

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14447

研究課題名(和文)動物初期胚を用いたコアプロモーターの活性測定

研究課題名(英文)Development of a tool for measuring the activity of core promoters using animal early embryos

研究代表者

佐藤 ゆたか(Satou, Yutaka)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：40314174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の遺伝子の転写には、RNAポリメラーゼIIが結合するコアプロモーターが必要である。その性質をレポーター遺伝子を用いて直接テストできる実験系の開発を目指した。脊索動物であるホヤの胚では受精直後はゲノムからの転写が抑制されているが、受精直後に導入したレポーター遺伝子はこの時期にエンハンサーを必要とせずに発現した。しかし、実験系として用いるには個体間のばらつきが大きかったため、その原因の一つとなる初期胚での転写の抑制機構について解析した。他の動物と同様に、細胞分裂回数に依存する機構と受精後の時間に依存する機構が存在したが、ばらつきは前者の機構のせいである可能性が高いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Transcription in eukaryotic cells requires core promoters, to which RNA polymerase II binds. The purpose of the present study was to test core promoter activities directly using reporter genes. In embryos of an invertebrate chordate, *Ciona intestinalis*, transcription for the zygotic genome is suppressed in early embryos after fertilization. Nevertheless, reporter constructs introduced immediately after fertilization were expressed, and no enhancer elements were required for this expression. However, we observed a large deviation in the reporter assays among multiple independent experiments. Therefore we studied how transcription is suppressed in early ascidian embryos. As in embryos of other animals, transcription is suppressed by a mechanism dependent on cell cycle number and a mechanism dependent on the absolute time after fertilization. We obtained evidence that strongly suggested that the large deviation is due to the former mechanism.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写 ホヤ

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の遺伝子の転写には、RNA polymerase II が結合して転写開始前複合体 (PIC) が形成されるコアプロモーターが必須である。コアプロモーター内には TATA-box、BRE (TFIIB recognition element) や Inr (initiator) などの機能配列が存在する。しかしながら、これらの既知の機能配列のすべてが、すべてのコアプロモーターに存在するわけではなく、既知の機能配列のうちの複数のものを異なる組み合わせで持つものや、一つしか持たないもの、中には一つも持たないものなどもある。実際に少なくとも 1/3 程度の遺伝子のコアプロモーターにはこうした既知機能配列のコンセンサス配列がないという見積りもある。一方で、ほぼすべての遺伝子のプロモーターには TATA-box または TATA-like element が存在するとする研究もあり、統一された見解が確立されているわけではない。

そうした混沌とした状況の背景には、コアプロモーター内の機能配列は主に多数の遺伝子の上流配列のアライメントによるコンセンサス配列として同定され、その後実験的な検証をうけるという方法で実験が進んできたという歴史がある。

同じ DNA の機能配列であるエンハンサーは、レポーター遺伝子を使って直接にその機能がテストされ、シスエレメントとして同定されてきた。同じように、コアプロモーターの機能配列の探索にレポーター遺伝子を利用できれば、機能から配列の同定が可能になるが、コアプロモーターとエンハンサーの間には、「相性」とでも言うべき相互作用の特異性がある場合がある (例えば、Imai et al., Science, 2012, 337:964-967)。したがって、特定の遺伝子のエンハンサーの存在下で特定の遺伝子のコアプロモーターを同定したとしても、コアプロモーターとしての一般的性質を解析できていない可能性がある。一方で、コアプロモーターだけでは遺伝子の発現はほとんど起こらないので、この方法でコアプロモーターの機能配列を調べることは難しい。

アフリカツメガエルやゼブラフィッシュなどでは、エンハンサー・プロモーター・レポーターの融合遺伝子を受精卵などに顕微注入すると、そのエンハンサーやプロモーターの由来する遺伝子本来の発現とは無関係に、顕微注入直後から一定の時間だけ発現することが知られている。これらの動物の胚では、この一過的な発現が起こる段階では、胚性ゲノムからの転写は抑制されていると考えられている。本研究で実験材料として用いるホヤでは、同様に 8 細胞期より前の時期には胚性ゲノムからの転写は抑制されているが、レポーター遺伝子の導入によって、2 ~ 4 細胞期に弱いレポーターの発現が起こることが

