

博士論文

エンハンサーRNA の転写を介した  
遺伝子発現制御機構の解析

濱本 航多

略語	3
要旨	4
第一章 序章	6
1-1 エンハンサー領域による遺伝子転写活性の制御	7
1-2 遺伝子発現の最小単位としての転写バースト	9
1-3 核内微小環境の形成を介した転写の活性化	10
1-4 ショウジョウバエ初期発生における背腹軸形成および転写制御	12
1-5 エンハンサー領域における転写の発生	14
1-6 エンハンサー転写に関する機能仮説	14
1-7 本研究の目的	17
第二章 材料と方法	18
2-1 使用した大腸菌株と DNA および酵素類	19
2-2 使用したショウジョウバエの系統	19
2-3 ショウジョウバエの飼育に使用した餌の組成	20
2-4 phiC31 を用いた遺伝子導入方法	20
2-5 CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集方法	21
2-6 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH 法)	22
2-7 初期胚からの RNA 抽出および RT-qPCR	23
2-8 MS2/PP7 配列を用いた転写活性の可視化法	25
2-9 ライブイメージングに用いる初期胚の交配	27
2-10 MS2/PP7 配列を用いた転写活性の経時的ライブイメージング	27
2-11 Airyscan 超解像顕微鏡を用いたライブイメージング	28
2-12 画像解析に用いたソフトウェア	29
2-13 核画像の分節化処理	29
2-14 経時的な核の追跡解析	29
2-15 MS2/PP7 由来の転写活性シグナルの定量	30
2-16 転写バーストの検出および特徴量の定量	30
2-17 超解像顕微鏡画像における転写因子の局所的集合の可視化	31
2-18 発生遺伝子エンハンサーにおける TSS スコアの定量	32
2-19 内在エンハンサー転写開始点と転写因子結合部位の位置関係の解析	32
2-20 統計解析	33

<b>第三章 結果</b>	<b>34</b>
3-1 エンハンサーおよび標的遺伝子転写活性の同時可視化系の確立	35
3-2 エンハンサー転写はその転写強度依存的に標的遺伝子を抑制する	37
3-3 エンハンサー転写の過程において標的遺伝子の抑制をもたらす現象の同定	45
3-3-1 産生される eRNA には遠位に標的遺伝子を抑制する働きはない	45
3-3-2 標的遺伝子に対する対向性の転写はわずかに転写抑制をもたらす	47
3-3-3 エンハンサー領域上の転写通過が遺伝子の抑制に寄与している	50
3-3-4 <i>rho</i> NEE エンハンサー領域における転写も標的遺伝子を抑制する	53
3-3-5 エンハンサー領域における両方向性の転写も標的遺伝子を抑制する	55
3-4 エンハンサー領域への RNA pol II の侵入は転写因子の集合を妨害する	57
3-4-1 エンハンサー領域に集合する転写因子の可視化	58
3-4-2 エンハンサー領域における転写は転写因子の集合を妨げる	61
3-5 内在エンハンサーに存在する転写開始点の機能検証	64
3-5-1 発生過程において領域内で転写を引き起こすエンハンサーの同定	64
3-5-2 <i>Ubx</i> BRE のエンハンサー転写は標的遺伝子転写活性化と協調的である	65
3-5-3 <i>Ubx</i> BRE はエンハンサー転写方向の制御により活性化抑制を回避する	67
3-5-4 <i>Ubx</i> BRE においても RNA pol II の侵入は転写因子の集合妨害を導く	69
3-5-5 転写因子結合領域を通過する内在エンハンサー転写は標的遺伝子と排他的に活性化する	71
3-6 内在エンハンサーにおける転写開始点の獲得が遺伝子制御に与える影響	75
<b>第四章 考察</b>	<b>78</b>
4-1 転写因子結合領域を通過する転写を介した活性化抑制機構	80
4-2 内在ゲノムにおける非コード転写開始点の機能的意義	81
4-3 今後の展望	83
<b>補足</b>	<b>86</b>
補足-1 本研究により同定されたエンハンサー転写活性をもつエンハンサー	87
<b>引用文献</b>	<b>89</b>
<b>謝辞</b>	<b>96</b>

## 略語

A.U.	Arbitrary Unit
BFP	blue fluorescent protein
bp	base pairs
BRE	<i>bx</i> region enhancer
CAGE	cap analysis of gene expression
CBP	CREB-binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTCF	CCCTC-binding factor
DNA	deoxyribonucleic acid
DSCP	<i>Drosophila</i> synthetic core promoter
eRNA	enhancer RNA
ES	embryonic stem
FISH	fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GFP	green fluorescent protein
IDR	intrinsically disordered region
Inr	initiator
kb	kilo base pairs
Mb	mega base pairs
MCP	MS2 coat protein
NC	nuclear cycle
NEE	neurogenic ectoderm enhancer
PCP	PP7 coat protein
PCR	polymerase chain reaction
PRE	polycomb group response elements
<i>rho</i>	<i>rhomboid</i>
RNA	ribonucleic acid
RNA pol II	RNA polymerase II
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
<i>sna</i>	<i>snail</i>
<i>sog</i>	<i>short gastrulation</i>
SV40	simian virus 40
TAD	Topologically Associating Domain
TSS	transcription start site
<i>Ubx</i>	<i>Ultrabithorax</i>

## 要旨

細胞は発生過程や環境応答において最適なタンパク質発現を実現するため、時空間的に厳密な転写制御を行う必要がある。その制御において中心的な役割を担うのはエンハンサーと呼ばれるゲノム中の調節領域である。エンハンサーの活性化機構については、配列特異的な転写因子の結合や、プロモーター領域との立体的相互作用の重要性が示唆されている。近年、非コード DNA 領域であるエンハンサーから eRNA (enhancer RNA) と呼ばれるノンコーディング RNA が転写されること (エンハンサー転写) が相次いで報告されている。エンハンサー転写はゲノム上で極めて広範に生じており、ショウジョウバエからヒトに至る幅広い種で起こる普遍的な現象である。また、エンハンサー転写が定まった転写開始点から始まること、エンハンサーおよび標的遺伝子の転写活性に正の相関があることが明らかになるなど、遺伝子発現制御へのエンハンサー転写の関与が注目されている。一方で、従来のエンハンサー転写の解析は細胞集団における eRNA 量の計測に留まっており、分解速度の速い eRNA では正確な転写活性の定量解析は困難であった。加えて、1 細胞内でエンハンサーおよび標的遺伝子の転写活性を同時追跡する手法も存在しないために、エンハンサー転写が標的遺伝子の転写活性に影響を与えるのかという因果関係は未解明のままである。

本研究では初めに、エンハンサーおよび標的遺伝子の転写活性を同時かつ経時的に可視化する新規ライブイメージング手法の構築を目指した。転写活性の可視化には MS2/PP7 RNA ステムループを利用し、エンハンサーの上流に転写開始モチーフと PP7 を挿入することでエンハンサーの転写誘導および可視化を実現した。さらに、エンハンサーの下流にプロモーターおよび MS2 配列を含む標的遺伝子を配置することで、エンハンサーと標的遺伝子転写活性の同時可視化に成功した。

次に、確立したアッセイ系を駆使し、エンハンサー転写が標的遺伝子の発現に影響をおよぼす可能性を定量的に検証した。エンハンサー上流に配置する転写開始モチーフの有無および改変によりエンハンサー転写の強度変化が標的遺伝子の転写活性に与える影響を検証したところ、エンハンサー転写活性の上昇は標的遺伝子の転写抑制を導いていた。このときイメージングデータから個々の転写バーストの特徴量を解析したところ、エンハンサー転写により標的遺伝子の活性化が遅延し、活性化細胞の割合も減少することにより抑制が生じていることも判明した。エンハンサー転写様式の改変により標的遺伝子の抑制に寄与する要素を検証したところ、産生 eRNA やエンハンサー付近での転写の発生だけでは標的遺伝子活性化の抑制は生じず、エンハンサー上を転写機構が通過する過程そのものが抑制をもたらすことを解明した。さらに、超解像顕微鏡を用いた観察により、転写抑制の原因として転写機構の通過によるエンハンサー上への転写因子集合の妨害が示唆された。

生理的背景におけるエンハンサー転写の役割を調べるため、胚発生に関わる *Ubx* 遺伝子の BRE エンハンサーを用いてエンハンサーおよび標的遺伝子の転写活性を可視化した。その結果、両者の転写活性が同一細胞内でともに観察されたことから、BRE ではエンハンサー転写が標的遺伝子の活性化と協調的に生じていた。転写因子結合領域に対して逆方向にエンハンサー転写が開始するため抑制的效果が認められなかったと仮説を立て、転写因子結合領域を転写が通過するように転写開始点を付加した。それにより標的遺伝子の抑制が見られたことから、内在エンハンサーにおいてもエンハンサー転写による活性化抑制は働いていることが判明した。また、内在的に転写因子結合領域へ転写が生じているエンハンサーとして *hairy* 遺伝子のエンハンサーを観察したところ、エンハンサー転写活性化時に標的遺伝子は抑制されていた。つまり、内在エンハンサーはエンハンサー転写の位置や方向の制御を通じて抑制効果を回避・利用することで、適切に遺伝子発現量を調節している可能性が示された。こうした遺伝子発現の制御機構が進化の過程で生じていることを考慮し、内在エンハンサー領域における新規転写開始点の形成を試みた。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により *rho* 遺伝子エンハンサーに転写開始点を付加したところ、内在 *rho* 遺伝子はその発現領域を維持したまま転写活性を顕著に低下させた。

