

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15836

研究課題名(和文)高温応答遺伝子領域と転写活性の高い核内領域の解析から熱記憶構築機構の解明を目指す

研究課題名(英文) Observation of transcription activity during the process of heat stress memory establishment

研究代表者

澁田 未央(笠松未央)(Shibuta K., Mio)

山形大学・理学部・助教

研究者番号：30849790

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):植物は一度高温ストレスを感じるとそれを記憶し、次に同様のストレスを感じた際により効率的に対処することができる。高温ストレスにおけるクロマチン動態の構造学的な研究は技術的な問題から不十分であった。本研究ではシロイヌナズナに翻訳後修飾のライブイメージング手法を導入し、転写制御メカニズムの解明に取り組んだ。転写活性状態を示すRNAポリメラーゼII(PolII)のリン酸化修飾の観察手法を確立し、その成果を論文発表した。NGS解析から高温ストレス時の素早い転写応答にはPolII修飾制御が関与することが示唆された。今後はPolII制御因子を研究対象に、転写活性領域の核内分布変化を中心に解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した転写活性レベルイメージングシステムは植物にとどまらず様々な真核生物に応用可能であり、ストレス応答、発生・再生といった生命現象の研究や翻訳後修飾ダイナミクスに着目した創薬開発の促進に貢献できると考えられる。また転写活性領域制御への関与が示唆されたRNAポリメラーゼII-C末端領域修飾による転写制御と、知見の豊富な転写因子による転写制御とのクロストークの解析を進めることで、多層的で緻密な転写制御機構の解明が期待できる。

研究成果の概要(英文):Plants can make memory once they experience high temperature, and that memory allows them to cope with similar stress more efficiently. It is difficult to study chromatin dynamics and epigenetic regulation during establishment of the memory due to technical challenges. In this study, I introduced a live imaging method for observing post-translational modification in Arabidopsis thaliana, and attempted to elucidate the transcription regulation mechanism from the perspective of chromatin structure. I developed a live imaging method to monitor the transcription activity focusing on dynamics of RNA polymerase II, and I have submitted the results to several journals. In addition, NGS analysis suggested that post-translational modifications of RNA polymerase II are involved in the regulation of in the rapid heat stress response. I will continue to investigate the transcription regulation mechanism, with a specific focus on the nuclear dynamics of RNA polymerase II.

研究分野:植物分子生物学

キーワード:イメージング 熱ストレス 翻訳後修飾 RNAポリメラーゼII 核構造 クロマチンダイナミクス 転写制御 シロイヌナズナ

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高温ストレスは農業作物の生育に深刻な影響を与えるため、農業作物の収量確保のための適切な対策が必須である。植物の高温ストレス応答機構の一つに熱記憶がある。熱記憶の形成には様々なエピジェネティック修飾レベルがダイナミックに変動することが重要な役割を持つと考えられている。高温ストレス時には転写活性が低い領域のクロマチンが物理的に緩み、特定の遺伝子の転写が活性化されることが明らかにされたが、高温ストレスによって転写活性が高い領域がどのように形成されるのか、また高温応答関連遺伝子がどのように制御されるのかについては技術的な困難さから知見が乏しい。すなわち、「熱記憶の構築過程において転写活性の高い領域はどのように区画化され、高温応答遺伝子はどのように制御されるのか」という学術的問いを明らかにするために、植物体におけるクロマチンダイナミクスの新規イメージング技術を確立することで、核内転写活性環境フレームワークの構築メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 植物におけるエピジェネティック修飾ライブイメージング手法を確立する

熱記憶の構築には高温応答遺伝子領域におけるヒストン修飾などのエピジェネティック制御の関与が明らかにされているが、熱記憶の構築過程で核内の転写活性領域かがどのように区画され、高温応答遺伝子がどのように制御されるかは未解明である。そこで、モデル植物シロイヌナズナにおけるエピジェネティック修飾イメージング手法を確立することで、熱記憶構築過程におけるクロマチンダイナミクスの構造学的解析を可能にする。

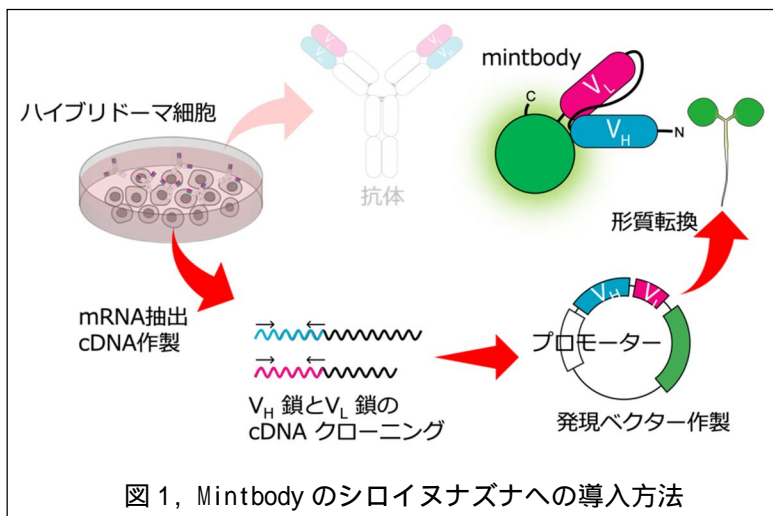
(2) 高温応答関連因子の核内動態を明らかにする

「熱記憶」の構築にはエピジェネティック修飾制御が重要な役割を持つ。熱記憶構築過程における高温応答関連因子を次世代シーケンス(NGS)解析によって同定し、その核内動態やクロマチンダイナミクスに与える影響をイメージングによって明らかにし、核構造の観点から熱記憶構築機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体内抗体 mintbody を植物体に導入し転写活性の高い核内領域を可視化する

生体内抗体 modification-specific intracellular antibody (mintbody)は抗体 V_H鎖と V_L鎖および蛍光タンパク質をリンカーで接続し、生体内プロモーターで発現させることでヒストン修飾や PolIII 修飾をライブイメージングできるツールである (Kimura et al., 2015)。各種エピジェネティック修飾をターゲットとする mintbody をシロイヌナズナ植物体に導入



することで、転写活性ダイナミクスのライブイメージングを可能にする(図1)。

(2) NGS 解析から高温応答関連因子を抽出する

熱記憶構築過程のタイムポイントにおける転写レベルおよびエピジェネティック修飾レベルの解析を行い、高温ストレス下で特徴的な変動パターンを示す遺伝子を抽出し、変異体や過剰発現体、レポーターラインを用いた解析を行う。