知られていた (Rothbacher et al., Development, 2008, 134:4023-4032)。また、私の研究グループの予備実験によって、この弱い発現にはエンハンサー機能が必要ないことが示唆されていた。つまり、この初期胚での一過的な発現を利用することでコアプロモーターの活性を測定できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

先述の通り、遺伝子の転写には、RNA polymerase II が結合して転写開始前複合体 (PIC) が形成されるコアプロモーターが必須である。コアプロモーターの機能配列は、おもに遺伝子上流配列のアライメントからコンセンサス配列を得ることによって同定されてきた。しかしながら、この方法論によって、すべての機能配列が同定されているわけではないと考えられている。研究を進めるには、配列の直接の機能解析によって、機能配列を探索する方法論が必要である。本研究では、動物の初期胚に導入した DNA が本来の遺伝子の発現とは別に一過的に発現するという過去の研究、および、その発現にはエンハンサーが必要ないという私の研究グループの予備実験結果にもとづいて、コアプロモーターの機能配列を、エンハンサーのレポーター解析と同様の方法で解析する実験系を開発できるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いた動物

本研究で用いた脊索動物門被嚢類に属するカタコウレイボヤ (*Ciona intestinalis*) は、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。

(2) レポーター遺伝子の導入

実体顕微鏡下での顕微注入、およびエレクトロポレーション法によって DNA を導入した。レポーターの検出は、in situ ハイブリダイゼーション法および逆転写 - 定量 PCR (RT-qPCR) 法を用いた。

4. 研究成果

ホヤの受精卵にエレクトロポレーション法により導入されたエンハンサーとコアプロモーターを含むレポーター DNA は、2 ~ 4 細胞期に発現するという予備実験結果を再検討した。4 種類の遺伝子の上流配列を用いたレポーターコンストラクトを利用した。いずれのレポーターも受精卵に導入すると、2 ~ 4 細胞期に発現することが確認できた。また、エンハンサー領域を欠損させたコンストラクトでも発現したことから、ホヤ胚では DNA コンストラクトの導入によって、2 ~ 4 細胞期に転写が起こり、この転写にはエンハンサーは必要がないことが分かった。

しかし、この実験を繰り返しおこなって、再現性を確認している段階で、実験サンプルごとに発現量に大きな差が認められることが分かった。具体的には *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、レポーターを発現する胚の数の割合を測定し、その値に実験間で大きな差が生じていた。

その原因を探り、当初予定していた実験系の確立が可能かどうかを明らかにするために、レポーター導入胚におけるレポーター発現の強さを定量的に調べる RT-qPCR の方法を開発した。サンプル中には導入した大量の DNA コンストラクトがあり、DNA 分解酵素による処理だけでは完全に排除できなかったため、RNA 由来の逆転写産物だけを鋳型に PCR ができるように特殊な逆転写プライマーを使うなどして、定量できるようにした。その結果、2 ~ 4 細胞期での発現は通常発現量の 1 ~ 10 % であることがわかった。*in situ* ハイブリダイゼーションによる検出限界付近の量であると考えられ、そのために実験サンプル間の差が大きくなっている一因と考えられた。一方、RT-qPCR でも実験サンプル間の差が認められ、胚あるいはその親個体の遺伝的個体差あるいは用いた卵の成熟度などの要因もサンプル間の差を作り出している可能性が考えられた。

そのため、こうした個体間の差がどういった分子機構に由来するかを明らかにするためには、初期胚での転写の抑制、およびその後の胚性ゲノムからの転写の開始の機構をある程度明らかにする必要があると考え、解析を続けた。先述の通り、動物胚では一般に受精直後は一定時間、遺伝子の転写がおこなわれない。本研究の研究材料であるホヤでは最初の転写が行われるのは 8 細胞期と考えられている。そこで、正常胚で 8 ~ 16 細胞期に発現を開始する遺伝子について、RT-qPCR を用いて、初期胚での発現を調べた。動物極側で発現を始める遺伝子は、*in situ* ハイブリダイゼーション法では 8 細胞期に発現がはっきりとは認められないが、RT-qPCR 法によれば、明らかな発現が認められた (RT-qPCR のほうが感度が高いためであると考えられる)。一方、植物極側で発現する遺伝子は正確に 16 細胞期から発現が始まっていた。

