

令和元年6月14日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05586

研究課題名(和文) PMLボディによる転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Uncovering roles of PML bodies in transcription

研究代表者

宮成 悠介 (Miyanari, Yusuke)

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・特任准教授)

研究者番号：60469608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：PML bodyは哺乳動物の核内に局在する核内構造体である。これまでに、PML bodyの役割としてがん化や老化への関与が報告されているが、その詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。本研究では、PML bodyの転写制御への役割を解析することを目的として研究を遂行し、PML bodyと相互作用するゲノム領域をゲノムワイドに解析するために、ALAP-seq法を新たに開発した。ALAP-seqの解析によって、PML bodyがY染色体上にあるクラスター化した遺伝子群の転写制御に重要な役割をになってい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

PML bodyはがん化や老化などに関与することが知られていたが、その分子メカニズムは明らかになっていなかった。これまでPML bodyの生物学的意義を研究する上での大きな障壁は、PML bodyを解析する技術に限られていたことである。そこで、本研究ではALAP-seq法という新たな技術を開発することによって、これまで困難であったPML bodyと相互作用するゲノムDNAを同定することに成功した。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での転写制御機構が詳細に明らかになることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Promyelocytic leukemia (PML) bodies are spherical nuclear structures of 0.1-1.0 μm in diameter, which are involved in various biological processes including cellular senescence, tumor suppression, and DNA replication and repair. To understand functional mechanism to regulate gene expression by PML, we developed a new technology called ALAP-seq, which allows us to profile genomic region interacting with nuclear bodies. We found that PML body associates with transcriptionally active gene loci and regulates their expression positively. Furthermore, some clustered genes on Y chromosome are coordinately regulated by PML body, which accompanied with epigenetic regulation including Histone modifications and DNA methylation. This study shed light into a novel mechanism to regulate clustered gene loci.

研究分野：転写制御

キーワード：クロマチン 核内構造体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

これまで、転写制御機構を理解するうえで、ゲノム配列、転写因子、エピジェネティック修飾などが注目されてきたが、未だにその分子機構の全容は見えていない。本研究では、「**核内構造体**」とクロマチンの相互作用に着目することで、これまでとは異なる視点から**転写メカニズムの解明に挑む**。

ゲノム DNA はクロマチン繊維として直径数 μm の核に絡み合うことなく収納されており、その立体的な核内配置は高度に組織化されている。クロマチンは核内空間をダイナミックに動き、その核内分布は転写などの様々な核内現象に深く関与している (Schnider R., Genes & Dev. 2007)。核内空間には、PML ボディなど様々な核内構造体が存在し、それぞれ特異的な機能を持つ。PML ボディは PML タンパク質をコアとする $0.1\sim 1.0 \mu\text{m}$ の球状の構造体で、DNA の複製や転写、エピジェネティック制御などとの関わりが示唆されている (Thé de H., Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010)。また、PML ボディとクロマチンの相互作用は、転写活性に影響を与えると示唆されているが、その詳細は明らかではない (Ching, W., J. Cell. Sci., 2005, Wang, S., J. Cell. Bio., 2004)。

申請者はこれまでに、クロマチン動態によって遺伝子発現の「揺らぎ」が引き起こされ、多能性幹細胞 (ES 細胞) の不均一性が生み出されることを明らかにした (Miyanari Y., Nature, 2012)。さらに、人工 DNA 結合タンパク質 TALE に GFP を融合することで、標的クロマチン配列の核内局在をライブイメージングする技術 (TALE-mediated Genome Visualization: TGV 法) を新たに開発した (Miyanari Y, Nature Structural & Molecular Biology, 2013)。クロマチン動態による転写制御機構を解明するためには、核内構造体とクロマチンの「相互作用」を多面的に解析し、転写反応に対するその役割を理解する必要がある。本研究では、「**TGV 法によるクロマチン動態のライブイメージング**」、「**APEX 法による核内構造体とクロマチンの相互作用の網羅的解析**」、という 2 つの異なるアプローチを組み合わせることによって、PML ボディによる転写制御機構に迫る。

2. 研究の目的

研究 A: 核内構造体とクロマチンの相互作用を網羅的に解析する技術の開発

PML ボディがどのように転写活性に影響を与えるのかは未だに不明である。特に、核内 PML ボディの周辺にどのようなゲノム領域が存在するのか、さらにそれらのゲノム領域の機能あたえる影響を調べるために、APEX 法を用いた新規技術を開発する。

