胞(PML ノックアウトES 細胞)を用いたRNA-Seq の結果、Yp 上のクラスター化した6 つの遺伝子群の発現がPML body 欠損細胞において著しく減少していることを明らかとした(図3)。これらの結果から、PML body はYp 領域と相互作用することで、クラスター化した遺伝子群の転写を活性化する可能性が示唆された。そこで、その転写制御メカニズムに迫るため詳細に解析を行った結果、PML body 欠損によってクラスター化した

図 2. PML body と相互作用する Yp 遺伝子

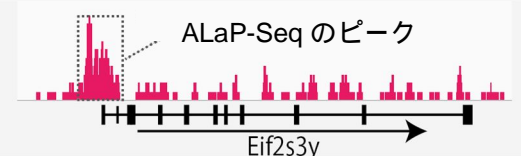
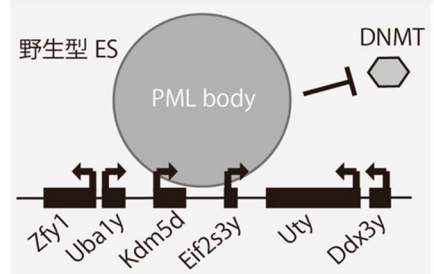


図 3. PML body は Yp 上のクラスター化した遺伝子群の転写を制御する



遺伝子群のDNA メチル化レベルが大きく上昇していることが判明した。更に、野生型の細胞において、DNA メチル化酵素の1つであるDNMT3A がPML body から排除されること明らかにした。DNMT3A を欠いた細胞では、PML body を欠損させてもクラスター化した遺伝子群の転写は全く抑制されなかったことから、PML body はYp 領域と相互作用することでDNMT3A によるメチル化を阻止し、クラスター化した遺伝子群の転写を活性化することが明らかとなった(図3)。ALaP-seq法はPML bodyだけでなく様々な核内構造体を解析することが可能であり、今後この技術を応用することによって核内構造体のゲノム機能への役割を詳細に明らかにすることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kurihara Misuzu, Kato Kagayaki, Sanbo Chiaki, Shigenobu Shuji, Ohkawa Yasuyuki, Fuchigami Takeshi, Miyanari Yusuke	4. 巻 78
2. 論文標題 Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies through DNMT3A Exclusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 493 ~ 505.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.004	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 PML bodyによる遺伝子転写制御メカニズムの解析～ AP-CLaP法を用いて～
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 Uncovering the role of PML bodies in gene expression by AP-CLaP
3. 学会等名 Tokyo RNA club（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 PML bodyによる転写制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 Uncovering the role of PML bodies in gene expression by ALaP
3. 学会等名 日本エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----