本研究により、これまで種々の制御により生じる結果とみなされていた転写という現象に関して、その調節領域への侵入が転写活性化を抑制しうることを明らかにした。さらに、その抑制効果が転写の開始を完全に喪失させる強度ではないことから、進化の過程において転写調節領域における転写開始点の形成が遺伝子発現量の最適化に寄与してきた可能性を提案することができた。

# 第一章

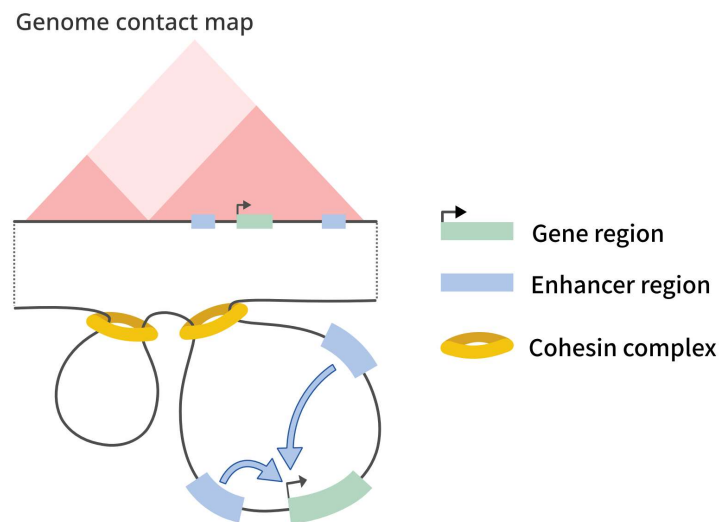
## 序章

## 1-1 エンハンサー領域による遺伝子転写活性の制御

細胞は周囲の環境に対する応答やプログラムされた発生の過程において適切に遺伝子の発現量を制御する必要がある。遺伝子発現の活性化を担う因子としてゲノム上のエンハンサーと呼ばれる調節領域が存在する。最初に同定されたエンハンサーは 40 年以上前に同定された SV40 (simian virus 40)ゲノム由来の 72 塩基対の繰り返し配列であり、距離や方向非依存的に近傍遺伝子発現を活性化する DNA 断片として同定された<sup>1</sup>。さらにその数年後には真核生物ゲノムにおいても免疫グロブリン遺伝子のイントロン領域にエンハンサー断片が同定された<sup>2-4</sup>。現在、ヒトでは約 92 万個<sup>5</sup>、ショウジョウバエでは約 5~10 万個<sup>6</sup>のエンハンサーの存在が推定されている。これは遺伝子数と比較してヒトではおよそ 40 倍、ショウジョウバエではおよそ 4~8 倍の数であり、ひとつの遺伝子が複数のエンハンサーにより緻密に制御されている<sup>7</sup>。例えばショウジョウバエでは、*sog* (*short gastrulation*) 遺伝子において近位および遠位に存在しているエンハンサーが、個別には異なる活性化領域をもちながら協調的に *sog* 遺伝子の発現領域を決定している<sup>8</sup>。体細胞変異を介したエンハンサー領域の異常な活性化や新規エンハンサーの発生はがん化に繋がる例も知られ、生体内における厳密な転写調節の重要性が明らかになりつつある<sup>9,10</sup>。

エンハンサー領域の活性化には転写因子の結合が必要である。多くのエンハンサーは複数の転写因子結合領域をもち、それらが協調的あるいは競合的に働くことで活性が制御されている<sup>11,12</sup>。また、エンハンサーが活性化する標的遺伝子の特異性は、プロモーター配列<sup>13,14</sup>やクロマチン上における立体的な構造形成<sup>15</sup>によって決定している。クロマチン上で形成される構造として、Hi-C などを用いた解析から TAD (Topologically Associating Domain) と呼ばれる、その内部において高頻度に相互作用が観察される数 kb から 1Mb ほどの領域が観察されている<sup>16,17</sup>。TAD 領域を規定する因子として、リング状の構造をもつコヒーシン複合体や、インシュレーター配列と呼ばれる領域に結合する CTCF (CCCTC-binding factor) などが知られる。コヒーシンの作用機序に関しては DNA をくぶりだすようにして対向する CTCF 結合モチーフ間で DNA ループを形成する

extrusion モデルが提唱されている<sup>18</sup>。形成された TAD 内において活性化したエンハンサーが標的遺伝子プロモーターと相互作用することで転写の活性化が行われる<sup>19-25</sup> (図 1)。



**図 1 ゲノム上の立体構造形成を介して転写は活性化される**

ゲノム上では TAD と呼ばれる高次構造が形成されている。Hi-C などの実験から得られるゲノムコンタクトマップ上で、TAD はその内部で高頻度に領域間相互作用を示す三角形として認識できる。TAD 領域の末端は TAD 境界と呼ばれ、多くの場合にインシュレーター配列が存在している。インシュレーター配列には CTCF やコヒーシン複合体が結合しており、インシュレーター配列に隣接する TAD 間を立体的に隔離している。TAD 内においてさらにエンハンサーおよびプロモーター領域が相互作用することにより転写が活性化される。

## 1-2 遺伝子発現の最小単位としての転写バースト

遺伝子の転写は連続的に起こるわけではなく、断続的に活性状態と不活性状態を繰り返すバースト状の活性動態を示し、これは転写バーストと呼ばれる（図 2）。転写バーストはショウジョウバエにおいて DNA 上に不均等に RNA ポリメラーゼ II (RNA pol II) が並ぶ電子顕微鏡写真での観察から、その存在が明らかとなった<sup>26</sup>。現在では RNA の 1 分子イメージングや転写活性のリアルタイム観察により、大腸菌からヒトまで広範な生物種で転写バーストが生じることが知られる<sup>27-29</sup>。ある遺伝子の発現量は、転写バーストが起こる頻度および個々の転写バーストのサイズによって決定される。ここで転写バーストのサイズとはさらに、活性化状態が続く持続時間と、活性化時に転写を開始した RNA pol II の数によって決まる転写バーストの最大強度から構成される。これら転写バーストの特徴量の制御には、遺伝子およびエンハンサー間の距離、プロモーターに存在するモチーフ種などが寄与している<sup>30,31</sup>。一方で、遺伝子間での転写バーストプロファイルの違いを生み出すメカニズムについてはいまだ不明点が多く残っている。

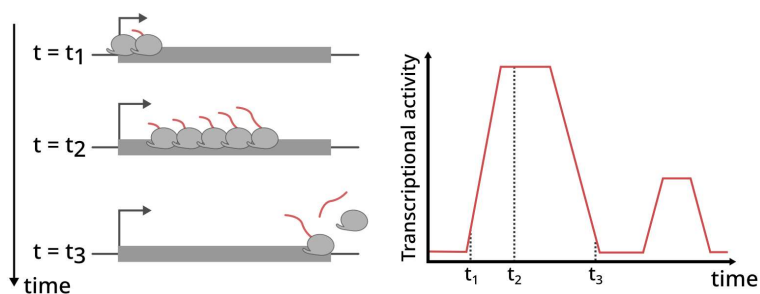


図 2 転写は断続的なバースト上のダイナミクスを示す

ある遺伝子における転写活性の追跡結果を示した模式図。転写は複数の RNA pol II が一斉に転写を開始する転写バーストが断続的に起こることで進む。一度の転写バーストの間における転写活性つまり新規 RNA 合成活性は、バーストの開始時 ( $t=t_1$ ) から上昇し、すべての RNA pol II が転写を開始した時点で最も高くなり ( $t=t_2$ )、先頭の RNA pol II が転写終結した時点から減少しはじめ、最後の RNA pol II が転写終結するときに基底レベルにまで下がる ( $t=t_3$ )。

### 1-3 核内微小環境の形成を介した転写の活性化

1-1 で述べたエンハンサーおよびプロモーター間の相互作用に関して、古典的には転写因子やコアクチベーターを介した物理的な相互作用が想定されてきた<sup>32</sup>。しかし、近年の研究から単一のエンハンサーが複数の遺伝子を同時活性化することが認められ<sup>30</sup>、エンハンサーによる遺伝子の転写活性化は単純な一対一の対応ではないことが示唆された。さらに、転写活性化時のエンハンサーおよびプロモーター間距離が約 200~400 nm ほど離れていることが明らかとなり<sup>33-36</sup>、これは物理的相互作用から予想される距離よりもはるかに離れていた。したがって現在では、エンハンサーとプロモーター間の相互作用は物理的なものではないと予想されている。同時に、転写因子や RNA pol II が多価的な相互作用を介した核内微小環境を形成していることが明らかになり、その微小環境が転写ハブとして働くことによるゲノム領域間相互作用が提唱されつつある<sup>37</sup> (図 3)。RNA pol II の C 末端ドメインや転写因子の多くは、天然変性領域 (IDR, intrinsically disordered region) と呼ばれる決まった構造をとらない領域を含んでいる。天然変性領域同士は多価的な相互作用により液-液相分離を促しており、RNA pol II は超解像顕微鏡の観察により相分離を介した液滴を形成することが報告されている<sup>38,39</sup>。RNA pol II が形成する液滴内にはメディエーターのようなコアクチベーターも同時に含まれていることや<sup>40</sup>、複数のエンハンサーが 1 か所に集まっている様子が知られていることから<sup>41</sup>、RNA pol II や転写因子が形成する核内微小環境が転写活性化を担う転写ハブとしての機能を有することが示唆されている。

