

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03154

研究課題名(和文)核内微小環境の形成を介した転写動態制御の統合的解明

研究課題名(英文)Elucidating transcriptional dynamics control via the formation of nuclear microenvironments

研究代表者

深谷 雄志 (Fukaya, Takashi)

東京大学・定量生命科学研究所・准教授

研究者番号：00786163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子の核内動態と、遺伝子発現を同時に可視化する超解像ライブイメージング技術を新たに構築することに成功した。詳細な解析の結果、エンハンサーが転写因子の局所濃度の動的変化を介して、遺伝子発現の時空間動態を緻密に制御していることを解明した。さらに、ゲノム上に離れて存在する2つの異なる遺伝子が、転写因子が局所的に濃縮された場を共有することで、同時制御されるという新たな遺伝子発現制御機構を発見した。ショウジョウバエ個体を用いたゲノム編集解析により、転写因子の局所濃度の制御に異常が生じることによって、遺伝子発現の時空間的なパターンが乱れ、結果として形態形成に著しい破綻が生じることも実験的に示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生物の持つゲノム情報がどのように正確に読み出されているのか、というセントラルドグマにおける基本原理の謎の解明につながる画期的成果である。また、転写因子の異常凝集は癌をはじめとするさまざまな疾患との関連が報告されていることから、本研究によって得られた知見はは多様な疾患メカニズムの解明や新規治療法の開発へ向けた基盤的知見となるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have successfully developed a super-resolution live-imaging technique to simultaneously visualize the nuclear dynamics of transcription factors and gene expression. Through detailed analysis, we have elucidated that enhancers control the spatiotemporal dynamics of gene expression via dynamic changes in the local concentration of transcription factors. Moreover, we have discovered a novel mechanism of gene expression regulation, in which two distant genes located far apart on the genome are simultaneously controlled by sharing a cluster of transcription factors. Using genome-editing analysis in *Drosophila*, we experimentally demonstrated that aberrant accumulation of the local concentration of transcription factors disrupts the spatiotemporal pattern of gene expression, leading to severe developmental defects.

研究分野：分子生物学

キーワード：ショウジョウバエ エンハンサー 転写バースト 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写制御において中心的な役割を果たすのは、エンハンサーと呼ばれるゲノム中の調節領域である。長年にわたり、エンハンサーは標的遺伝子と安定的な DNA ループ構造を形成することで転写を活性化する「ルーピングモデル」が信じられてきた。しかし我々の研究により、エンハンサーが「転写バースト」と呼ばれる転写活性の不連続性を調節することで遺伝子発現を制御するという、極めて動的な転写制御機構の実態が初めて明らかとなった。さらに単一エンハンサーが複数遺伝子から同時に転写バーストを生み出すという新たな現象を世界に先駆けて発見した (Fukaya *et al.*, *Cell* 2016; Lim *et al.*, *Mol Cell* 2018)。以上の結果は、エンハンサーが標的遺伝子と一対一の安定的なループ構造を形成するのではなく、むしろ転写を活性化する微小環境を核内に生み出すことで、動的に転写制御に働くという新規作用機序の存在を強く示している。我々はこうした微小環境を「transcription hub」と名付け、DNA ルーピングを覆す新たなモデルとして世界に先駆けて提唱してきた。実際、最近の超解像度顕微鏡解析からも transcription hub の存在が示唆されており (e.g., Cho *et al.*, *Science* 2018)、国際的にも極めて高い注目を集めている。しかし一方でエンハンサーがどのように transcription hub を形成し、それがどう転写制御に働くかという作用実態は全く理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、エンハンサーを足場として転写因子が局所的に濃縮された場こそが transcription hub であるという可能性について検証を行い、その分子作用機序を解明することを目的とする。特に転写因子やコアクチベーターが持つ天然変性領域 (Intrinsically Disordered Region; IDR) に着目し、transcription hub 形成の分子機構を解明するとともに、転写活性を経時測定するライブ観察技術を駆使してその機能を定量解析する。特に本研究では IDR を介した転写因子の可逆的かつ局所的な濃縮が、transcription hub の形成と動的な転写バースト制御を生み出すという新たな可能性について実験的に検証を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) エンハンサーによる転写活性化を最小因子で再現する、*in vivo* 再構築系の開発に取り組んだ。MS2 レポーター遺伝子のプロモーター領域近傍に UAS 配列を配置した DNA を持つショウジョウバエシステムを作製した。さらに、GAL4-VP16 を初期胚で発現する新規ショウジョウバエシステムを新たに作出した。それらを掛け合わせることで MS2 レポーターからの転写バーストの誘導を、単一因子のテザリングによって再現することに成功した。Airyscan 2 システムを用いた超解像イメージング解析を組み合わせることで、テザリングした転写因子である VP16 の核内局在と、転写バーストを同時計測することで、互いの機能的な関連性を明らかにすることに取り組んだ。

