

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32661
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25840095
研究課題名(和文) 転写の動的挙動の次世代への継承の解析

研究課題名(英文) Inheritance of Transcriptional Dynamics

研究代表者
村本 哲哉 (MURAMOTO, Tetsuya)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10612575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間での遺伝子発現がばらつく変異株の単離を試みた結果、4種類の興味深い変異株が得られた。そこで、母細胞での転写の活性化状態が、娘細胞でどの程度失われているのか、遺伝子の転写を生細胞内で長時間計測するライブイメージング技術を用いて検討した。その解析の過程で、発生分化開始直後にはランダムな振る舞いをしてきた発生の遺伝子が、発生分化開始後5時間で、細胞集団全体で同期して活性化と不活性化を繰り返すという非常に興味深い現象を発見し、その詳細なメカニズムを解析した。

研究成果の概要(英文)：In a forward genetic screen, 4 mutants that exhibited high heterogeneity in gene expression were isolated. To investigate the inheritance of active transcriptional states between mother and daughter cells in the mutants, I have directly recorded a dynamic nature of transcription in individual living cells through mitosis. During these analyses, synchronized oscillatory transcription events were observed at 5h development and then molecular mechanisms of the oscillatory events were analyzed in detail.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写 ライブイメージング 細胞分化 周期性 ゆらぎ クロマチン修飾 遺伝子発現動態

1. 研究開始当初の背景

転写産物の計測で一般に用いられる QPCR、マイクロアレー、RNA-Seq は、多くの遺伝子発現の情報を容易に得ることができる反面、ある時点の数千から数十万個の細胞の平均化された状態を見ているため、一細胞レベルでの経時的な情報を得るといった目的には適さない。近年の顕微鏡技術の発展により、個々の細胞における遺伝子発現をモニターすることが可能となってきた。しかし、多くの研究では、蛍光タンパク質やルシフェラーゼなどを指標として間接的に転写を計測する方法をとっているため、転写後の RNA のプロセッシングやタンパク質の安定性といった現象による影響を完全に無視できない。このような問題点を克服でき、直接 RNA の産生を生細胞内で検出する方法が「MS2 システム」である。これは、MS2 バクテリオファージのもつ外被タンパク質が MS2 ステムループ RNA に非常に高い親和性で結合する性質を利用したものである。この手法により、リアルタイムに RNA 産生の現場での転写の動的挙動を直接とらえることが可能となり、転写がパルス状に不規則な間隔で活性化するという興味深い知見が得られてきた。

そこで私は、転写の動的挙動が細胞増殖や分裂を介してどの程度正確に維持され、母細胞から娘細胞へと引き継がれているかという問題に答えるため、「MS2 システム」と長時間高解像度でライブイメージングする技術を融合させた「世代間の転写活性計測システム」を開発し、解析をおこなってきた。その結果、転写の動的挙動が、母と娘細胞間、娘細胞同士でほぼ完全に継承・維持されていることを明らかにした。そのメカニズムとして、DNA にコードされないクロマチン構造の情報が次世代に継承される可能性が考えられた。そこで、クロマチン構造の修飾に関わる分子に着目し、ヒストンの修飾 (H3K4 のメチル化) がその継承に関わっていることを突き止めた。

2. 研究の目的

生物における細胞増殖や発生分化過程では、関連する遺伝子群が適切な量とタイミングで発現することが重要であると考えられている。一方で、形態学的に同一に見える細胞群でも、遺伝子の発現には量的なばらつきが存在することを示す例が報告されている。しかし、この遺伝子発現の細胞間でのばらつきに対する基本的理解、すなわちその原因や発生分化への影響についての知見は未だ得られていないのが現状である。

一般的に細胞分裂を介した転写活性化の継承には、細胞質由来の因子、核の情報、細胞外のシグナルなどが関わっていると考えられている。このように幅広い可能性が考えられるため、世代間での転写活性の維持・継承に関わる未知の分子の同定を目的とした

包括的なスクリーニングを実施する。さらに、転写活性を長時間計測可能な技術である「世代間の転写活性計測システム」を用いてこれらの分子の役割を検証し、転写の次世代への継承の分子機構を解明することを目的とする。

本研究の最大の特徴は、私が開発してきた、転写のダイナミクスを長時間、複数の細胞周期にわたって直接 RNA レベルで検出する「世代間の転写活性計測システム」を用いた解析である。この技術により、QPCR やマイクロアレーといった細胞集団の平均を解析する方法や蛍光タンパク質などを指標とする間接的解析方法では得られない、直接的かつ本質的な知見を得ることが可能である。