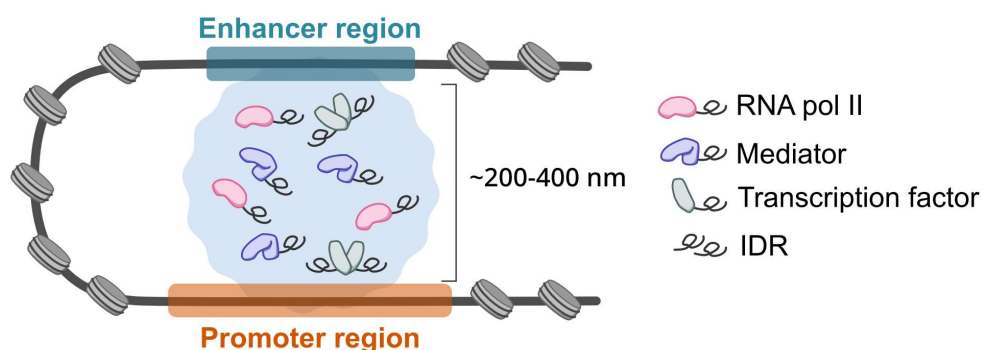


図 3 エンハンサーおよびプロモーター領域は転写ハブを介して相互作用する

(図 3)

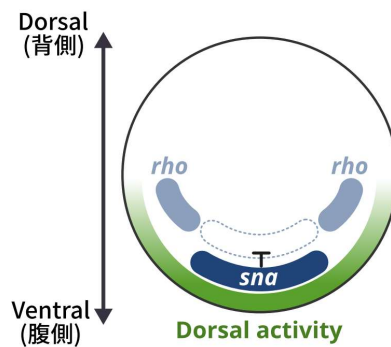
エンハンサーおよび遺伝子領域間の相互作用に関するモデル。核内では RNA pol II や転写因子、メディエーターなどのコアクチベーターが高濃度に集合する微小環境が形成されている。その微小環境が転写ハブとして機能することでエンハンサーおよび標的遺伝子の相互作用が実現していると考えられている。

#### 1-4 ショウジョウバエ初期発生における背腹軸形成および転写制御

ショウジョウバエ初期胚においては、表割により同調的な核分裂が引き起こされる。NC10（核分裂サイクル 10）の時期には一部の核が極細胞として胚後極へ移行し、同時にそのほかの核は卵表層へ移行し均等に並ぶ。以降は核分裂の速度が徐々に緩み、NC14 では細胞膜形成が開始すると同時に、大多数の胚性遺伝子が体軸に沿ったパターンで発現を開始する。NC14 後期には原腸陥入も起こり、NC14 は 1 時間以上続く。

ショウジョウバエ初期胚では、母性由来 mRNA から翻訳された Dorsal タンパク質が腹側領域でのみ核内輸送されることで背腹軸形成が開始される<sup>42</sup>。NC14 において、パイオニア転写因子 Zelda による胚性遺伝子活性化が起こり<sup>43</sup>、初期胚で初めて転写が開始される。腹側領域では、Dorsal が転写因子として機能し、*sna*(*snail*) および *rho*(*rhomboid*) を含む種々の遺伝子を背腹軸に沿った帯状の領域で転写活性化する（図 4）。さらに発現した Snail タンパク質は転写因子として働き、予定中胚葉細胞において *rhomboid* 遺伝子を含む非中胚葉性遺伝子のエンハンサーに結合することでその転写を抑制する。これにより背腹軸に沿った発現パターンが実現し、腹側領域において中胚葉および中外胚葉領域が決定される。

この過程において、NC11 の時点でエンハンサー同士の集合が開始していることが報告されており<sup>41</sup>、その集合には Zelda が寄与している。また、Zelda が複数分子集合したクラスターを形成することから<sup>44</sup>、転写活性化前の時点において Zelda を介したエンハンサーの集合および活性化が標的遺伝子とは隔離された空間で生じていることが示唆されている。転写活性化の際には Zelda によって転写活性化領域における Dorsal のクラスター形成が促進されており<sup>45</sup>、発生過程においても転写ハブの形成を介した標的遺伝子の転写活性化が観察されている。



**図 4 ショウジョウバエ初期胚における *sna* および *rho* 遺伝子の転写制御**

ショウジョウバエ初期胚での Dorsal 活性化領域および *sna*、*rho* 遺伝子の発現領域（頭尾軸に対して垂直な平面上で図示）。転写因子 Dorsal の活性はタンパク質レベルで制御されており、核内濃度は腹側で最も活性が高い濃度勾配が形成されている。*sna* 遺伝子は最も腹側の領域で発現し、Snail タンパク質による発現抑制を受ける *rho* 遺伝子はその側方で発現する。

## 1-5 エンハンサー領域における転写の発生

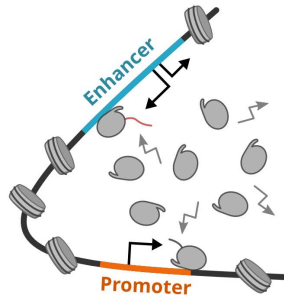
近年、転写活性化を担うエンハンサー自身からも転写（エンハンサー転写）が起きており、eRNA（enhancer RNA）と呼ばれるノンコーディング RNA を産生していることが相次いで報告された<sup>46,47</sup>。エンハンサー転写はゲノム内において極めて広範に生じており、ショウジョウバエからヒトに至るまで様々な生物種で観察される普遍的な現象である<sup>46-51</sup>。ゲノム網羅的なエンハンサー転写活性の評価により、高い転写活性化能を有するエンハンサーでは自己転写活性も高いという相関が示された<sup>46,47,52,53</sup>。一方で、発生遺伝子のエンハンサーだけを対象とした解析においては、エンハンサーの自己転写活性と転写活性化能は負に相関するという結果も示されている<sup>54</sup>。こうした矛盾する結果が得られているものの、エンハンサー転写開始点は Inr や TATA といったプロモーターモチーフ配列を伴い進化的に保存されていたことから<sup>55,56</sup>、遺伝子の転写制御におけるエンハンサー転写の機能的意義が注目されている。エンハンサー転写の特徴として、スプライシングやポリ A 配列付加による転写後調節は受けず、その転写長はヒトでは約 350bp 前後が最も多く、遺伝子と比べ早期に転写が終結する<sup>55</sup>。この早期転写終結には mRNA の転写終結にも関わるインテグレーター複合体が関与しており<sup>57</sup>、転写終了後の eRNA の早期分解にはエクソソームの関与が示唆されている<sup>55,58,59</sup>。また、エンハンサー領域に存在する転写開始点は背中合わせの両方向性に配置されている頻度が高い<sup>55,60</sup>。ただし、ヒトやマウスではエンハンサー転写のみならず遺伝子領域においても高頻度に逆鎖方向への転写が生じる一方、ショウジョウバエではいずれの場合も一方向性が強いことが知られる<sup>49,54</sup>。

## 1-6 エンハンサー転写に関する機能仮説

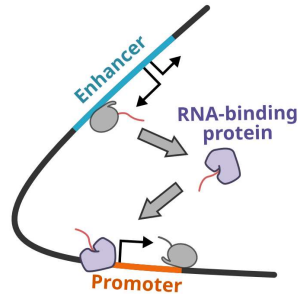
エンハンサー領域における転写が転写制御に影響をおよぼす機能様式について、現在では大きく 3 つの可能性が議論されている<sup>61</sup>（図 5）。ひとつ目は、エンハンサー領域での転写および産生 eRNA は標的遺伝子の活性化過程における副産物だとするものである。エンハンサー領域ではクロマチンが弛緩しアクセシビリティが高くなっているた

め、非特異的な転写開始が生じている可能性が予想されている。ふたつ目は、エンハンサー転写によって産生された eRNA がノンコーディング RNA として機能する可能性がある。一部の eRNA については産生 eRNA がタンパク質と結合することで機能する例が既に知られている。一例として、エンハンサー領域においてヒストンのアセチル化に関わる p300/CBP は、エンハンサー領域で eRNA と結合することによりヒストンアセチル基転移酵素活性が制御されている<sup>62</sup>。また、eRNA を産生しているエンハンサーおよび標的遺伝子との間のループ形成の促進や<sup>63</sup>、コヒーシンへの結合を介して異なる染色体間でトランスに Myogenin 遺伝子を活性化することが知られる<sup>64</sup>。最後に、エンハンサー転写が産生 eRNA 非依存的かつ転写依存的に機能を発揮する可能性が議論されている。転写は複数因子からなる巨大な複合体である RNA pol II により DNA が開裂されながら進む過程であり、その過程がエンハンサー領域の転写調節機能に影響を与える可能性は十分に考えられる。マウス ES 細胞を使用した研究では、イントロン領域から生じるエンハンサー転写が対向する標的遺伝子転写と衝突することにより抑制的な効果をもたらすことが示唆されている<sup>65</sup>。また、エンハンサー転写開始点の付近では、非鋳型 DNA 鎖と鋳型 DNA および新規合成 RNA からなるハイブリッド鎖で形成される R ループが高頻度に形成されており<sup>58,66</sup>、R ループの形成を介して転写活性化に対して促進的に働く可能性が考えられている<sup>67</sup>。

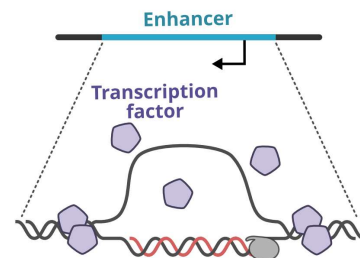
Noise effect



RNA-dependent effect



Transcription-dependent effect



### 図 5 エンハンサー転写の機能に関する仮説

エンハンサー転写の機能に関する仮説の模式図。ひとつは、エンハンサーの活性化過程においてクロマチンが緩和することで生じる非機能性の副産物だとする説 (Noise effect)。ふたつ目は、エンハンサー転写により産生される eRNA が転写制御に関わる機能を有しているという説 (RNA-dependent effect)。最後に、eRNA 非依存的にエンハンサー転写の過程そのものが転写調節に影響しているとする説 (Transcription-dependent effect)。

## 1-7 本研究の目的

エンハンサー転写および標的遺伝子転写活性の関係については、ゲノム網羅的な解析により多くの研究から正の相関が観察されてきた。一方で最近の研究から、ショウジョウバエの発生関連遺伝子を標的とするエンハンサーでは、エンハンサー転写と標的遺伝子転写活性の間に弱い負の相関が見られた。これら矛盾する観察を理解するため、エンハンサー転写および標的遺伝子転写の因果関係を解明することを目指す。本研究ではまず、MS2/PP7 リピート配列を用いた転写活性の可視化により、生細胞においてエンハンサー転写および標的遺伝子転写活性の同時かつリアルタイム観察を実現する。さらに遺伝学的な手法を駆使することにより、エンハンサー転写が標的遺伝子に与える影響を定量する。また、エンハンサー転写の方向や配置を改変することにより、観察された転写制御への影響に寄与する現象の同定を行う。特に本研究では従来解析が十分に行われていなかった、エンハンサー領域において転写が発生する過程が機能的意義を有している可能性に注目して解析を進める。同定された現象については、超解像顕微鏡による生細胞での観察により分子機構の解明にまで迫る。

同時に、上記検証により明らかとなったエンハンサー転写の効果について、内在エンハンサー転写ではどのように利用あるいは回避しているのか検証を行う。公開 NGS データの再解析を基にエンハンサー転写を示す内在エンハンサーを同定し、その転写活性および標的遺伝子転写活性をライブイメージングにより定量する。最後には、CRISPR/Cas9 を用いた内在ゲノム編集を介して、エンハンサー領域における新規転写開始点の発生が転写調節へもたらす影響を確かめる。

# 第二章

## 材料と方法

## 2-1 使用した大腸菌株と DNA および酵素類

プラスミド保持菌として大腸菌株は DH5α 株を使用した。

クローニングに用いたベクターは、pBlueScript II、pBφ、pCFDIII をバックボーンとして使用した。うち、pBφ はレポーター配列を含むプラスミドのマイクロインジェクション、pCFDIII は gRNA 発現プラスミドのマイクロインジェクションに使用した。

用いた酵素は、KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) および T4 DNA Ligase (Takara) である。また、制限酵素は主に Thermo Fisher Scientific 社のものを使用した。

## 2-2 使用したショウジョウバエの系統

本研究では研究室において既に使用されていたショウジョウバエ系統として以下の系統を使用した。

*nanos>NLS-mCherry-PCP-NES, His2Av-eBFP2/CyO; nanos>MCP-GFP*<sup>68</sup>

*nanos>NLS-mCherry-PCP-NES, His2Av-eBFP2/CyO*<sup>68</sup>

*nanos>NLS-mCherry-MCP-NES, nanos>NLS-mTagBFP2-PCP-NES*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer*<sup>69</sup>

*sna-MS2*

*rho-MS2*

本研究では新たに以下のショウジョウバエ系統を作製して使用した。

vk00033 系統に遺伝子導入することで樹立した系統は次のとおりである。

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-PP7-No TSS*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-PP7-TSS*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-PP7-Inverted TSS*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-PP7-TSS<sup>weak</sup>*

*TSS-PP7-sna shadow enhancer*

*DSCP-MS2-yellow-TSS-PP7-sna shadow enhancer*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-TSS-PP7*

*DSCP-MS2-yellow-Ubx BRE-PP7*

*DSCP-MS2-yellow-inverted Ubx BRE-PP7*

*DSCP-MS2-yellow-inverted Ubx BRE-PP7-TSS*

*DSCP-MS2-yellow-rho NEE-PP7-No TSS*

*DSCP-MS2-yellow-rho NEE-PP7-TSS*

*DSCP-MS2-yellow-rho NEE-TSS-PP7*

*DSCP-MS2-yellow-2.5kb spacer-sna shadow enhancer-PP7-No TSS*

*DSCP-MS2-yellow-2.5kb spacer-sna shadow enhancer-PP7-TSS*

*DSCP-MS2-yellow-sna shadow enhancer-TSS<sup>inverted</sup>-TSS-PP7*

CRISPR/Cas9 を用いた内在遺伝子の編集により樹立した系統は以下のとおりである。

*dorsal-GFP*

*zelda-GFP*

*No TSS-PP7-rho NEE-rho-MS2*

*TSS-PP7-rho NEE-rho-MS2*

## 2-3 ショウジョウバエの飼育に使用した餌の組成

ショウジョウバエの飼育に使用した餌の組成は以下の通りである。

/14L	
ブドウ糖	1000 g
コーンミール	1000 g
小麦胚芽	400 g
ドライイースト	500 g
寒天粉末	112 g
酒石酸カリウム水和物	152.88 g
塩化カルシウム	12.6 g
10% ニパジン/エタノール	33.8g/304 ml

## 2-4 phiC31 を用いた遺伝子導入方法

本研究では配列特異的リコンビナーゼである phiC31 を使用し、3 番染色体に標的である attP 領域をもつ *VK00033* 系統<sup>70</sup> にマイクロインジェクションすることで、領域特異的に遺伝子導入を誘導した。phiC31 タンパク質は *vas-phiC31* 系統<sup>71</sup> を使用することで母性タンパク質として供給した。上記ショウジョウバエ系統をケージに隔離して 24 時間以上経過したのち、受精後 0-1 時間の初期胚を回収した。回収した初期胚は家庭用漂白剤で約 2 分間処理し、コリオン膜を除去した。カバーガラス上に胚を並べたのち、

シリカゲルを入れた密閉容器内で約 8 分間乾燥させた。その後、過度の乾燥を防ぐため FL-100-1000CS シリコンオイル（信越シリコン）に胚全体を浸した。インジェクションには FemtoJet（Eppendorf）および M-152 マニピュレーター（NARISHIGE）を使用した。インジェクション溶液には通常、約 900 ng/ml DNA を 5 mM KCl、0.1 mM リン酸塩緩衝液（pH6.8）中に希釈して使用した。遺伝子導入されたショウジョウバエの同定には mini white をマーカーとして使用した。

## 2-5 CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集方法

内在性 Dorsal タンパク質に GFP 標識を付加するため、対応するガイド RNA を発現する pCFD3 プラスミド 1 種および *pBS-GFP-3xFLAG-3xP3-dsRed* ドナープラスミドを *nanos-Cas9* ショウジョウバエ系統<sup>72</sup> にインジェクションした。インジェクション溶液は、約 500 ng/ml pCFD3 ガイド RNA プラスミド DNA および約 800 ng/ml *pBS-GFP-3xFLAG-3xP3-dsRed* ドナープラスミド DNA を 5 mM KCl、0.1 mM リン酸塩緩衝液（pH6.8）中に希釈して使用した。遺伝子編集が生じたショウジョウバエの同定には 3xP3-dsRed をマーカーとして使用した。得られた *dorsal-GFP* ハエ系統はさらに *y[1]/w[67c23] P{y[+mDint2]=Crey}1b; sna[Sco]/CyO* (BDSC #766) 系統と交配させ、Cre/loxP システムにより 3xP3-dsRed マーカーを取り除いた。

内在 *rho* NEE エンハンサーに対する遺伝子編集のため、対応するガイド RNA を発現する pCFD3 プラスミド 2 種、*pBS-3xP3-GFP-TSS/No TSS-PP7-rho NEE* ドナープラスミド および pBS-Hsp70-Cas9 プラスミド (addgene #46294) をホモ接合の *rho-MS2* ショウジョウバエ系統（深谷雄志博士より提供）へインジェクションした。インジェクション溶液は、約 200 ng/ml pCFD3 ガイド RNA プラスミド DNA、約 300 ng/ml pBS Cas9 発現プラスミド DNA および約 400 ng/ml *pBS-3xP3-GFP-TSS/No TSS-PP7-rho NEE* ドナープラスミド DNA を 5 mM KCl、0.1 mM リン酸塩緩衝液（pH6.8）中に希釈して使用した。遺伝子編集が生じたショウジョウバエの同定には 3xP3-GFP をマーカーとして使用した。

いずれもインジェクションの方法は上述の通りである。

## 2-6 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH 法)

Digoxigenin (DIG RNA ラベリングミックス, Roche) あるいは Biotin (Biotin RNA ラベリングミックス, Roche) で標識されたアンチセンス RNA プローブは、in vitro Transcription T7 Kit (タカラバイオ) を用いて合成された。本実験では、*sna* mRNA に対するプローブは Biotin、*sna* shadow エンハンサーRNA に対するプローブは Digoxigenin で標識した。*sna* mRNA に対するプローブは *yw* ゲノム DNA、*sna* shadow エンハンサー RNA に対するプローブは *pbphi-TSS-PP7-sna shadow enhancer* プラスミドを鋳型として、以下のプライマーを使用して PCR 増幅した。

*sna* mRNA\_Fwd 5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGCAGTTGGCTTAACAGTACTG-3'  
*sna* mRNA\_Rev 5'-ACCTGTCACAGCCACCTCAGC-3'

*sna* shadow\_Fwd 5'-GCATTGAGGTGTTTTGTTGGTCAAC-3'  
*sna* shadow\_Rev 5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGTAAATTCCGAT TCTTGT-3'

染色に使用するショウジョウバエ胚の回収は次のように行った。受精後 2-4 時間の初期胚を回収し、コリオン膜を除去したのち固定液 (1 ml 5x PBS、4 ml 37% ホルムアルデヒド、5 ml ヘプタン) に浸し室温で 25 分間激しく振盪した。水層を吸引除去し、約 10 ml の 100%メタノールを加え 1 分間激しく振盪することでビテリン膜を除去した。さらにメタノールで洗い流したのち-30°Cで染色開始まで保管した。

染色開始時にエタノールへ置換したのち、90% キシレン/10% エタノール液に交換し 1 時間振盪した。エタノールおよびメタノールで洗浄後、50% メタノール/2.6% ホルムアルデヒド/PBST (10% Tween-20/PBS) でさらに 25 分間固定した。PBST で洗浄したのち、50% PBST/50% ハイブリダイゼーション液 (50% ホルムアミド、5x SSC、100 µg/ml サケ精液由来 DNA、50 µg /ml ヘパリン、0.1% Tween-20) に交換し 10 分間振盪した。その後、ハイブリダイゼーション液に置換し、55°Cで 2 時間プレハイブリダイゼーション

ンを行った。ハイブリダイゼーションへ進む前に、ハイブリダイゼーション液を用いて 1:100 に希釈した標識プローブを 95°C で 3 分間インキュベーションし氷冷したものをプローブミックスとして準備した。プレハイブリダイゼーション後の上清をプローブミックスに置換し、55°C で一晩反応させた。翌日、55°C に温めておいたハイブリダイゼーション液で洗浄したのち、50% PBST/50% ハイブリダイゼーション液に置換して 10 分間、室温で振盪した。さらに PBST で洗浄し、30% Western Blocking Reagent/PBST に交換して 2 時間ブロッキングを行った。その後、以下の一次抗体を 30% Western Blocking Reagent で 1:1000 に希釈した一次抗体液に置換して 4°C で一晩反応させた。

ヒツジ由来 抗-Digoxigenin ポリクローナル抗体 (Roche、#11093274910)

マウス由来 抗-Biotin モノクローナル抗体 (Invitrogen、#03-3700)

反応後、PBST で洗浄したのち、再度 30% Western Blocking Reagent/PBST で 2 時間ブロッキングを行った。その後、以下の二次抗体を 30% Western Blocking Reagent で 1:1000 に希釈した二次抗体液に置換して室温で 2 時間反応させた。さらに、DAPI 入りの PBST に交換し、20 分間反応させたのち PBST で洗浄してスライドグラス上にマウントした。マウンティング剤には ProLong Gold 褪色防止用封入剤 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。観察には Zeiss LSM 900 共焦点顕微鏡を使用し、Plan-Apochromat 20x / 0.8 N.A. 対物レンズを用いて以下の条件で撮影した。

1024 x 1024 ピクセル画像、16-bit 形式、0.5  $\mu$ m 間隔で合計 15 枚の Z スタック画像撮影後の 3 次元画像は最大値投影法によって 2 次元画像に変換した。

## 2-7 初期胚からの RNA 抽出および RT-qPCR

受精後 2~3 時間の初期胚を回収し、顕微鏡下で細胞膜形成の進行度に基づき NC14 の初期胚のみを集めた。集められた初期胚は TRI Reagent (Molecular Research Center) に浸し、ホモジナイザーペッスルを使用して破碎後、-80°C で保管した。

RNA 抽出および精製は基本的に製造元のプロトコルに従った。使用した TRI Reagent 量の 5 分の 1 量のクロロホルムを添加して 15 秒間強く攪拌したのち、室温で 3 分静置した。4°C、15 分間、12,000g の条件で遠心分離し、水層を回収した。回収量と等量のイ

ソプロパノールを加え室温で 10 分間静置した。4°C、10 分間、12,000g の条件で遠心分離し、上清を除去した。1 ml の 75%エタノールで洗浄したのち、沈殿物を乾燥させた。その後、超純水を用いて溶出し、濃度および吸光度を NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) により計測した。

回収した全 RNA 由来の cDNA 合成には PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を使用した。反応液の組成と反応条件は以下の通りである。

Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM)	1 $\mu$ l
サンプル RNA	1 $\mu$ g
超純水	up to 10 $\mu$ l
<hr/>	
total	10 $\mu$ l

[RNA 変性]  
↓ 65°C、5 分

denatured mix	10 $\mu$ l
5x PrimeScript Buffer	4 $\mu$ l
RNaseI (40 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
RTase (200 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5 $\mu$ l
<hr/>	
Total	20 $\mu$ l

[cDNA 合成]  
↓ 42°C、60 分  
[酵素失活化]  
↓ 95°C、5 分

続いて、得られた cDNA を用いて RT-qPCR を行った。反応および計測には LightCycler 480 System II (Roche) を使用した。反応に用いた反応液組成および反応条件、プライマ

一配列は以下の通りである。*rp49* 遺伝子の発現量は内在性コントロールとして、得られた標的遺伝子の発現量補正に用いた。

[反応液の組成]

鋳型 cDNA	(5 ng)
KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems)	2.5 µl
Forward プライマー	0.1 µl
Reverse プライマー	0.1 µl
超純水	up to 5 µl

[反応条件]

酵素活性化

95°C 30 秒

増幅サイクル (x45 サイクル)

95°C 5 秒

60°C 20 秒

72°C 1 秒

メルトカーブ算出

95°C 5 秒

60°C 1 分

97°C 15 秒

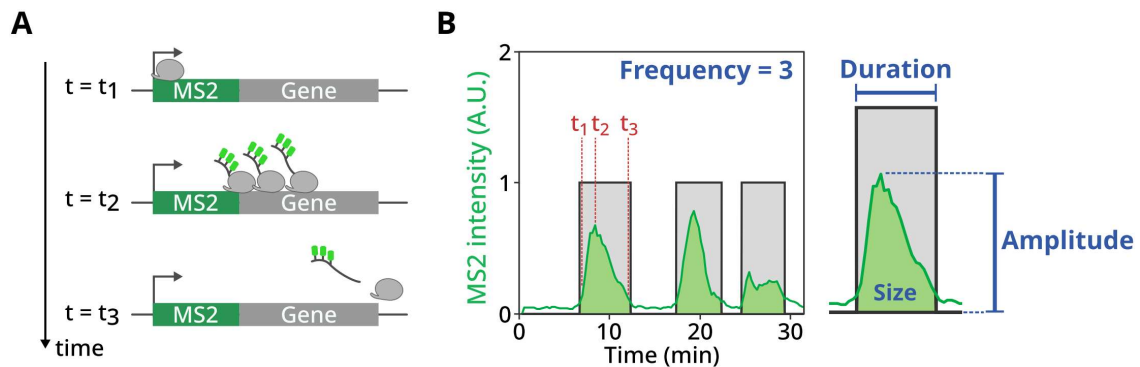
[プライマー]

<i>yellow</i> 遺伝子	5'-TGGCACTCATCAATGCCGTA-3'
	5'-CAGACAGCAAGAAAACGGGC-3'
<i>rp49</i> 遺伝子	5'-TACAGGCCCAAGATCGTGAA-3'
	5'-TCCAAGAAGCGCAAGGAGA-3'

## 2-8 MS2/PP7 配列を用いた転写活性の可視化法

本研究では転写活性のリアルタイム観察に MS2/MCP (MS2 coat protein) および PP7/PCP (PP7 coat protein) 系を利用している。その概要について詳述する。まず転写活性を計測する遺伝子配列に MS2 または PP7 を付加しておく。転写された MS2/PP7 配列の RNA が形成するステムループに対して特異的に結合する MCP/PCP タンパク質を蛍

光タンパク質で標識することにより転写活性のリアルタイム可視化を実現する（図 6A）。遺伝子上流に MS2/PP7 配列を配置した場合、MS2/PP7 配列を RNA pol II が通過し終わるまでシグナルは増幅し、反対に遺伝子領域から離脱し始めるとシグナルが減少する（図 6A,B）。観察により可視化される転写活性のトラックから転写バーストが発生していた時間を検出する。このとき、個々の転写バーストについて、その高さが Amplitude、継続した時間の長さが Duration、転写活性を時間に対して積分した値つまりトラック内の面積がバーストサイズにあたる（図 6B）。また、観察時間中における転写バーストの開始回数を発生頻度として計測する。



**図 6 観察された転写バーストからの特徴量の抽出**

- (A) MS2-遺伝子領域における転写活性可視化の模式図。MS2 領域の転写が開始されると、転写された MS2 RNA が形成するステムループに MCP-GFP が結合することで転写活性が可視化される。MS2 領域を転写終了した時点で MCP-GFP の輝度値は最大となり、転写終結とともに活性が低下する。
- (B) MS2 転写活性の経時観察例。横軸は時間、縦軸は相対 MS2 転写活性。黒の網掛けは転写バースト中と判定された区間を示す。個々のバースト区間における継続時間を Duration、最大強度を Amplitude として記録する。また、観察時間中における転写バースト回数を Frequency として記録する。