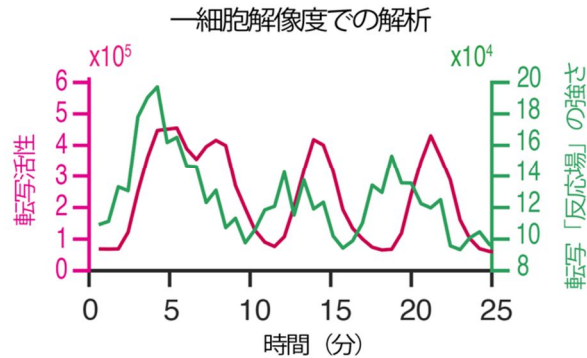
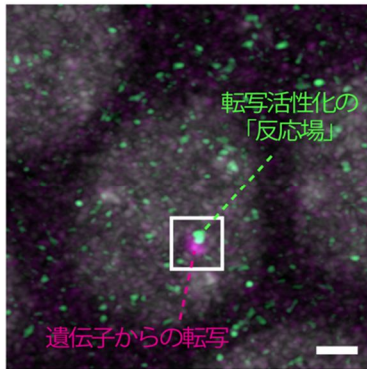
(2) テザリングに用いる転写因子に人為的に天然変性領域を付与した際の、転写バースト活性を解析することにより、エンハンサーの機能発揮における天然変性領域の役割を明らかにすることに取り組んだ。具体的には VP16 に、グルタミン連続配列 (Q22、Q42、Q62) を付与し、転写ライブイメージング解析を行うことで、機能的な評価を行った。

(3) 単一エンハンサーによる複数遺伝子の同時活性化について (Fukaya *et al.*, *Cell* 2016)、テザリングシステムを用いた再構築系の開発を進めた。具体的には Convergent に転写される MS2 レポーターと PP7 レポーターの間に UAS 配列を配置し、GAL4-VP16 のテザリングによって同調的な転写バーストが見られるか検証した。独自の MS2/PP7 多色ライブイメージングとテザリングシステム、超解像顕微鏡技術を組み合わせることで、実験的な検証を進めた。

4. 研究成果

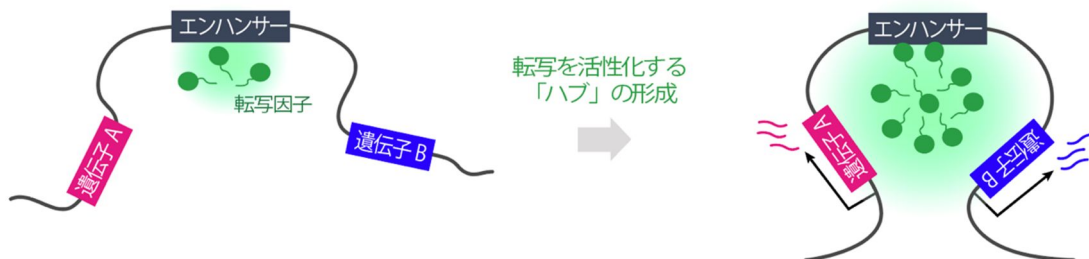
(1) ショウジョウバエ初期胚における転写ライブイメージング技術 (MS2、PP7 システム) を用いることで、エンハンサーを介した転写活性化の過程を一細胞解像度かつリアルタイムに測定した。さらに本手法に加え今回新たに、任意の転写因子をゲノムの特定領域に人為係留することでエンハンサーの働きを生体内で再構築する独自のレポーターシステムを確立した。これらを組み合わせることにより、着目した転写因子の核内動態と、それに起因する転写状態の変化の間に存在する因果関係を高精度かつ一細胞解像度で検出することが可能となった。この独自の実験系に加え、超解像顕微鏡観察や定量画像解析技術を駆使することで、実際にエンハンサー上において転写活性化因子が動的に集合と離散を繰り返しながら、遺伝子発現を誘導するため