動物極側で発現する遺伝子は Gata 転写因子によって調節され、植物極側で発現する遺伝子は カテニンによって調節されていることがわかっている。本研究では、カテニンが植物極側において Gata 転写因子の機能を阻害することで、それぞれ、Gata 転写因子が動物極側で、カテニンが植物極側で、特異的に標的遺伝子を活性化していることが分かった。抗体染色によって調べたところ、

カテニンが核に移行するのは 16 細胞期からであり、そのため、カテニンの標的遺伝子は 16 細胞期に初めて活性化されるものと考えられた。一方、Gata 転写因子は、2

細胞期ですでに核にその存在が認められたが、標的遺伝子は 8 細胞期まで活性化されないようであった。

カエルなどの脊椎動物では、細胞分裂の回数が転写の抑制に関係していることがわかっており (一定回数の分裂を経なければ、胚性ゲノムからの転写は始まらない)、Gata の標的遺伝子の転写を抑制しているのは、細胞分裂の回数である可能性が考えられた。そこで、細胞周期の調節をおこなうことが知られている CDC25 の機能阻害をおこなった。予想通り CDC25 の機能阻害胚では、細胞周期が遅れた。実験胚が 4 細胞期になった時点では対照胚は 16 細胞期、実験胚が 8 細胞期になった時点では対照胚は 16 細胞期になっていた。この実験胚では動物極側で発現する遺伝子も植物極側で発現する遺伝子とともに 8 細胞期で発現していたが、4 細胞期ではいずれも発現していなかった。このことは、胚性のゲノムからの遺伝子の転写には少なくとも 3 回の分裂をへて 8 細胞期になっていることが必要であり、また、カテニンは細胞の分裂回数に関わらず受精後に一定の時間が経過すると核に移行し、標的を活性化すると考えられた。

つまり、ホヤの初期胚において、胚性ゲノムからの転写を抑制する機構には 2 つの異なる調節機構が働いている。一つは、細胞分裂の回数に依存する機構で、分裂とともに転写の抑制が段階的に解除されていく。ホヤ胚ではこの機構は遺伝子発現をグローバルに抑制しており、8 細胞期 ~ 16 細胞期にかけてほぼ完全に解除されていると考えられる。もう一つは、受精後の時間に関連する機構で、ホヤでは転写因子のコファクターであるカテニンの核移行を調節している。ホヤでは最も初期に発現する遺伝子の調節機構が詳細に明らかにされているという他の実験系にはない特長があり、本研究ではそれを利用して、受精直後の初期胚における転写抑制にかかわる 2 つの分子機構の存在とそれらの関係を明らかにすることができた。

1 つ目の細胞分裂に依存する機構は 2 ~ 4 細胞期での発現を完全に抑制できるわけではない。また、2 つ目の機構はカテニンの標的遺伝子しか調節できない。以上のことから考えて、1 つ目の機構が外来遺伝子の 2 ~ 4 細胞期での発現に影響を与えていると考えられた。

実際に外来遺伝子の 2 ~ 4 細胞期の転写レベルを測定したところ、この転写も基本的には、1 つ目のグローバルに転写を抑制する機構によって抑制されており、おそらく大量の遺伝子を導入したことにより、検出可能なレベルに達したと考えられる。今後、検出感度をあげることで当初の目標通り胚性ゲノムからの転写が始まる初期胚を用いてコアプロモーターの活性測定が再現性良く可能になるだろう。

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 1 件)

Izumi Oda-Ishii, Atsushi Kubo, Willi Kari, Nobuhiro Suzuki, Ute Rothbacher, Yutaka Satou, A maternal system initiating the zygotic developmental program through combinatorial repression in the ascidian embryo, PLoS Genetics, 査読有、12, 2016, e1006045.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006045>

〔学会発表〕(計 3 件)

池田達郎、阿部哲也、佐藤ゆたか、脊索動物ホヤ初期胚における胚性の転写開始機構の解析、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月3日、神戸
佐藤ゆたか、Analysis of effects of local chromatin structure on enhancer function、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月3日、神戸
小田いずみ、佐藤ゆたか、ホヤ胚における母性因子による胚性発生プログラムの開始機構、日本発生生物学会秋季シンポジウム2016、2016年10月21日、三島市

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐藤 ゆたか (SATO, Yutaka)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40314174

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし