

平成 31 年 6 月 25 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 385

氏名

野村 亨

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Northwestern University（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
核膜複合体への遺伝子局在変化が制御するストレス応答性転写調節機構の解明
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 29 日
4. 受入機関名及び部局名
Northwestern University Molecular Biosciences
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

<概要>

申請者は現在、真核生物酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における核膜複合体と熱応答性遺伝子群の相互作用を研究対象としている。近年、染色体の核内構造が転写制御に大きな影響を与えていることが示唆されている (Ay et al. 2014)。酵母では、転写誘導に応じて遺伝子領域が核膜孔複合体に移動すると、RNA ポリメラーゼが効率的に誘導されて遺伝子がより強く転写されることが報告されている (Light et al. 2010)。しかし、こうした知見は *HSP104*、*GAL1*、*TPS2* 遺伝子などでのみ観察された現象であり、核膜孔複合体に局在する遺伝子領域の網羅的な同定はされていない。その一方で、発見された *HSP104* と *TPS2* は熱応答性遺伝子であることから、熱応答性遺伝子群の転写制御と核膜孔複合体局在の関係が予想される。そこで本研究では、核膜孔複合体に局在する遺伝子領域を網羅的に同定する手法を構築することで、*CDC25* 変異株における核膜孔複合体局在遺伝子の決定を行い、さらなる熱応答性遺伝子の転写誘導を可能にする核膜孔複合体による転写制御機構の解明を目指す。また、これら誘導遺伝子は発現誘導条件下で核膜孔複合体に移動して、相互作用する。例えば、ガラクトース合成遺伝子群 (*GAL1*, 2, 4, 7, 10 など) はガラクトース存在下で核膜孔複合体まで移動して、遺伝子クラスターを作る。これら遺伝子クラスターはヒトからショウジョウバエ、酵母まで、保存されていることから、転写制御に重要な役割があると考えられるが、その意義はわかっていない。また、DNA-DNA 相互作用を既存手法は解像度の問題により、遺伝子クラスターの解析には至っていない。本研究では、遺伝子クラスターを高解像度に同定する手法の開発とその意義の解析を第二の目標とする。

<手法・実施状況>

1. 近接メチル化法による、核膜孔複合体に局在する遺伝子の網羅的同定

核膜孔タンパク質にゲノム中の「GATC」をメチル化するメチル基転移酵素 DNA adenine methyltransferase (DAM) を融合することで、核膜孔複合体近傍 GATC 配列のメチル化を試みた。定量は、メチル化 GATC のみを選択的に切断する制限酵素 DpnI を用いて、qPCR により行った。DAM 発現株ではメチル化依存的に DpnI によりゲノムが切断され、PCR による増幅が制限された。一方で DAM 非発現株では、DpnI により切断を受けないため、増幅が見られた。

2. メチル化部位の特異的増幅による次世代シーケンスライブラリーの構築

メチル化 GATC を増幅する手法は Vogel et al. により考案されて以降 10 年以上にわたり利用されてきている (図 1 左) (Vogel et al. 2007)。申請者も実際に本手法をトライして、メチル化 GATC 部位を特異的に増幅することに成功した。しかし、この手法で用いられる Ligation mediated PCR (LM PCR) はアダプターシーケンス同士でヘアピン構造を形成するため、PCR suppression を受けやすく、多くの PCR サイクルを要する。すなわち LM PCR を介したライブラリー形成ではバイアスを受けやすく、定量的な解析は難しい。そこで、申請者は LM PCR を用いない Y アダプター-PCR を考案した (図 1 右)。これはメチ

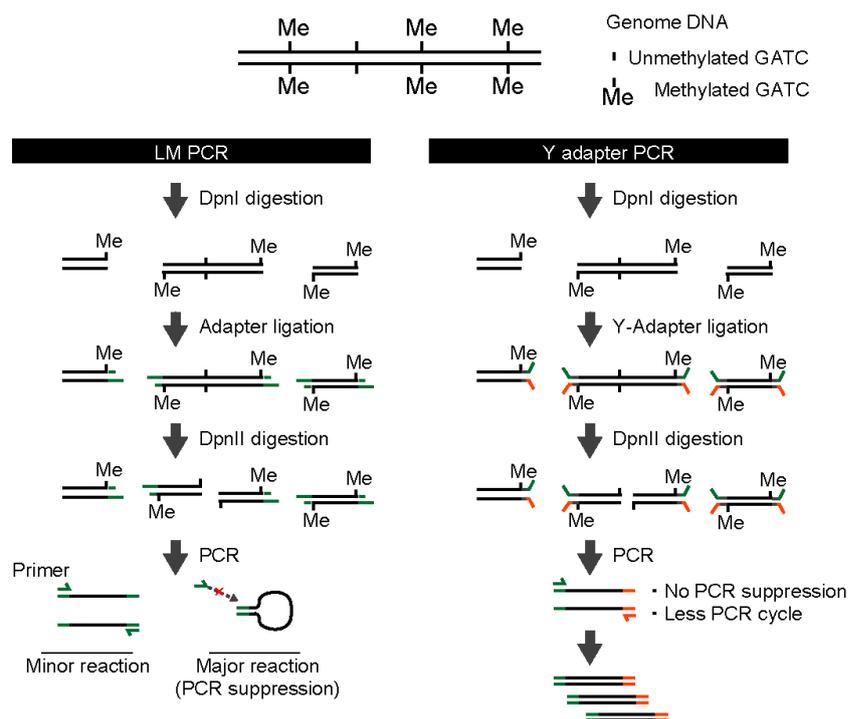


図 1 Library construction

ル化 GATC に特異的であるだけでなく、PCR サイクルが LM PCR よりも合計で 10 サイクル以上少なく、さらにヘアピン構造形成による PCR バイアスを受けない。

3-1. 近接メチル化法による、DNA-DNA 相互作用の同定

大腸菌由来の LacO 配列を挿入した酵母に GFP-LacO 融合タンパク質を発現すると、GFP-LacI が LacO に結合して、核内遺伝子局在を蛍光によりリアルタイムで観察できる。この GFP-LacI に DAM を融合すると、LacO 近傍の GATC をメチル化する (図 2)。このメチル化サイトを同定することで、特定の DNA 配列と相互作用する DNA 領域を網羅的に特定することができる。これは DNA-DNA 相互作用同定という点で既存の 4C (Circularized Chromosome Conformation Capture) と同等であるが、4C はホルムアルデヒドにより細胞固定をした後に、制限酵素によるゲノム切断、DNA ligase によるランダムな結合を行う手法である。DNA ligase により近傍配列にある DNA が結合されるため、これを一斉同定することで、DNA-DNA 相互作用を知ることができる。しかし、4C は細胞固定を必要とする。これは強力な DNA とタンパク質の架橋により、DNA の構造や核の体積そのものを変化させてしまう。細胞固定を行う ChIP-seq (タンパク質-DNA 相互作用を同定する手法) などでは、多くの偽陽性を生み出すことが知られている (Jain et al.2015)。一方で、本 DAM を用いる手法は in-vivo での DAM の反応後、細胞固定をすることなく DNA を精製するため、細胞固定による影響を受けない。また、4C は反応中に多くのロスがあるため、検出感が低い。一方で DAM 法はメチル化サイトに超高感度に反応する DpnI を用いるため、ロスが少なく検出感が高くなると予想できる。DAM 法の推定解像度は 1 Kb 程度で 4C よりも $10^3 \sim 10^6$ 倍ほど高い。以後、本手法を Trans-interchromosomal chromatin labeling (TICL) と呼ぶ。

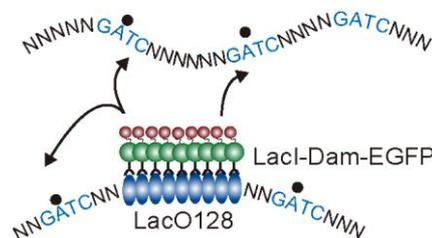


図 2 Dam による DNA 相互作用の同定

3-2. TICL による INO1 プロモーター相互作用の同定

TICL の証明として、*INO1* (イノシトール合成遺伝子) プロモーター上の Gene recruitment sequence I (GRSI) を用いた。GRSI は *INO1* 核内局在を決定する配列であり、*INO1* 誘導下 (イノシトール欠乏条件) で核膜孔複合体へと *INO1* を導く。この GRSI を *URA3* (ウラシル合成遺伝子) などに挿入すると、イノシトール欠乏化で *URA3* 遺伝子は *INO1* 遺伝子と相互作用する。この異種染色体相互作用をポジティブコントロールとして、TICL の開発を行った。まず、LacO 配列と GRSI を *URA3* に挿入した株 (LacO-GRSI) と LacO 配列のみを挿入した株 (LacO) を作成した。LacO-GRSI はイノシトール欠乏下で *INO1* と相互作用することから、*INO1* 近傍で特異的なメチル化が予想される。実際にいくつか実験条件の最適化 - 1. LacI 配列を N 末端にして、LacI-DAM-EGFP の順番で発現すること、2. DAM のバックグラウンド活性を抑えるため、非常に弱いプロモーターから LacI-DAM-EGFP を発現すること、3. qPCR の反応条件の改善 - を行ったところ、*URA3* と *INO1* の相互作用を確認することができた。また、この相互作用に必要な *NUP2*, *PUT3* などを破壊すると特異的なメチル化は見られなくなった (図 3)。

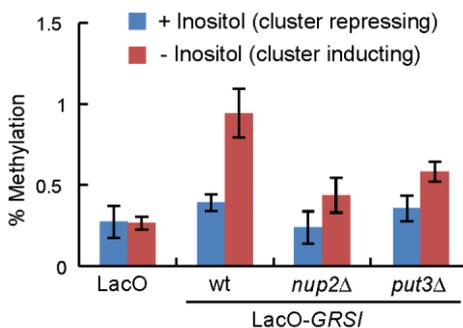


図 3 TICL による DNA 相互作用の検出

4. TICL による転写因子 Gcn4 の新規活性の同定

転写因子 Gcn4 はアミノ酸生合成の調節転写因子である。例えば *HIS4* (ヒスチジン合成遺伝子) などは活性条件下で核膜孔複合体へ移動する。この時、*GCN4* 破壊株や、Gcn4 結合配列欠損 *HIS4* 株などでは、*HIS4* は核膜孔へ局在しない。この局在変化をつかさどる Gcn4 の部位は申請者らによるすでに同定されている。この部位に変異が導入された Gcn4 positGioning domain mutant (Gcn4 pd) は *HIS4* を活性化するが、局在変化を誘導しない。また、*HIS4* を *URA3* などに導入すると、内在 *HIS4* と導入 *HIS4* は相互作用するが、Gcn4 pd ではこ

の相互作用も失われる。そこで、申請者はまず局在変化と Gcn4 pd の転写活性を調べるために、RNA-seq を行った。Gcn4 に支配される遺伝子群の転写量を比較すると、Gcn4pd は Gcn4WT ほどの活性を有していないことがわかった (図 4)。すなわち、局在変化は Gcn4 の活性制御に寄与していることが予想される。

次に TICL により *HIS4* がどのような遺伝子と相互作用しているかを調べた。まず LacO 配列を *HIS4* に導入して、LacI-DAM-EGFP を *HIS4* にリクルートした。次に *HIS3* や *HIS5* といたった *HIS4* とともに共発現する遺伝子のメチル化レベルを、Gcn4WT と Gcn4 pd を発現する株で比べた。

現在のところ少しプリミティブな結果ではあるが、Gcn4WT では予想に反して、*HIS3* や *HIS5* でメチル化レベルが減少していることが見出された。すなわち、Gcn4WT では、*HIS4* と *His3*、*HIS4* と *HIS5* は相互作用するのではなく、むしろ核内で異なる部位に局在を移すことが示された。この現象を現在 Functional segregation と呼び、現在理解を深めている。

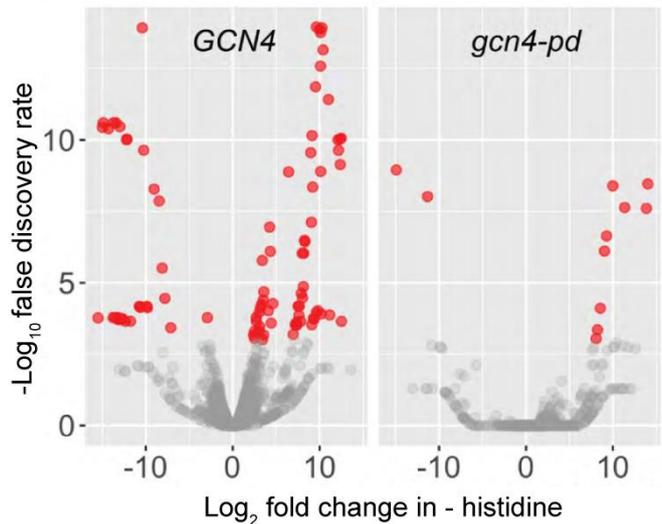


図 4 RNA-seq による GCN4wt と GCN4 pd の比較

5. 核膜孔複合体の転写促進作用の解明

多くの遺伝子は発現を誘導されると、核膜孔複合体に局在する。では、核膜孔複合体は転写にどのような影響があるのだろうか。核膜孔複合体と転写の関係を解明するために、cDTA (Comparative Dynamic Transcriptome Analysis) を用いた。cDTA では通常の RNA-seq とは異なり、細胞回収 6 分前に 4 thiouracil を加える。4 thiouracil は RNA に取り込まれるため、新規に転写された RNA をラベルすることができる。このラベルをターゲットとして、mRNA を精製して、RNA-seq に供することで新規 mRNA 合成速度を解析することができる。さらにここに濃度既知の RNA をスパイクインしておくことで、mRNA の絶対合成速度を解析することに成功した。実験条件としては、核膜孔複合体タンパク質 Nup2 を AID (Auxin inducible degron) システムによってコンディショナルに除いて (図 5)、mRNA 合成速度を比較した。

驚くべきことに Nup2 を除いたとき、多くの遺伝子の合成速度が落ちることがわかった (図 6 左)。さらに、合成速度と転写の関係を見たところ、発現が強い遺伝子ほど、合成速度が顕著に落ちるこ

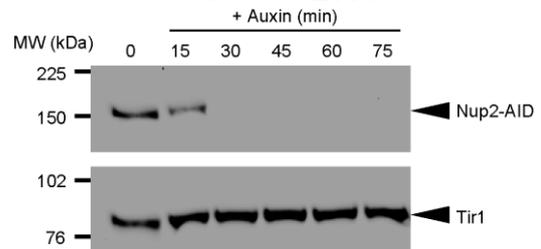


図 5 Nup2 のオーキシン下での除去

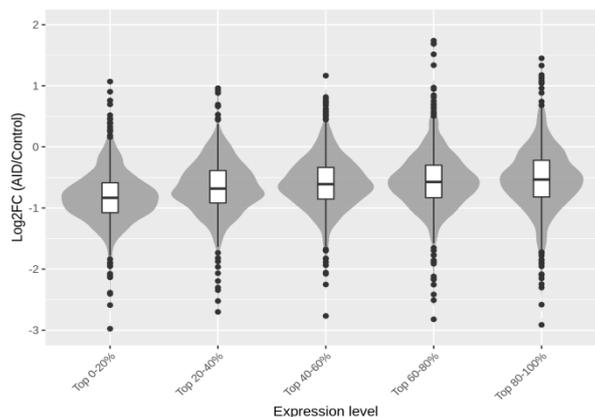
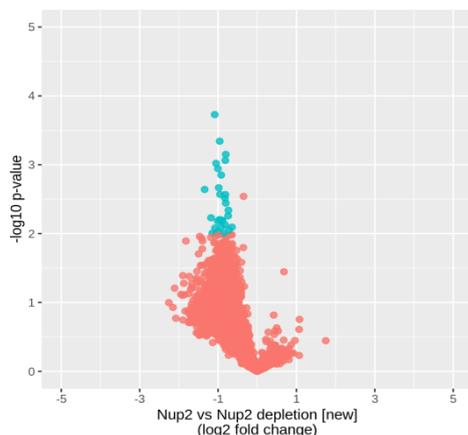


図 6 cDTA による mRNA 合成速度の解析。Nup2 を除くと多くの RNA 合成速度が低下する (左)。強発現遺伝子ほど顕著に発現速度が低下する。

とが判明した。これは強発現遺伝子ほど核膜孔複合体と相互作用する事実と一致する。すなわち、核膜孔複合体は転写活性化因子として働いていることが示された。現在は TICL による遺伝子クラスターデータを解析して、この核膜孔複合体の転写活性化作用を統合して、論文を急いでいる。