



令和4年12月19日



遺伝子の活性化をリアルタイムで検出する 「STREAMING-Tag」システムを開発

論文掲載

【本研究成果のポイント】

- 特定遺伝子の細胞核内局在および転写状態を生きた細胞で観察可能な新規技術を開発
- 転写を開始したRNAポリメラーゼを生細胞で観察する技術を開発
- 本技術を利用することで、遺伝子の転写状態に応じて特定のタンパク質が遺伝子近傍に集積することを世界ではじめて解明

【概要】

広島大学大学院統合生命科学研究科の落合 博准教授、大石 裕晃研究員、山本 卓教授、東京工業大学 科学技術創成研究院の木村 宏教授、九州大学 生体防御医学研究所の大川 恭行教授らのグループは、生細胞内の特定内在遺伝子の転写と関連タンパク質の同時イメージングから、転写調節因子と転写活性の時空間的な関係を明らかにしました。本研究成果は、「Nature Communications」オンライン版に令和4年12月20日の19時（日本時間）に掲載されました。

ヒトの身体は30兆個以上の細胞から構成されています。個々の細胞は、組織や器官によって機能が異なります。例えば、造血幹細胞は血液細胞を生み出す機能がありますが、毛の成長に関与する毛母細胞は血液細胞を生み出すことはできません。このような細胞の機能の違いは、「遺伝子」の発現の違いによって生み出されます。すべての細胞は同じセットのDNAを核(*1)の中に持っており、DNA上にはタンパク質を生み出すための情報(遺伝子)が記載されています。ヒトでは約3万種類の遺伝子があるとされており、細胞の種類によって発現している遺伝子セットが異なります。遺伝子はRNAへと情報が移され(転写)、RNAからタンパク質が合成(翻訳)されます。すなわち、細胞種によって生み出されるRNAやタンパク質の種類が異なり、それによって細胞の機能が異なります。

遺伝子からRNAへの転写を担うのはRNAポリメラーゼIIという酵素です。遺伝子が転写される場合、連続的に転写されるON状態と、ほとんど転写されないOFF状態が断続的に切り替わることが最近わかってきました(図1)。これまで、ON状態の遺伝子領域の周辺に、転写に関連する因子が集まる様子が観察されていましたが、OFF状態でのタンパク質因子との関係はわかっていませんでした(図2)。

そこで本研究では、遺伝子の機能を阻害することなく、特定遺伝子の細胞核内局在および転写状態を可視化できる技術、Spliced TetO REpeAt, MS2 repeat, and INtein sandwiched reporter Gene tag (STREAMING-tag)システムを確立しまし

た(図 3A)。従来の遺伝子の転写活性を計測する方法では、ON 状態のみを検出するため、OFF 状態では遺伝子が細胞内のどこにあるのか可視化できませんでした。本技術では OFF 状態でも遺伝子の場所を把握できるため、OFF 状態においてどのようなタンパク質因子が近傍に集積しているのかを調べることができます。また、STREAMING-tag システムでは、転写が開始されてもなおの状態の遺伝子の細胞核内局在を把握することができます。従来技術で用いられている「タグ」はタンパク質の翻訳に悪影響を与えることが知られており、遺伝子の最も下流の最終的にタンパク質に翻訳されない領域に挿入されることが一般的でした。そのため、実際に RNA ポリメラーゼ II によって転写が開始してから、「タグ」によって転写活性が可視化されるためには時間的なズレがあり、実際に転写開始した際の遺伝子周辺の状況を把握できないという問題がありました。STREAMING-tag では、挿入による遺伝子機能の阻害効果を最小限に抑えることで、RNA ポリメラーゼ II によって転写が開始される領域周辺に挿入することができるため、転写が ON になった直後の様子を観察できます(図 3B)。

本システムを適用したマウス胚性幹細胞で、RNA ポリメラーゼ II (RPB1) と、転写活性化に重要な役割を担っているコアクティベーター (BRD4) (*2)、メディエーター (MED19、MED22) (*3) を蛍光タンパク質で標識し、生細胞イメージングを実施しました。その結果、RPB1 と BRD4 タンパク質は、ON 状態の遺伝子の近傍でのみ集積することがわかりました(図 3C)。一方で、MED19 および MED22 に関しては、ON 状態 OFF 状態関係なく、遺伝子の近傍に集積することが明らかとなりました。

RPB1 の C 末ドメインに存在する繰返しアミノ酸配列は、転写過程でリン酸化されることが知られています。転写開始前にはリン酸化されておらず、転写開始時には 5 番目、転写開始後の伸長反応時には 2 番目のアミノ酸(セリン)がリン酸化されることがわかっています。そこで、生きた細胞で活性化型 RNA ポリメラーゼを特異的に検出するため、活性化の指標である RPB1 の C 末ドメインの 5 番目と 2 番目のセリンのリン酸化(それぞれ RNAPII S5ph、RNAPII S2ph)(図 4A)に特異的な抗体をもとに作製した遺伝子コード型の生細胞プローブ mintbody (modification-specific intracellular antibody) を利用することにしました。RNAPII S5ph は本研究の過程で新規に作製されました。

STREAMING-tag システムが適用された細胞に、RNAPII S5ph および RNAPII S2ph mintbody を発現させて、生細胞イメージングを実施しました。その結果、RNAPII S5ph および RNAPII S2ph mintbody は、RPB1 と同様に ON 状態の遺伝子の近傍で集積することがわかりました。さらに、ON 状態において RNAPII S5ph mintbody は RNAPII S2ph mintbody に比べてより遺伝子の近傍に位置することが明らかとなりました。RNAPII S5ph は転写が開始された直後の状態を意味しています。すなわち、遺伝子の転写開始点近傍に挿入された STREAMING-tag は、より転写開始点近傍の転写状態を定量できていることを示しています(図 4B)。

本研究では、新規技術 STREAMING-tag システムを利用して、ON 状態の遺伝子領域周辺に RPB1 や BRD4 がクラスターを形成することを見出しました。これら因子のクラスター化が動的な転写を制御している可能性があります。また、MED19 および MED22 に関しては、転写活性に関わらず遺伝子の近傍でクラスターを形成していました。これらは、OFF 状態において、新たに RPB1 や BRD4 のクラスターを形成するための足場となっている可能性が考えられます(図 4B)。

本研究では、マウス胚性幹細胞に発現する遺伝子の転写に着目しましたが、STREAMING-tag システムは様々な細胞種や遺伝子、生物種に応用が可能です。本技術を利用することによって、複雑で動的な転写発現制御の基本原理を明らかにすることが可能となり、生物の発生や分化、また、様々な疾患発症機構の解明などに役立つことが期待されます。

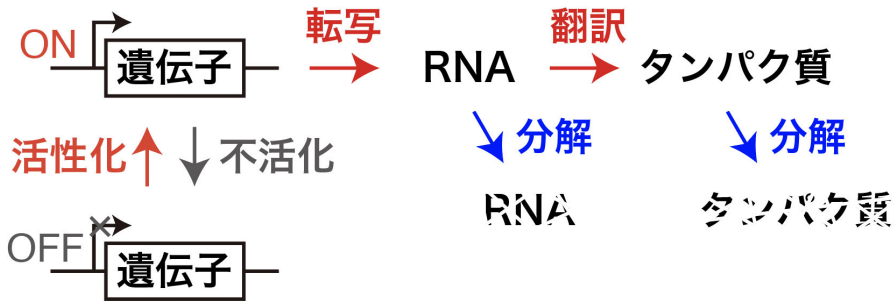


図 1: 動的な遺伝子発現状態の変化

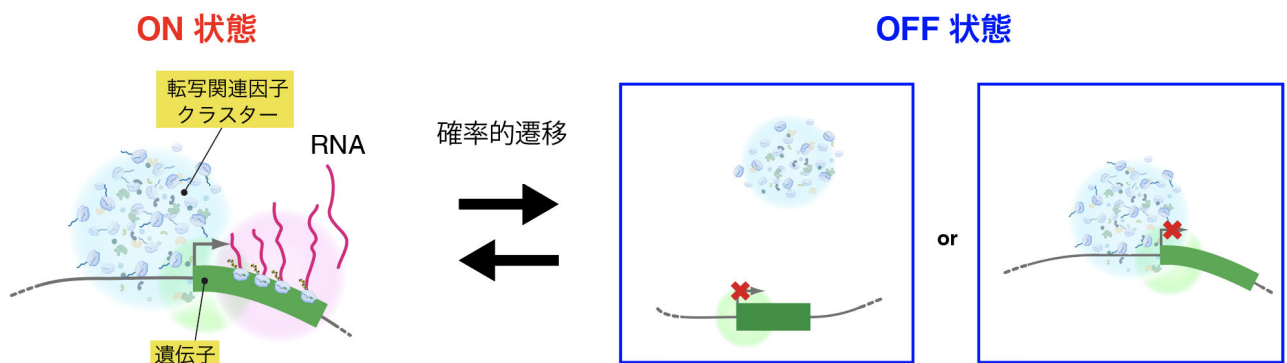


図 2: ON 状態における転写関連因子のクラスター形成。OFF 状態においてこれらクラスターが遺伝子近傍に存在しないのか、クラスターが存在し続けるのかは不明でした。そのため、転写関連因子のクラスター形成そのものが動的な転写を制御しているのかどうかは不明でした。

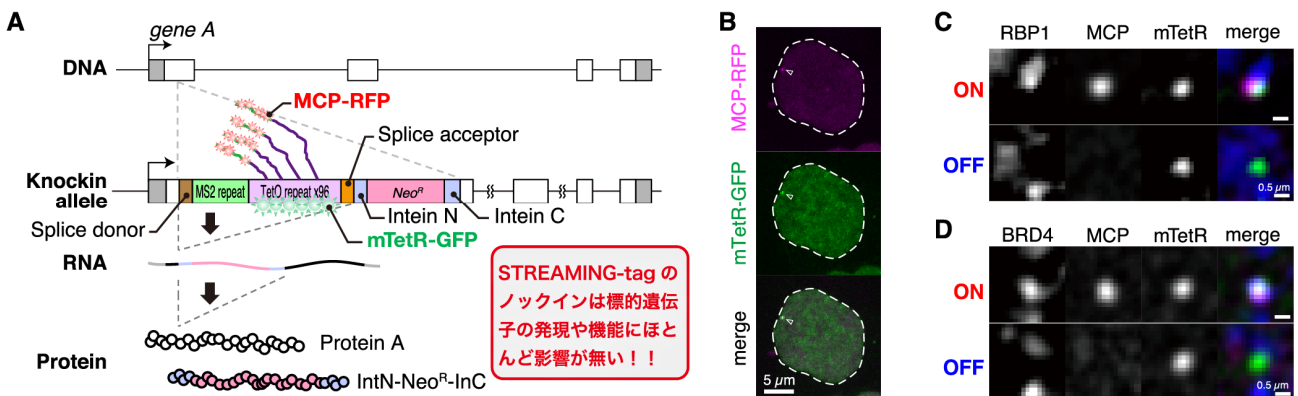


図 3: (A) STREAMING-tag システムの概要。(B) STREAMING-tag システムを利用した遺伝子領域 (mTetR-GFP) および転写活性状態 (MCP-RFP) の可視化。(C, D) 遺伝子領域の拡大写真。STREAMING-tag システムに加えて、RBP1 (C) および BRD4 (D) を同時に可視化しています。ON 状態では転写活性状態を示す MCP の輝点が認められますが、OFF 状態では認められません。

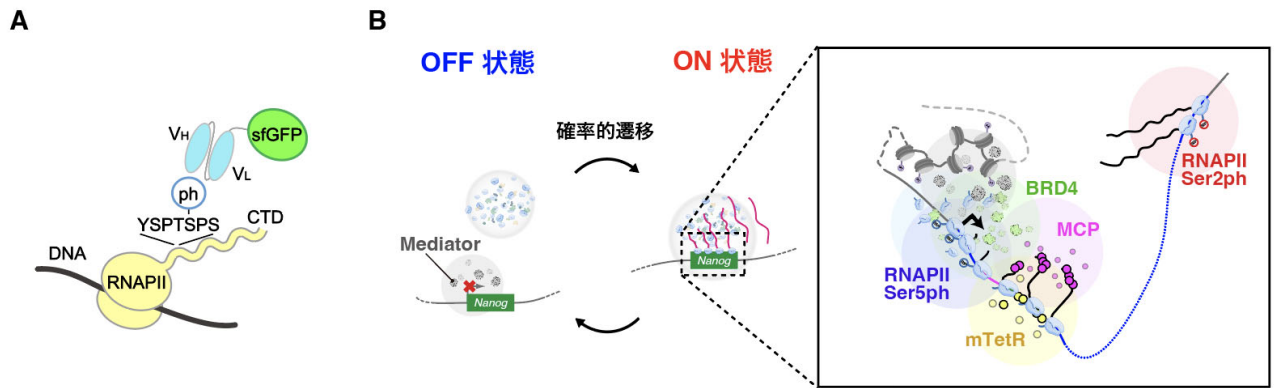


図 4: (A)RNAPII-ser5ph mintbody。(B)本研究で明らかとなった ON/OFF 状態における各種転写関連因子の遺伝子近傍での集積。

【論文情報】

掲載雑誌: Nature Communications

論文題目: STREAMING-tag system reveals spatiotemporal relationships between transcriptional regulatory factors and transcriptional activity

著者: Hiroaki Ohishi¹, Seiru Shimada¹, Satoshi Uchino³, Jieru Li⁴, Yuko Sato^{3,5}, Manabu Shintani¹, Hitoshi Owada¹, Yasuyuki Ohkawa⁶, Alexandros Pertsinidis⁴, Takashi Yamamoto^{1,2}, Hiroshi Kimura^{3,5,*}, Hiroshi Ochiai^{1,2,*}

1. 広島大学 大学院統合生命科学研究科

2. 広島大学 ゲノム編集イノベーションセンター

3. 東京工業大学 生命理工学院

4. Structural Biology Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

5. 東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

6. 九州大学 生体防御医学研究所

DOI: 10.1038/s41467-022-35286-2

【用語解説】

(*1)哺乳類細胞では、DNA は細胞内の核と呼ばれる場所に保管されています。

(*2)コアクティベーターとは、転写活性化に誘引する転写関連因子の一種です。コアクティベーターの一つとして BRD4 が知られています。

(*3)メディエーターとは、コアクティベーターの一種のタンパク質複合体です。

【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

広島大学大学院統合生命科学研究科

准教授：落合 博

TEL：082-424-4008

E-mail：ochiai*hiroshima-u.ac.jp

広島大学大学院統合生命科学研究科

教授：山本 卓

TEL：082-424-7446

E-mail：tybig*hiroshima-u.ac.jp

東京工業大学 科学技術創成研究院

教授：木村 宏

TEL：045-924-5742

E-mail：hkimura*bio.titech.ac.jp

九州大学 生体防御医学研究所

教授：大川 恭行

TEL：092-642-6216

E-mail：yohkawa*bioreg.kyushu-u.ac.jp

<広報に関すること>

広島大学広報室

E-mail：koho*office.hiroshima-u.ac.jp

東京工業大学 総務部 広報課

E-mail：media*jim.titech.ac.jp

九州大学 広報室

E-mail：r-press*jimu.kyushu-u.ac.jp

(注：*は半角@に置き換えてください)