## 2-9 ライブイメージングに用いる初期胚の交配

MS2/PP7 同時観察に用いる初期胚については、MS2/PP7 レポーターをホモに有する ショウジョウバエ 系統を *nanos>NLS-mCherry-PCP-NES*, *His2Av-eBFP2/CyO*; *nanos>MCP-GFP* 系統の処女雌個体と交配させた。図 12 の観察に使用した初期胚に関しては、まず PP7 遺伝子座をホモに有する雄個体を *nanos>NLS-mCherry-PCP-NES*, *His2Av-eBFP2/CyO*; *nanos>MCP-GFP* 系統の処女雌個体と交配させ、得られたヘテロ個体の処女雌個体をさらに MS2 遺伝子座をホモに有する雄個体と交配させた。また、PP7 発現領域を解析対象とする Airyscan 超解像顕微鏡観察では、まず *dorsal-GFP* あるいは *zelda-GFP* をホモに有する雄個体を *nanos>NLS-mCherry-PCP-NES*, *His2Av-eBFP2/CyO* 系統の処女雌個体と交配させ、得られたヘテロ個体の処女雌個体をさらに MS2/PP7 レポーターをホモに有する雄個体と交配させた。MS2 発現領域を解析対象とする Airyscan 超解像顕微鏡観察では、まず *dorsal-GFP* あるいは *zelda-GFP* をホモに有する雄個体を *nanos>NLS-mCherry-MCP-NES*, *nanos>NLS-mTagBFP2-PCP-NES* 系統の処女雌個体と交配させ、得られたヘテロ個体の処女雌個体をさらに MS2/PP7 レポーターをホモに有する雄個体と交配させた。以上の方法で得られた初期胚はコリオン膜を除去したのち、ポリラップ（宇部フィルム）上に並べられ、シリコンオイル（FL-100-450CS、信越シリコン）に浸してカバーガラス（18x18 mm、松浪ガラス）でマウントした。

## 2-10 MS2/PP7 配列を用いた転写活性の経時的ライブイメージング

観察には Zeiss LSM 900 共焦点顕微鏡を使用した。対物レンズには、Plan-Apochromat 40x / 1.4 N.A.油浸レンズを用いた。画像は以下の設定で取得した。

- 512 x 512 ピクセル
- 16-bit 形式
- 1 タイムフレーム当たり 0.6  $\mu\text{m}$  間隔で合計 18 枚の Z スタック画像
- 約 16.8 秒間隔の撮影
- GFP, mCherry, eBFP2 をそれぞれ 488 nm, 561 nm, 405 nm 波長のレーザーで励起

実験回ごとに励起光強度を一定に揃えるため、X-Cite XR2100/XP750 パワーメータ (EXCELITAS) を使用してレーザー強度を計測し、比較する系列間では毎回同程度の強度になるようレーザー強度設定を調整した。撮影は NC13 中から開始し、NC14 における原腸陥入の開始期まで続けた。また、撮影中は室温を 22°C から 23°C の間で保った。撮影中、Z スタック中にすべての MS2/PP7 転写ドットが含まれるよう Z 軸上での位置調整を行う際、タイムフレーム間で数秒間の撮影停止時間が生じることがあった。

得られたタイムラプス画像は、使用したエンハンサーに対応する活性化領域のみを切り取るよう、以下の画像サイズに画像を切り抜いた。

エンハンサー	画像サイズ (pixels)
<i>sna</i> shadow	430 x 512
<i>rho</i> NEE	300 x 512
<i>Ubx</i> BRE	430 x 430
<i>hairy</i> enhancer	300 x 350

画像はさらに NC13 の分裂期中期のタイムフレームを基準に NC14 の開始タイムフレームを決定し、NC14 中のみ観察するため合計 180 タイムフレームの画像を続く解析に供した。NC14 の初期胚を観察対象とする技術的な利点としてはまず、卵表層にすべての核が存在するために一焦点面に多くの核を捉えることができる。さらに分裂時期が同調しており NC14 が長く続くことから、容易かつ長時間のあいだ同一細胞を追跡できる。また、胚性遺伝子活性化が起きる時期であるため、遺伝子が非活性化状態から活性化状態へ遷移する際のダイナミクスを含めて観察することができる。

## 2-11 Airyscan 超解像顕微鏡を用いたライブイメージング

観察には Airyscan2 検出器を搭載した Zeiss LSM 900 共焦点顕微鏡を使用した。対物レンズには、Plan-Apochromat 63x / 1.4 N.A. 油浸レンズを用いた。画像は以下の設定で取得した。

- 944 x 944 ピクセル (*sna*-MS2 系統を用いた観察では 780 x 780 ピクセル)
- 16-bit 形式

- 0.2  $\mu\text{m}$  間隔で合計 41 枚の Z スタック画像
  - GFP, mCherry をそれぞれ 488 nm, 561 nm 波長のレーザーで励起
- レーザー強度は 2-10 に記載の方法と同様に行った。また、撮影中は室温を 22°C から 23°C の間で保った。撮影した画像は Zeiss ZEN software (version 3.1) 内の“Airyscan processing”機能において処理を行った。

## 2-12 画像解析に用いたソフトウェア

すべての画像処理および解析は Fiji (version 1.53q)、MATLAB (R2021b, MathWorks)、R (version 4.1.2) を用いて行った。

## 2-13 核画像の分節化処理

画像内における個々の核領域の分節化は Fiji において実行した。ライブイメージング画像では His2Av-eBFP2 由来のシグナル、超解像顕微鏡画像では Dorsal-GFP あるいは Zelda-GFP 由来のシグナルを用いて処理を進めた。まず複数 Z スタックを含む画像を最大値投影法により単一 Z スタックの画像に変換した。次にメディアンフィルターによりノイズ除去を行った。さらに、バンドパスフィルターを用いて 5 から 25 ピクセル（超解像顕微鏡画像の場合は 50 から 200 ピクセル）のオブジェクト由来のシグナルのみ残るようフィルタリング処理を施した。続いて大津の二値化法<sup>73</sup>によりバイナリ画像へ変換したのち、1 セグメント内で隣接する核を分水嶺法により分断した。最終的に個々の核が占有する領域をボロノイ分割処理により定めた。得られたバイナリ画像はさらに目視で確認し、すべての MS2/PP7 発現位置が核領域内に含まれるよう修正した。

## 2-14 経時的な核の追跡解析

タイムラプス画像における同一核の追跡は MATLAB 上で行った。まずすべてのタイムフレームでの核領域バイナリ画像について、個々の核領域の重心座標を求めた。あるタイムフレームにおける個々の重心座標に対して、1 タイムフレーム前のすべての重心

座標との距離を算出し、その距離が最小となる核領域を同一核由来とした。このとき、その領域が画像の端に接している核、および自身の核領域の大きさ以上にフレーム間で移動した核についてはその後の解析から排除した。

## 2-15 MS2/PP7 由来の転写活性シグナルの定量

MS2/PP7 配列を用いた転写活性の定量は、それぞれのタイムフレームにおいて最大値投影法により作成した画像をもとに行った。核領域を分節化したバイナリ画像を使い、個々の核領域ごとに MS2/PP7 シグナルを参照した。核領域内における MS2/PP7 シグナルの中央値をバックグラウンドの値として各ピクセルの輝度値から差し引いた。それぞれの核領域内で最も MS2/PP7 の輝度値が高い点を中心に 5 x 5 ピクセルの輝度値の積分値を転写活性として記録した。続いて、個々の核由来の経時的な転写活性において全タイムフレーム中で最小の値が 0 となるよう全タイムフレームからその値を差し引いた。

## 2-16 転写バーストの検出および特徴量の定量

転写バーストの検出および定量は R において行った。まず個々の核由来の経時シグナルについて、10 タイムフレームをウィンドウサイズとして lowess 関数により平滑化した。比較する系統間で共通の閾値を設定し、その閾値を転写活性シグナルが越えたタイムフレームを転写バースト開始時点、下回ったタイムフレームを終了時点と判定した。また、転写バースト中のあるタイムフレームにおいて、その前後それぞれ 2 フレームで単調減少および単調増加を示していた場合、連続するバーストの境界点であるとして該当するタイムフレームも転写バースト開始点とした。また、転写バーストが 5 タイムフレーム以下の長さで終了する場合、偽陽性であるとしてその後の解析から除外した。観察時間中の最終フレームまで継続していた転写バーストについても、解析からは除外した。

総転写産物量については、観察時間中すべてのタイムフレームにおける転写活性シグナルの積分値として算出した。転写バーストの頻度は、観察時間中において発生した転

写バーストの合計回数を指す。また、転写活性化した核の累積分布については、各タイムフレームまでの間に一度でも転写バーストを開始させた核の割合として求めた。転写バーストの Amplitude は個々の転写バースト中における転写活性シグナルの最大値を用いた。転写バーストのサイズについては、個々の転写バースト中における転写活性シグナルの積分値として算出した。*rho* NEE エンハンサーを用いたレポーターについては、発現領域のみを解析対象とするために、50 タイムフレーム目の時点で画像の中心 50% 幅の領域に重心をもっていた核のみを解析に供した。

## 2-17 超解像顕微鏡画像における転写因子の局所的集合の可視化

転写因子蛍光シグナルの解析には複数 Z スタックを有した画像を使用した。先述の方法で作成した核領域セグメントをすべての Z スタックに適用した。転写領域における転写因子の集合を定量するため、MS2 あるいは PP7 の輝度値が最大のピクセルの 3 次元座標を転写活性化位置として取得した。転写活性化位置を中心として、同一 Z スライス画像において Dorsal-GFP の場合は 29 x 29 ピクセル、Zelda-GFP の場合は 41 x 41 ピクセルの領域を解析に用いた。また対照群として、転写活性化位置と同一 Z スライスにおいて核領域内で無作為に選ばれたピクセルを中心とした領域も取得した。転写が活性化されている核のみを解析に用いるため、取得した領域内の MS2/PP7 シグナル積分値を基準に、上位の一部の核のみを使用した (*sna* shadow エンハンサー転写活性を基準としたとき 15% ; *Ubx* BRE エンハンサー転写活性を基準としたとき 5%、*sna*-MS2 転写活性を基準としたとき 50%)。得られた領域画像は転写活性化位置を中心として、そこからの距離を基準に 1 ピクセル幅のビンに分けられた。さらに、転写因子の相対存在量を評価するため、Dorsal-GFP では画像に外接するビン、Zelda-GFP では画像に内接するビン内の平均輝度値で各ピクセルの輝度値を割った。転写開始位置を中心とした相対分布のグラフ化の際には、さらに各ビン内の相対値における平均値を求めることで算出した。

## 2-18 発生遺伝子エンハンサーにおける TSS スコアの定量

エンハンサー領域における転写活性を評価するため、受精後 2 から 4 時間のショウジョウバエ初期胚を用いた 5' CAGE-seq 公開データ群 (E-MTAB-4787) <sup>74</sup> を利用した。シーケンスリードは HISAT2 (version 2.2.0) <sup>75</sup> を使用して dm3 リファレンスゲノムにマッピングを行った。得られた bam ファイルは Samtools (version 1.10) および bedtools (version 2.29.2) により bed 形式に変換した。コーディング領域由来のシグナルを排除するため、“bedtools intersect”関数によりすべてのエキソン領域から 50 bp 以内に存在する TSS (transcription start site) シグナルを取り除いた。のこったリードについて、解析を行ったすべてのファイルを 1 つの bed ファイルに統合した。次に、エンハンサー領域ごとにその転写活性を評価するため、“bedtools coverage -counts”関数を使用し、それぞれのエンハンサー領域における合計 TSS シグナルを算出した。このときエンハンサー領域として、先行研究により標的発生遺伝子とともにエンハンサー活性を確認されたゲノム領域を用いた<sup>6</sup>。得られた TSS スコアは各エンハンサー領域の長さによって補正を行い比較した。全エンハンサーを合計した TSS スコアのうち 60%を占有するエンハンサー 37 個を転写性エンハンサーとして同定した (図 22A)。

## 2-19 内在エンハンサー転写開始点と転写因子結合部位の位置関係の解析

内在エンハンサーにおいて、転写因子結合部位に対してその付近に転写開始点が存在する割合および、求心性または遠心性転写開始点である割合を算出するため解析を行った。転写因子結合領域の同定には NC13 および NC14 のショウジョウバエ初期胚に対する Zelda ChIP-seq 公開データ (GSM763061) <sup>76</sup> の bed ファイルデータを利用した。エンハンサー領域ごとに重複する Zelda ピークを“bedtools intersect -wa -wb”関数により判定し、割り当てた。得られた 1062 個の Zelda ピークをもつエンハンサー領域に対して、その付近における転写開始点の有無と方向性の割合を求めた。TSS 領域の位置と方向性の決定にはショウジョウバエに対して行われた RAMPAGE-seq 公開データ (GSE36212) <sup>77</sup> を利用した。“bedtools window”関数を使用し、Zelda 結合領域から前後 500 bp の範囲

に存在する転写開始点を同定した。これらデータセットを統合することにより、エンハンサーごとにその有する Zelda サイトが付近に求心性の転写開始点をもっていた場合に“inward TSS”グループ、遠心性の転写開始点をもっていた場合に“outward TSS”グループとして分類した（図 27）。

## 2-20 統計解析

グラフは R（version 4.1.2）において ggplot2 パッケージを使用して作成した。特に記載のない限り、箱ひげ図では箱の上底および下底がそれぞれ第一、第三四分位数を示し、中央線が中央値を示している。ひげの上端および下端は外れ値を除く最大値および最小値を表している。棒グラフでは平均値を図示しており、エラーバーは標準誤差、各ドットは独立した各実験回でのデータ値を表す。グラフ中に記載の A.U.（Arbitrary Unit）は相対値表記であることを示す。

# 第三章

## 結果

### 3-1 エンハンサーおよび標的遺伝子転写活性の同時可視化系の確立

エンハンサー領域における転写が標的遺伝子の活性に与える影響を調べるため、両者の転写活性を同時に計測できるライブイメージング系の開発を行った。転写活性の計測には所属研究室において確立されていた MS2/MCP および PP7/PCP システムを利用した (2-8 を参照)。エンハンサーの標的となるレポーター遺伝子には、体色を決める遺伝子であり、広く可視化マーカーとして用いられる *yellow* 遺伝子を採用した。まず *yellow* 遺伝子の 5' 非翻訳領域に 24x MS2 リピート配列を挿入し、その上流にプロモーターとして DSCP (*Drosophila* synthetic core promoter)<sup>78</sup> を配置した。内在ゲノムでの *sna* shadow エンハンサーと *sna* 遺伝子プロモーター間の距離同様、標的遺伝子プロモーターから 7.5 kb ほど下流に *sna* shadow エンハンサーを配置することで *yellow* 遺伝子の発現を誘導した (図 7A)。さらに、*sna* shadow エンハンサーに隣接して、24x PP7 リピート配列および DSCP を配置することでエンハンサー領域における転写を誘導した (図 7A)。*phiC31* を介したゲノム領域特異的な遺伝子組み換えにより上記配列をショウジョウバエゲノムに組み込み、初期胚において転写活性を観察した。ゲノムへの組み込みには配列特異的なリコンビナーゼである *phiC31* を使用することにより、観察時にはゲノム上の特定領域に 1 コピーのみが存在している。観察はショウジョウバエ初期胚の核サイクル (NC) 14 の間、およそ 16 秒間隔で 180 フレーム (約 50 分間) 撮影した。その結果、同一の核において MS2 によって可視化された標的遺伝子の転写活性および PP7 によって可視化されたエンハンサー転写活性を同時に可視化することに成功した (図 7B)。

このとき、*sna* shadow エンハンサー自身の活性によって誘導されたエンハンサー転写が、発生過程において *sna* shadow エンハンサーが活性化する領域つまり *sna* 遺伝子発現領域と一致しているのか確かめた。内在 *sna* shadow エンハンサーが活性化する領域として *sna* mRNA の発現領域、エンハンサー転写の活性化領域として *sna* shadow エンハンサー RNA の発現領域とともに FISH 法により染色した。観察の結果、*sna* mRNA および *sna* shadow エンハンサー RNA はともに、内在 *sna* 遺伝子が発現することが既知の腹側領域に重複して発現していた (図 7C)。さらに、エンハンサー転写を開始している

DSCP プロモーターを除去したところ、*sna shadow* エンハンサーRNA が見られなくなったことから、*sna shadow* エンハンサーが自身の活性により転写されていることが明らかとなった (図 7C)。

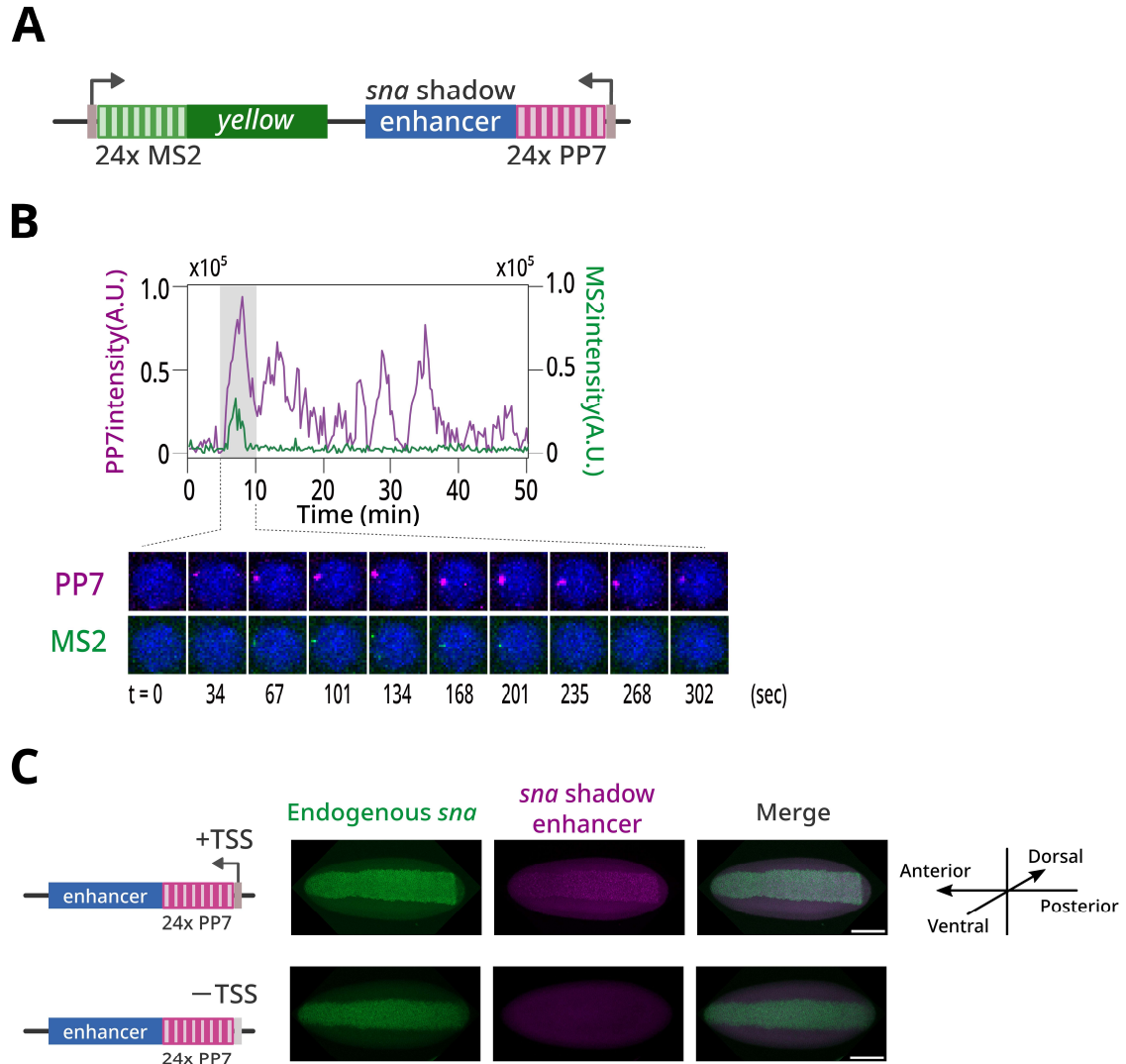


図 7. エンハンサーおよび標的遺伝子の同時観察系の確立

- (A) 作成したレポーター配列。
- (B) ある核において追跡された MS2 および PP7 の転写活性の観察例。網掛けで表示された MS2 転写バースト中の核画像を 1 タイムフレームおきに表示した。
- (C) FISH 法による内在 *sna* mRNA および *sna shadow* エンハンサーRNA の染色像。NC14 の初期胚は頭側が左、腹側が手前となるように配置された。エンハンサー転写誘導条件 (上段) および非誘導条件 (下段) のそれぞれで染色を行った。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$ 。