本研究で解明される世代間の転写活性化維持のメカニズムは、発生分化機構の理解のみならず、医療面における応用の可能性も考えられる。例として、抗がん剤治療において、長期薬剤投与による薬剤耐性を持つ細胞の出現が問題となっているが、この癌細胞の薬剤耐性獲得に、細胞間でのばらつきの増加が関わるといった報告がある。本研究で得られる知見から、将来的に細胞間での転写のばらつきを軽減させ、抗がん剤での長期治療効果を改善させるといった応用が期待できる。

3. 研究の方法

ランダム挿入変異を導入した *Dictyostelium* 細胞のライブラリーから、細胞分裂を繰り返すに従い遺伝子発現が大きくばらつく変異株の単離をおこなう。さらに、原因となったランダム挿入変異のゲノム上での位置を挿入されたマーカー配列を基にしたインバース PCR 法により同定する。次に、スクリーニングから得られた変異について「世代間の転写活性計測システム」を用いてイメージング解析を行う。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現の細胞間でのばらつきが大きくなる変異株を REMI 法 (制限酵素仲介遺伝子挿入法) により 4 種類単離した。この 4 種類の変異株について、変異が生じているゲノム領域を同定するためにインバース PCR を行った。その結果、4 種類の変異株のうち、2 株は遺伝子の上流の非翻訳領域に、残りの 2 株は遺伝子の翻訳領域に変異が挿入されていることがわかった。

遺伝子の上流の非翻訳領域に挿入されていた株は、その下流の遺伝子発現を低下させた結果、ばらつきが大きくなるという表現型が観察された可能性がある。そこで、その下流の遺伝子の発現を野生株と比較した。その結果、その変異株における下流遺伝子の発現が 1/10 以下に低下していたことから、遺伝子上流の非翻訳領域に導入された変異が、下流の遺伝子の発現を低下させ、ばらつきが大きくなるという表現型を生じさせた可能性が示唆された。

(2) 4種類の変異株は、同定された変異領域以外異なる領域にも変異が生じたため、細胞間でのばらつきが大きくなる表現型を示した可能性がある。そこで、その可能性について検討するため、変異ライブラリーを複製する際に用いた親株に対し、同定された変異領域にだけ変異を加えた株を再度複製した。その結果、4種類の変異株のうち、3種類については表現型が再現できなかったが、1種類については表現型が再現された。この遺伝子は、JmjCドメインを含むタンパク質をコードしていたことから、ヒストン脱メチル化活性を触媒する可能性が考えられる。

(3) この変異株は、蛍光タンパク質を遺伝子発現の指標としたスクリーニングにより得られたため、転写の活性化レベルによる影響か、それともタンパクの合成速度の違いや翻訳後修飾などによる影響かを区別する必要がある。そこで、「世代間の転写活性計測システム」を用いたイメージング解析により、細胞分裂を介して転写の動的挙動が母と娘細胞間、娘細胞間で維持されているのかについて検討した。未分化状態の細胞は *act5* 遺伝子について、発生分化過程の細胞では、*csaA* 遺伝子を指標とすることで、転写活性化の維持が正常に行われているか解析している。

(4) この解析の過程で発生分化特異的遺伝子の一つである *csaA* 遺伝子は、発生分化誘導直後に他の遺伝子同様、確率的でランダムな振る舞いを示していたが、発生分化が進行するに伴い細胞集団で同調し始め、約6分間隔で転写がオン・オフを繰り返すという現象（短周期発現振動）を示した。さらに、*csaA* 遺伝子を標的とする GATA ファミリー転写因子 GtaC をイメージングした結果、細胞質と核の間を約6分間隔で行き来していることが発見された。そのため、転写因子 GtaC によって *csaA* 遺伝子の周期的な転写活性化が制御されている可能性がある。そこで、転写因子 GtaC と *csaA* の転写活性化の周期性が、同じタイミングで起こっているのか、異なるタイミングで起こっているのか明らかにするために、この2つの現象を同時にライブイメージング解析した。その結果、発生分化誘導直後では、周期的な変動が見られないのに対して、発生分化5時間の段階では、細胞集団全体での *csaA* の転写活性化と GtaC の核・細胞質の行き来が約6分おきに同調して起こるといった現象を確認することができた（図1）。

さらに、この6分間隔の周期を強制的に2分や12分周期に変えてみたところ、発生分化に関わる遺伝子の活性化が正常に起こらないことや形態形成が正常に開始できないといった異常を認めた。このことから、この「短周期発現振動」は発生分化の進行に必須の現象であり、発生過程のタイマーとして機能すると考えている。

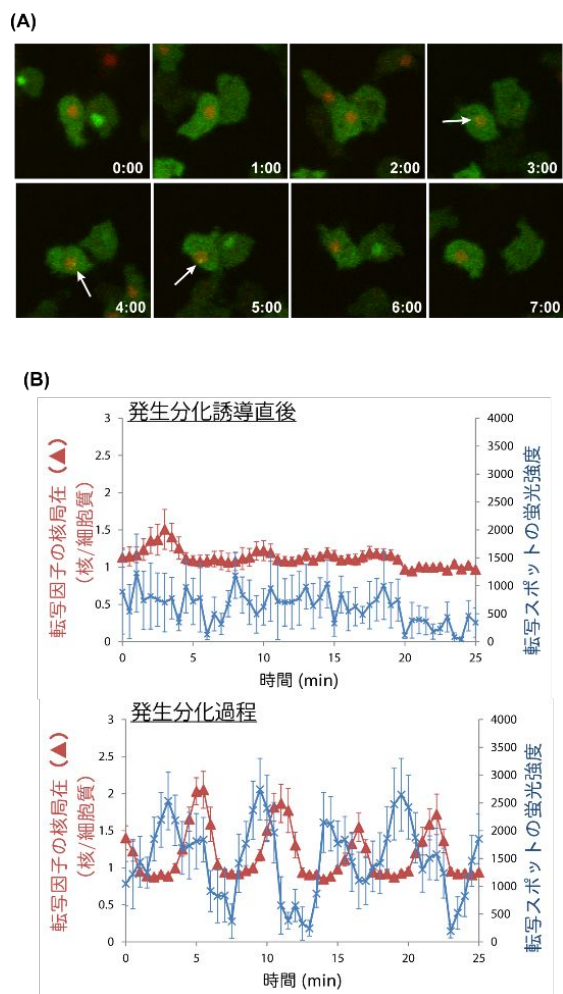


図1 遺伝子の発現振動

(A) GtaC の局在変化と *csaA* の発現動態を同時にライブセルイメージングしたもの。GFP-GtaC の細胞（緑のみ）と転写を計測する細胞（核を赤でラベルした細胞）の2種類を混ぜ合わせている。3次元撮影した画像をマージして表示。矢印が観察された転写活性化スポット。（分：秒）(B) 発生分化誘導直後と発生分化過程（開始後5時間）での *csaA* 遺伝子の発現動態（×）と *csaA* 遺伝子を標的とする転写因子 GtaC の核移行レベルの変化（△）。分化誘導直後には、発現振動が見られないが、発生分化過程では細胞集団で同調した発現振動が観察される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Cai, H., Katoh-Kurasawa, M., Muramoto, T., Santhanam, B., Long, Y., Li, L., Ueda, M., Iglesias, P.A., Shaulsky, G., and Devreotes, P.N. Nucleocytoplasmic

shuttling of a GATA transcription factor functions as a development timer. *Science* 343, 1249531. (2014).

査読有

doi: 10.1126/science.1249531

- (2) Chubb, J.R., Stevense, M., Cannon, D., Muramoto, T., Corrigan, A.M. Imaging nascent RNA dynamics in *Dictyostelium*. *Methods Mol Biol.* 1042, 101-113. (2013).
査読有
doi: 10.1007/978-1-62703-526-2_8

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 村本哲哉 「発生分化における周期的遺伝子発現ダイナミクス」 細胞動態システム科学グループミーティング VIII 2014 年 12 月 4 日 大阪大学(大阪府豊中市)
- (2) 村本哲哉 「細胞集団における転写の同期現象の発見と分子メカニズムの解明」 第 4 回日本細胞性粘菌学会例会 2014 年 10 月 11 日 東北大学(宮城県仙台市)
- (3) 村本哲哉 「発生分化における遺伝子発現動態のイメージング解析」 国立遺伝学研究所研究会・第 28 回モロシヌス研究会 2014 年 6 月 27 日 国立遺伝学研究所(静岡県三島市)
- (4) 村本哲哉 「ライブイメージングを用いた遺伝子発現解析法」第 3 回日本細胞性粘菌学会例会 2013 年 10 月 12 日 京都大学(京都府京都市)
- (5) Muramoto, T. and Ueda, M. "Screen for modifiers of transcriptional inheritance" The 46th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologist. 2013 年 5 月 30 日 くにびきメッセ(島根県松江市)

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 大阪大学大学院理学研究科・理学部 研究トピックス
<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/newinfo/info79.html>
- (2) 理化学研究所生命システム研究センター ニュース
<http://www.qbic.riken.jp/japanese/news/topic/muramoto20140404.html>
- (3) 理化学研究所生命システム研究センター 英語版ニュース
<http://www.qbic.riken.jp/english/new>

s/topic/muramoto20140404.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村本 哲哉 (MURAMOTO, Tetsuya)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10612575