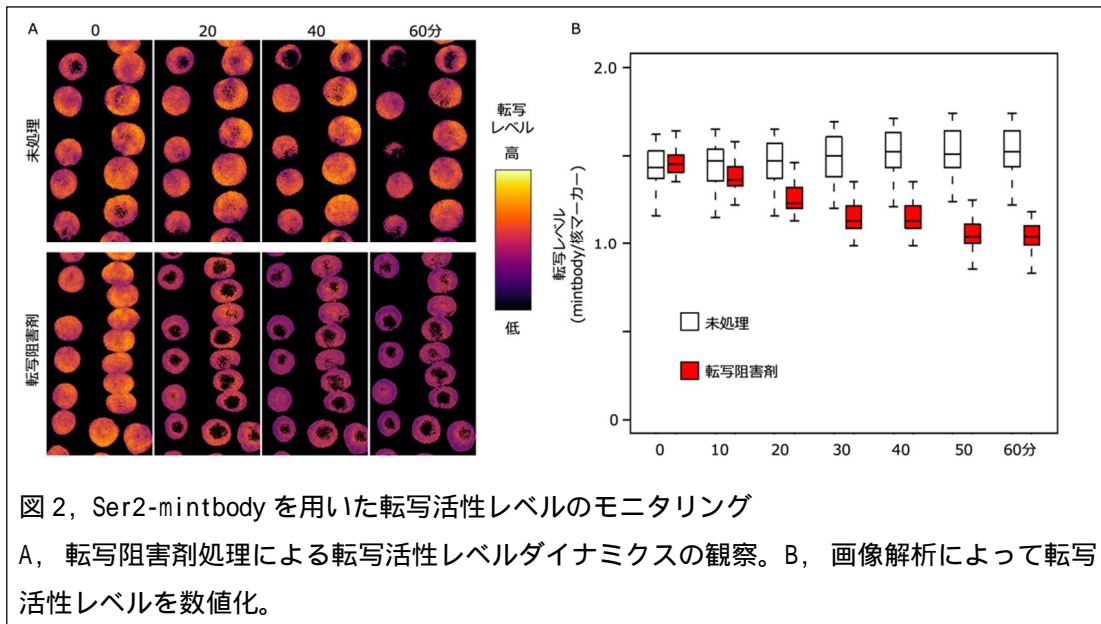
(3) 熱記憶構築過程における転写活性ダイナミクスを観察する

(1)で確立したイメージングシステムを用いて、熱記憶構築過程における転写活性ダイナミクスの観察、および(2)で着目した因子が転写活性領域に与える影響を観察する。

4. 研究成果

(1) 転写活性の高い核内領域のライブイメージング手法を確立

RNA ポリメラーゼ II(PoIII)-C 末端領域(CTD)のリン酸化修飾をターゲットとする mintbody (Ser2P-mintbody)のシロイヌナズナ植物体への導入を行なった。Ser2Pは転写を実際に行なっている PoIII-CTD に特徴的な翻訳後修飾であるため、Ser2P-mintbody によって転写活性領域のライブイメージングが可能になった(図2A)。Ser2P-mintbody と翻訳共役型切断配列(Shibuta et al, 2019)、核マーカーを組み合わせることで、画像解析による転写活性レベルの数値化手法を確立した(図2B)。この成果によって、シロイヌナズナ植物体における転写活性領域のライブイメージング、および転写活性レベルの測定方法が確立し、これらの研究成果を論文誌に発表した。本研究で確立した転写活性領域イメージングシステムは海外を含む複数の研究グループに提供され、ストレス応答、発生・分化過程などにおける転写活性領域解析の発展に貢献している。



(2) ヒストン修飾のライブイメージング手法の確立へ

各種ヒストン修飾をターゲットとする mintbody (H3K9ac-mintbody、H3K4me2-mintbody、H3K4me3-mintbody)のシロイヌナズナ植物体への導入を進めた。これらはどれも転写活性状態を示す遺伝子領域に特徴的なヒストン修飾であり、熱記憶構築において重要な役割を持つ。H3K9ac-mintbody については、ストレス処理によって核内で不可逆的な凝集体を形成す

ることが明らかになり、また H3K4me2-mintbody については植物体内では蛍光が確認できなかった。これらの原因としてシロイヌナズナの生育温度、細胞内環境では今回用いた生体内抗体が本来の機能を発揮できなかった可能性が推察され、mintbody のアミノ酸配列の検討などが必要であることがわかった。一方、H3K4me3-mintbody についてはシロイヌナズナ植物体への導入、機能チェックが完了し、ストレス応答や発生・分化プロセスにおける H3K4me3 核内分布パターンの観察結果と、誰でも簡単に画像解析を実行できる解析ツールの開発とを合わせて論文投稿の準備を進めている。

(3) NGS 解析から高温応答関連遺伝子に特徴的な翻訳後修飾パターンを探索

RNA シークエンス解析によって、高温ストレス下で特徴的な発現変動パターンを示す遺伝子グループを抽出し、クロマチン免疫沈降法-シークエンス解析から遺伝子グループに特徴的な翻訳後修飾パターンの検討を行なった。その結果、高温処理によって即座に転写活性化が生じる遺伝子グループには、処理前の時点で多量の PolIII が蓄積している遺伝子が多く含まれることがわかった。この結果は、素早い温度変化に対処するために即座に活性化される遺伝子は、転写因子による制御に加え、PolIII-CTD の修飾調整による転写 ON/OFF 制御を受けていることを示唆するものだと考えた。よって以降の解析では PolIII-CTD のリン酸化および脱リン酸化に関わる因子を研究対象とした。

(4) PolIII-CTD 修飾因子による転写活性領域分布制御

PolIII-CTD のリン酸化酵素および脱リン酸化酵素をコードする遺伝子について、変異体の観察や過剰発現体、蛍光タグラインの作出を進めた。並行してタバコ表皮細胞を用いた一過的発現実験を行い Ser2P-mintbody によって転写活性領域を観察した結果、一部の PolIII-CTD 脱リン酸化酵素の過剰発現細胞において転写活性領域分布が変化することが明らかになった(図3)。コントロール細胞では転写活性領域は核小体を除く核質に一様に分布するのに対し、PolIII-CTD 脱リン酸化酵素の過剰発現細胞では転写活性が高い領域と低い領域が区画化される様子が観察された。これらの因子をコードする遺伝子の転写量は熱ストレスの前後で大きな変動は見られなかったが、蛍光タグラインの観察から高温処理から翻訳産物の安定性が変化することを示すデータを得た。これらの結果は、核内転写活性環境フレームワークの構築メカニズムに PolIII-CTD 修飾を介した転写制御が関与することを示唆するものであり、今後は PolIII-CTD 脱リン酸化に関わるタンパク質に焦点をあて、熱記憶構築機構における核内ダイナミクス解析を継続する。

