

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15012

研究課題名（和文）近位ピオチンラベル法を用いた核内構造体の動作機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of the Dynamics of Nuclear Domains by Proximity Labeling

研究代表者

栗原 美寿々（Misuzu, Kurihara）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40763074

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：核内構造体の形成には微弱な分子間相互作用が関与することが近年多数報告され、その形成メカニズムの解明が大きく進展している。一方で、各核内構造体が細胞内でどのような分子機能を持つかはほとんど明らかになっていない。本研究では、微弱かつ一過的な分子間相互作用でも高感度で検出することが可能な近位ピオチンラベル法を用い、代表的な非膜オルガネラであるPML bodyと相互作用する分子を明らかにした。これまでの我々の研究からPML bodyは特定の遺伝子群を転写活性化させる働きがあることから、その分子メカニズムに作用する因子を解析したところ、いくつかの因子が遺伝子群の転写に関与することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内構造体は、微弱で一過的な相互作用によって、柔軟かつダイナミックな構造を作っているのではないかとこの考え方が広く受け入れられるようになってきた。その一方で、微弱で一過的な相互作用が、その分子機能にも必要かどうかについては、詳細な解析が行われていない。本研究では、微弱かつ一過的な分子間相互作用でも高感度で検出することが可能な近位ピオチンラベル法を駆使して、核内構造体の1つであるPML bodyによる遺伝子転写制御の分子メカニズムを明らかにした。本研究は、これまで多くが不明であった核内構造体の生理機能の詳細を見出すためのベンチマークとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Transient and weak molecular interaction have been shown to involve in formation of nuclear domains, significantly advancing our understanding of their formation mechanisms. On the other hand, the molecular functions of these nuclear domains within cells remain largely unclear. In our research, we employed the proximity labeling method, which allows for the sensitive detection of transient and weak molecular interactions, to identify molecules that interact with the PML body, a representative nuclear domain. Previous studies have demonstrated that PML body plays a role in transcriptional activation of specific gene clusters. Through our analysis, we discovered several factors involved in gene transcription related to the molecular mechanism of PML body.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内構造体 近接ラベリング法 PML body 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

近年、特定の立体構造を取らないタンパク質の天然変性ドメインが、微弱な分子間相互作用によって、核小体や PML body をはじめとした「非膜オルガネラ」の形成を制御しているのではないかという考え方が大きな注目を浴びている。非膜オルガネラの形成機構に関する情報が急速に蓄積しつつある一方で、これらの非膜オルガネラがどのようにしてその分子機能を発揮しているのかについての情報は、実は非常に限られているのが現状である。その大きな理由の一つが、天然変性ドメインが仲介する一つ一つの相互作用があまりにも微弱であるために、古典的な免疫沈降や生化学的な複合体精製などの手法ではその相互作用の対象となる分子の全容を明らかにすることができなかったという技術的な限界が挙げられる。本研究では、微弱かつ一過的な分子間相互作用でも高感度で検出することが可能な近位ビオチンラベル法を用い、代表的な非膜オルガネラである PML body と相互作用する分子を明らかにする。

申請者はこれまで、一過的な分子間相互作用を高感度で検出するために、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 APEX (Rhee et al. Science 2013) を用いた近位ビオチンラベル法を応用し、特定の分子と相互作用するゲノム部位を次世代シーケンサーによって解析する手法 ALaP-Seq を開発した。その結果、非膜オルガネラの一つである PML body は、Y 染色体上の短腕部分のリピート配列を含む YS300 と呼ばれる領域と特異的に相互作用していること、PML body は Dnmt3a をその近傍で特異的に排除すること、その結果、PML body と相互作用するゲノム領域の転写が活性化されることを明らかにした (Kurihara et al. Mol Cell 2020)。しかしながら、PML body がいかにして特定の領域を見出し、その発現を制御するのか、その分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、APEX を基盤とした近接ラベル法を用いて、PML body による遺伝子転写制御の分子機能を明らかにする。

3. 研究の方法

PML body に含まれる因子を同定するため、PML-APEX の融合タンパク質を発現する細胞を作製し、相互作用するタンパク質をビオチンラベルした後にアビジンビーズで精製し、質量分析解析を行った。またこの際、PML の変異体 APEX を融合させたタンパク質を安定発現する細胞も用いて解析することで、機能的な PML body に含まれる構成因子を同定した。PML body は 1 つの核につき数十個存在することから、Y 染色体と相互作用する PML body の近傍に局在する因子をより詳細に同定するため、研究当初は dCas9-APEX を用いて、YS300 と相互作用する因子の同定を試みた。しかし、dCas9-APEX によって YS300 近傍の因子を特異的にビオチン化できなかったことから、Y 染色体遺伝子群と相互作用する因子を ChIP-Atlas (<https://chip-atlas.org/>) によって見出し、PML body による遺伝子発現に関わる候補因子とした。これらの候補因子を CRISPR/Cas9 システムによって欠損させ、Y 染色体遺伝子の転写に影響を及ぼすか

を、Oligo Probe を用いた RNA FISH により解析した。

4 . 研究成果

機能的な PML body に含まれる因子を同定するため、野生型 PML に加え、核質にのみ局在する変異型 PMLca と、PML の SUMO 化修飾部位に変異を入れて機能的な構造体を形成できない変異型 PMLkr にそれぞれ APEX をつなげ、安定発現する細胞株を作成した。これらを用いて相互作用因子の同定を行ったところ、野生型の PML と有意に相互作用する因子を複数同定することに成功した。また、Y 染色体と相互作用する PML body 近傍に局在する因子をより詳細に同定するため、dCas9-APEX を安定発現する細胞を作成し、APEX 反応を行ってみたが、YS300 近傍の因子を特異的にビオチン化標識することができなかった。そこで、ChIP-Atlas によって Y 染色体遺伝子群と相互作用する因子を見出し、PML body による遺伝子発現に関わる候補因子とした。これらの因子をそれぞれ欠損させ Y 染色体遺伝子の転写に影響が出るかを RNA FISH によって解析したところ、Ino80 や MLL が Y 染色体遺伝子の転写制御に関わることに新たに明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Akihiro, Toya Hikaru, Tanahashi Mayuko, Kurihara Misuzu, Mito Mari, Iwasaki Shintaro, Kurosaka Satoshi, Takumi Toru, Fox Archa, Kawamura Yoshimi, Miura Kyoko, Nakagawa Shinichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Species-specific formation of paraspeckles in intestinal epithelium revealed by characterization of <i>NEAT1</i> in naked mole-rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 1128 ~ 1143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.079135.122	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 Otsuka Kai, Yang Hong, Matsubara Shin, Shiraishi Akira, Kurihara Misuzu, Satake Honoo, Kimura Atsushi P.	4. 巻 17
2. 論文標題 Evidence for a functional role of Start, a long noncoding RNA, in mouse spermatocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0273279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0273279	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3件（うち招待講演 0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研究
3. 学会等名 日本生化学会 北海道支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 核内高次構造の構築原理と機能
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗原美寿々
2. 発表標題 Uncovering the role of nuclear domain in gene expression
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2023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