

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15710

研究課題名（和文）コアプロモーターを介した配列特異的な転写動態制御機構のライブイメージング解析

研究課題名（英文）Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living *Drosophila* embryos

研究代表者

余越 萌（Yokoshi, Moe）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：80791938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、転写開始点を含む100塩基程度のコアプロモーター領域に着目し、塩基配列に潜在する特異的な転写活性調節の作用機序を解明することを目的とした。まず、転写制御におけるコアプロモーターの働きを生きたショウジョウバエ初期胚において直接可視化するライブイメージング技術を新たに開発した。詳細な定量画像解析の結果、エンハンサーとは独立して、コアプロモーター自身も転写バーストの制御に大きく寄与することを新たに見出した。さらに、ゲノム編集を用いて内在遺伝子のコアプロモーターを改変したところ、各変異によって転写バーストの制御が大きく乱れ、結果として初期胚の体節形成に異常を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コアプロモーターの改変を通じて、個体発生における遺伝子発現制御の基本原則の解明に留まらず、疾患原因となるコアプロモーター変異の同定や、遺伝子発現や細胞運命制御を制御する新たなゲノム技術の開発や新規医療技術の開発、疾患の発症メカニズムの解明に貢献できると期待されます。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the mechanism of specific transcriptional regulation in the nucleotide sequence of the core promoter region, which is composed of approximately 100 base pairs including the transcription start site. Firstly, we developed a novel live imaging technique to directly visualize the function of the core promoter in transcriptional regulation in living *Drosophila* embryos. Detailed quantitative image analysis revealed that the core promoter itself significantly contributes to the control of transcriptional bursts independently of enhancers. Furthermore, by using genome editing to modify the core promoter of an endogenous gene, we found that each mutation greatly disturbed the control of transcriptional bursts, resulting in abnormalities in the segmentation of early embryos.

研究分野：RNA生物学

キーワード：転写制御 コアプロモーター

1. 研究開始当初の背景

ゲノム配列の98%がタンパク質をコードしない、いわゆる非コードDNAであり、遺伝子発現の司令塔として時空間的に転写活性を厳密に調節している。生物の複雑性を生み出す重要な役割を担う非コードDNAであるが、どの塩基配列が調節スイッチとなり、遺伝子発現のON/OFFを制御しているのかという根本的な仕組みは現在まで見過ごされてきた。転写制御において中心的な役割を担うのは、エンハンサーやコアプロモーターと呼ばれるゲノム中の非コードDNA調節領域である。コアプロモーターは、遺伝子の転写開始点を含む80塩基程度のDNA領域で、複数の配列エレメントから構成されている(図1)。代表的なエレメントとして、TATA-box (TATA)やInitiator (Inr)、Motif 10 element (MTE)、Downstream promoter element (DPE)などの配列がコアプロモーター中の適切な箇所に存在しており、これらはTFIIDと呼ばれる基本転写因子によって認識されている。重要なことに、ゲノム中におけるコアプロモーターを構成する配列エレメントは遺伝子ごとに大きく異なっており、エンハンサーに対する「応答性」を変化させることで、転写量を緻密に制御していると考えられている。しかし、コアプロモーター配列の違いがどのように、転写動態の制御に寄与するかという時間的側面からの理解は大きく遅れていた。特に近年のイメージング解析から、エンハンサーが標的遺伝子から「転写バースト」と呼ばれる不連続状の転写活性を誘導する新たな働きを持つことが報告されているが、コアプロモーターがどのように転写バーストの制御に寄与するかという根本的な問いは依然として手付かずの状態だった。

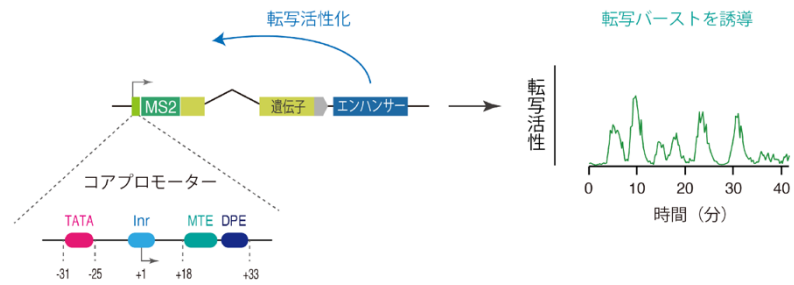


図1: コアプロモーターはエンハンサーからの転写活性化の指令を受け取ることによって、転写バーストを誘導します。コアプロモーターにはTATAやInr、MTE、DPEに代表される配列エレメントが存在し、遺伝子毎にその組成が大きく異なります。

2. 研究の目的

本研究では、転写開始点を含む100塩基程度のコアプロモーター領域に着目し、塩基配列に潜在する特異的な転写活性調節の作用機序を解明することを目的とした。最先端のライブイメージング技術と画像解析技術を統合・発展させ、現在の転写制御研究の主流である大規模解析では達成できない個体発生における1細胞レベルでの転写制御機構をリアルタイムに定量化することに挑んだ。

3. 研究の方法

最初に、マイクロインジェクションによりレポーター遺伝子を発現するショウジョウバエ系統を作出した。ハエ初期胚は、核が一層に整列しており、かつ全ての細胞の周期が同調しているという定量的解析に極めて適した性質をもつ。つまり、1回のライブイメージングで数百もの核における転写活性を同時に可視化できるという培養細胞には無い優れた特性を持つ。そして、従来のスナップショット的手法の弱点を克服するため、独自に設計したMS2/MCPシステムを搭載したレポーター遺伝子を駆使した転写ライブイメージング解析により、初期胚発生過程における転写活性を1細胞レベルでイメージングを行った。転写活性の可視化には、バクテリオファージ由来のMCPタンパク質とRNAステムループMS2間の特異的なタンパク質-RNA相互作用を利用した。さらに、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を多段階で行うことで、内在遺伝子のプロモーター改変し、転写動態から表現型評価まで一貫して検証を行った。

4. 研究成果

まず、MS2/MCP転写ライブイメージング技術を用いて、転写制御におけるコアプロモーターの働きを生きたショウジョウバエ初期胚において直接可視化するライブイメージング技術を新たに開発した。人工的に設計したコアプロモーター中の配列エレメントを改変したショウジョウバエ系統をシステムティックに作製し、転写動態の変化を1細胞レベルで定量的解析した結果、エンハンサーとは独立して、コアプロモーター自身も転写バーストの制御に大きく寄与することを新たに見出した。つまり、全く同じエンハンサーの制御下にある場

合においても、たった数塩基程度のコアプロモーター配列の違いによって、転写バースト活性が大きく変化することを明らかにすることができた。特に、コアプロモーターエレメントの中でも TATA-box は転写バーストの振幅を増大させる役割を担っている一方で、Inr や MTE、DPE は、主に転写バーストの頻度の調節に寄与しているという役割の違いが存在することを初めて解明した。さらに、エンハンサーとプロモーターの種類を変えて、さまざまな組み合わせを検討したが、上記の傾向は維持された。

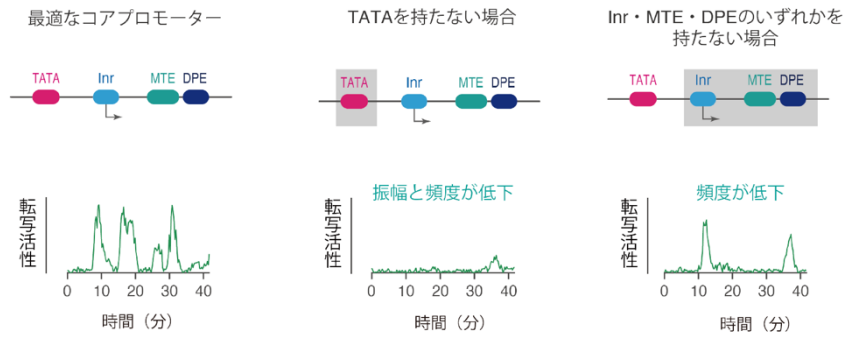


図2：本研究により、TATA は転写バーストの振幅と頻度の制御に重要な役割を担うことが分かりました。一方で、Inr、MTE、DPE は転写バーストの頻度を選択的に制御していることを明らかにしました。コアプロモーターに変異が生じ、適切に転写バーストを制御できなくなると、体節形成の異常などの表現型を示します。

さらに上記解析から得られた実験結果の普遍性を検証するため、*fushi tarazu* (*ftz*) と呼ばれる初期発生に必須な分節遺伝子をモデルとして、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を多段階で行うことで、内在遺伝子のコアプロモーターを改変した。その結果、先ほどの結果と一致して TATA や DPE が転写バーストの振幅や頻度を異なる形で調節していることが明らかとなった。また、各変異によって転写バーストの制御が大きく乱れ、結果として初期胚の体節形成に異常を引き起こすことが明らかとなった。以上の成果をまとめ、”Moe Yokoshi et al., *Nucleic Acids Research*, 2022”として発表した。

本研究成果は、個体発生における遺伝子発現制御の基本原理の解明に留まらず、配列エレメント改変を介した転写チューニングによる細胞運命制御技術の創出や疾患原因となるコアプロモーター変異の同定、新規医療技術の開発を促進する基盤的知見となることが期待される。

5. 主な発表論文等

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

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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Moe Yokoshi
2. 発表標題 Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living Drosophila embryos
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 余越萌
2. 発表標題 コアプロモーターを介した 転写動態制御機構の ライブイメージング解析
3. 学会等名 第20回 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------	---------