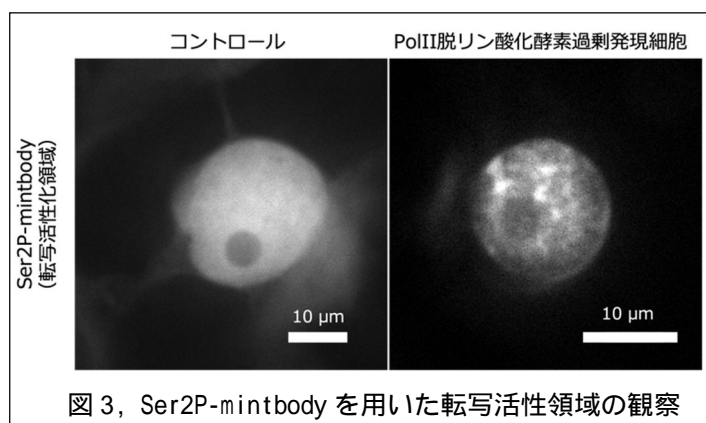


図3, Ser2P-mintbody を用いた転写活性領域の観察

引用文献

Kimura, H., Hayashi-Takanaka, Y., Stasevich, T. J. & Sato, Y. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. *Histochem. Cell Biol.* 144, 101-109 (2015).

Shibuta, M. K., Matsuoka, M. & Matsunaga, S. 2A peptides contribute to the co-expression of proteins for imaging and genome editing. *Cytologia*, 84, 107-111 (2019).

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 Mio K. Shibuta and Sachihiro Matsunaga	4. 巻 未定
2. 論文標題 Transcriptionally active regions are highly limited in the nucleus of the plant sperm cell	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 CYTOLOGIA	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shibuta Mio K., Sakamoto Takuya, Yamaoka Tamako, Yoshikawa Mayu, Kasamatsu Shusuke, Yagi Noriyoshi, Fujimoto Satoru, Suzuki Takamasa, Uchino Satoshi, Sato Yuko, Kimura Hiroshi, Matsunaga Sachihiro	4. 巻 4
2. 論文標題 A live imaging system to analyze spatiotemporal dynamics of RNA polymerase II modification in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02106-0	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mio K. Shibuta, Sachihiro Matsunaga
2. 発表標題 A live imaging system to analyze spatiotemporal dynamics of transcription activity
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濫田未央
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-C末端ドメイン脱リン酸化酵素による転写活性領域制御機構の解明
3. 学会等名 東北植物学会第12回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澁田未央
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-C末端ドメイン修飾酵素過剰発現細胞における転写活性領域の観察
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松岡慈、坂本卓也、澁田未央、佐藤優子、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるヒストン修飾H3K4me3のライブイメージング解析
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澁田未央、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-CTD修飾の核内分布の観察
3. 学会等名 日本植物形態学会第33回総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁田未央、坂本卓也、松永幸大
2. 発表標題 RNAポリメラーゼII-CTD修飾の核内分布から転写活性の高い核内領域を読み解く
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁田未央, 松岡慈、坂本卓也, 松永幸大
2. 発表標題 ヒストン修飾およびPoIII-CTD修飾のイメージングと画像解析から時空間的転写ステータスを読み解く
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁田未央、吉川真由、山岡珠子、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 RNA ポリメラーゼ II セリン2リン酸化のライブイメージングシステムの構築
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澁田未央、吉川真由、山岡珠子、坂本卓也、木村宏、松永幸大
2. 発表標題 ヒストン修飾や RNA ポリメラーゼ II 修飾のライブイメージングシステムの構築
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞内抗体プローブを用いて 遺伝子の転写が活性化している細胞を生体内で特定することに成功
https://www.yamagata-u.ac.jp/jp/information/press/20210518_01/

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
---------	---------