研究 B: PML ボディと転写活性との関係性を見出す。

研究に使用するマウス ES 細胞では、これまでの研究によって、転写活性の高いゲノム領域が既に同定されている。これらの既存のデータと、研究 A によって得られた PML ボディと相互作用するゲノム領域を比較することで、PML ボディと転写活性との相関を見出す。

研究 C: PML ボディとクロマチンの相互作用に関与する因子を同定する。

PML ボディはクロマチンと相互作用していると考えられるが、そのメカニズムは明らかでない。ここでは、PML ボディと相互作用する因子を質量分析法にて解析することで、その分子メカニズムに迫る。

3. 研究の方法

研究 A: 核内構造体とクロマチンの相互作用を網羅的に解析する技術の開発

PML タンパク質と APEX を融合させ、細胞内で発現させることにより、PML ボディを Biotin ラベルする。その内部に存在するクロマチンを次世代シーケンサーで解析することで、PML ボディと相互作用するゲノム領域を同定する。また、本技術の信頼性を多角的に検証する。

研究 B: PML ボディと転写活性との関係性を見出す。

同定されたゲノム領域の転写活性とエピゲノム状態を既存のデータベースを用いて調べ、それらの相関を見出す。次に、TGV法によって「PMLボディと遺伝子の相互作用」と「転写活性」を同時にライブイメージングし、両者の相関関係を検証する。また、任意の遺伝子座の核内局在を人為的に操作することで、転写活性への影響を検討し、考察された作業仮説を証明する。

研究 C: PML ボディとクロマチンの相互作用に関与する因子を同定する。

APEX法によって精製されたPMLボディを質量分析計や次世代シーケンサーを用いて解析し、その構成因子（タンパク質およびRNA）を同定する。得られた構成因子群をsiRNAを用いてノックダウンすることにより、クロマチンとの相互作用に必要な因子を探索する。更に、それらの因子の機能解析をおこなうことで、PMLボディによる転写制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

研究 A

PML-APEX ノックイン ES 細胞を作成し、PML body 周辺に局在するクロマチンを効率よくビオチンラベルできる技術を開発し、ALAP法と命名した。本法は、細胞内の特異的な空間を瞬時にビオチンラベルすることができ次世代シーケンサーと組み合わせることによって、PML body と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定することに成功した。さらに、ALAP-seq のデータ解析によって PML body が Y 染色体の一部の遺伝子座と相互作用することによって、転写活性を正に制御することを明らかとした。

研究 B

当初 TGV 法によって、PMLbody と同定されたゲノム領域との相互作用をライブイメージングする予定であったが、そのラベル効率の問題からライブイメージングは困難であった。当初の予定を変更し、DNA-FISH 法をもちいて PML body とゲノム領域との相互作用を網羅的に解析し、ALAP-seq によって同定されたゲノム領域が効率良く PML body と相互作用することを見出すことに成功した。

研究 C

ALAP法と次世代シーケンサーを組み合わせることにより PML body と相互作用するゲノム領域を網羅的に同定することに成功した。PML ノックアウト ES 細胞の解析から、PML body とクロマチンとの相互作用は、(1) 転写活性を正に制御すること、(2) DNA メチル化や H3K27me3 修飾などを抑えることによって、クロマチン状態をアクティブに制御していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

現在、上記の研究結果を取りまとめているところであり、2019 年度に論文投稿する予定である。

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 栗原美寿々、宮成悠介、PML body による転写制御機、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
- ② 栗原美寿々、宮成悠介、PML body による転写制御機構の解明、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- ③ Misuzu Kurihara, Kagayaki Kato, Yasuyuki Ohkawa, Takeshi Fuchigami, Yusuke Miyanari. Interplay between PML bodies and chromatin regulates transcriptional activity of clustered genes. EMO meeting, 2018
- ④ Misuzu Kurihara, Kagayaki Kato, Yasuyuki Ohkawa, Takeshi Fuchigami, Yusuke Miyanari. Interplay between PML bodies and chromatin regulates transcriptional activity of clustered genes. Cold Spring Harbor meeting, 2018
- ⑤ 宮成悠介 クロマチン高次構造の理解に向けて、生命化学研究会、2018

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/miyalab/#pagetop>

6. 研究組織

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（生命創成探究センター）
基礎生物学研究所

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。