の「反応場」を形成していることが明らかとなった（下図）。さらに、エンハンサーがこうした「反応場」を形成したまさにその瞬間に、標的遺伝子から新たにRNAを合成する転写がバースト状に起こることが明らかになった。すなわち、エンハンサー上における転写因子の局所濃度の動的な変化が、転写バーストを生み出す原動力として働くことが強く示唆された。以上の結果から、エンハンサーは安定的なループを形成するのではなく、こうした転写活性化の「反応場」を柔軟に形成するための足場として機能することで、個体発生における緻密な遺伝子発現に寄与しているという新たなモデルが実験的に強くサポートされた。



(2) VP16 にグルタミン連続配列 (Q22、Q42、Q62) を付与し同様の解析を行ったところ、標的遺伝子からの転写バースト効率が有意に上昇する様子が観察された。この時、VP16 の核内動態を超解像顕微鏡によって解析したところ、グルタミン連続配列の付与によって VP16 の局所的濃縮が促進される様子が観察された。これらの結果は、IDR を介した多価性のタンパク質間相互作用が、エンハンサー上における転写活性化因子の動的な濃縮に寄与していることを強く示唆している。さらにゲノム編集によって、内在の転写因子である Bicoid を標的として、グルタミン連続配列を付与する実験を行った。その結果、Bicoid の標的遺伝子である *hunchback* の転写が著しく亢進する様子が観察された。異所的な *hunchback* の転写活性化の結果、最終的にショウジョウバエ初期胚における体節構造の形成が異常になるなど、顕著な発生不全が認められた。以上の結果は、各転写因子の持つ IDR の長さは、標的遺伝子を適切なレベルで活性化するために、進化的にある一定の長さに規定されてきたことを示唆している。

(3) エンハンサー上に形成された「反応場」が、ゲノム上に離れて存在する2つの遺伝子によって共有されることにより、これらの遺伝子から同調的な転写バーストが誘導されるという全く新たな遺伝子発現制御機構の存在を明らかにすることに成功した（下図）。本結果から、実際の生体内においても、複数の遺伝子が1つのエンハンサーを共有することで、機能的に関連した遺伝子群の発現が一細胞レベルで同調的に制御されている新たな可能性が提示された。本研究の結果は、エンハンサーが形成する「反応場」が転写を活性化するためのハブとして働くことで、個体発生における動的かつ柔軟な転写制御に働いていることを強く示唆している。



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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukaya Takashi	4. 巻 未定
2. 論文標題 Dynamic regulation of anterior-posterior patterning genes in living Drosophila embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.02.050	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 Yokoshi Moe, Segawa Kazuma, Fukaya Takashi	4. 巻 78
2. 論文標題 Visualizing the Role of Boundary Elements in Enhancer-Promoter Communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 224 ~ 235.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2020.02.007	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 Hamamoto Kota, Fukaya Takashi	4. 巻 74
2. 論文標題 Molecular architecture of enhancer-promoter interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 62 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceb.2022.01.003	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 Yokoshi Moe, Kawasaki Koji, Cambon Manuel, Fukaya Takashi	4. 巻 50
2. 論文標題 Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living Drosophila embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 92 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab1177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Chikara, Yokoshi Moe, Kondo Shu, Shibuya Aoi, Saito Kuniaki, Fukaya Takashi, Siomi Haruhiko, Iwasaki Yuka.W	4. 巻 50
2. 論文標題 Mod(mdg4) variants repress telomeric retrotransposon HeT-A by blocking subtelomeric enhancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11580 ~ 11599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac1034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計11件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Visualization of Transcription hubs in living Drosophila embryos
3. 学会等名 3rd NINS-Princeton Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Transcription dynamics in living Drosophila embryos
3. 学会等名 JSDB/APDBN Symposium RNA, Stem Cells, Technology in Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Transcription dynamics in living Drosophila embryos
3. 学会等名 The 1st ASHBi SignAC workshop (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting in living Drosophila embryos
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting in living Drosophila embryos
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 Regulation of transcriptional bursting by core promoter elements
3. 学会等名 EMBL Conference Transcription and Chromatin (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 topological regulation of enhancer-promoter communication
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 topological regulation of transcriptional bursting
3. 学会等名 NIBB-Princeton Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 topological regulation of transcriptional bursting
3. 学会等名 日本遺伝学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 topological regulation of transcriptional bursting
3. 学会等名 第4回定量生命科学研究所シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Fukaya
2. 発表標題 topological regulation of transcriptional bursting
3. 学会等名 日本生化学会大会 (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	グラナダ大学			