### 3-2 エンハンサー転写はその転写強度依存的に標的遺伝子を抑制する

エンハンサーおよび標的遺伝子の転写活性を同時に可視化できたことから、次にエンハンサー領域における転写活性が標的遺伝子の転写活性に与える影響を検証した。まずエンハンサー上流において TSS 非存在および存在する系統間で比較を行った（図 8A；-TSS および+TSS）。その結果、エンハンサー転写非誘導条件では強く標的遺伝子が活性化されるのに対し、エンハンサー転写誘導条件では標的遺伝子の活性化が弱く抑えられている傾向が観察された（図 8B, C；-TSS および+TSS）。撮影時間中における総転写産物量を転写活性の積分値として算出したところ、エンハンサー転写活性の上昇に伴い、反対に標的遺伝子の転写活性は顕著に抑制が認められた（図 8D-G；-TSS および+TSS）。

次に、標的遺伝子の抑制がエンハンサー領域における転写強度依存的であるのか検証するため、エンハンサー上流に配置したプロモーターの強度の調節を行った。先行研究において eRNA 転写活性を有するエンハンサーの TSS 付近には Inr モチーフが高頻度に局在していることが知られており<sup>54,55,56,79</sup>、本研究においても DSCP プロモーターに内在している Inr モチーフの変異によりプロモーター活性を減弱させることとした。Inr モチーフの改変様式については、先行研究と同様に行った<sup>31</sup>（図 8A；+TSS<sup>weak</sup>）。予想通りエンハンサーにおける転写活性は低下し、同時に標的遺伝子の転写活性については部分的な活性化が見られた（図 8B-F；+TSS<sup>weak</sup>）。

また、MS2/PP7 配列を用いた本手法では転写活性を評価しているため、産生された RNA の存在量という観点から RT-qPCR による *yellow* 遺伝子 mRNA 量の比較も行った。ここまでの結果と一致して、mRNA 存在量においてもエンハンサー転写による遺伝子転写量の抑制がみられ、さらにエンハンサー転写の減弱により遺伝子転写量の減少量も抑えられた（図 9）。以上の結果から、エンハンサー領域における転写はその活性依存的に標的遺伝子の転写活性を抑制することが示唆された。

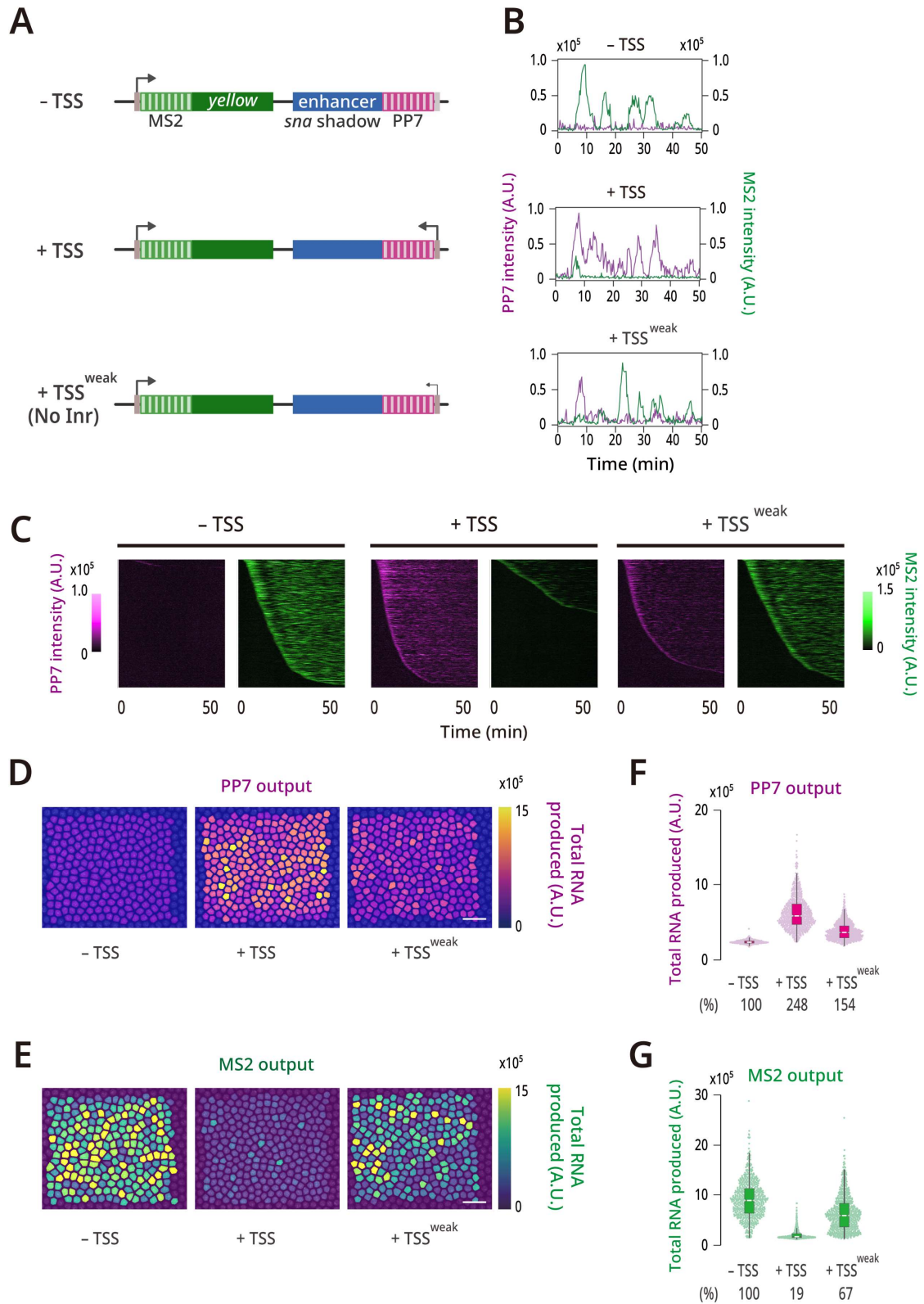


図 8 エンハンサー領域における転写は標的遺伝子を抑制する

(図 8)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。プロモーター、24x MS2 リピート配列および *yellow* 遺伝子の下流に *sna* shadow エンハンサーおよび 24x PP7 リピート配列を配置した（上段、-TSS）。PP7 配列に隣接して DSCP を TSS モチーフとして配置した（中央、+TSS）。TSS モチーフに含まれる *Inr* 配列を特異的に不活性化させた（下段、+TSS<sup>weak</sup>）。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。-TSS、+TSS、+TSS<sup>weak</sup> それぞれのレポーターについて合計で 676、719 および 700 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) 解析に使用した 1 個体の初期胚において、個々の核領域をその核における PP7 または MS2 の総転写産物量に対応する色でヒートマップ化した。His2Av-eBFP2 シグナルを最大値投影した画像とオーバーレイした。
- (F, G) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

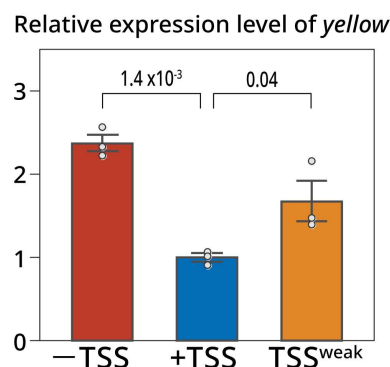


図 9. 標的遺伝子 mRNA 存在量の相対比較による転写抑制の評価

NC14 初期胚を用いて *yellow* 遺伝子の相対 mRNA 存在量を RT-qPCR により比較した ( $n = 3$ )。発現量は *rp49* 遺伝子により補正後、+TSS を 1 として正規化した。p 値はダネットの多重比較検定法により算出。

観察された転写抑制機構がゲノム上での遺伝子およびエンハンサーの位置関係と独立した現象であることを検証するため、遺伝子からエンハンサー間の距離を 7.5 kb から 10 kb に延長して同様の実験を行った（図 10A）。先行研究において、ショウジョウバエゲノムに存在するエンハンサーから遺伝子までの距離の中央値は 10 kb であることが報告されている<sup>6</sup>。図 8 における-TSS および+TSS の条件について、遺伝子およびエンハンサー間の距離を延長した系列で同様に観察した（図 10B）。エンハンサーから標的遺伝子までの距離が拡大した場合でも、活性化細胞の割合減少および転写頻度の減少を伴う遺伝子転写活性の低下が観察された（図 10C-E）。よって、エンハンサー転写による標的遺伝子の転写抑制はそれらの距離が十分に離れていても生じており、つまりゲノム上での配置とは無関係に発生する現象であった。

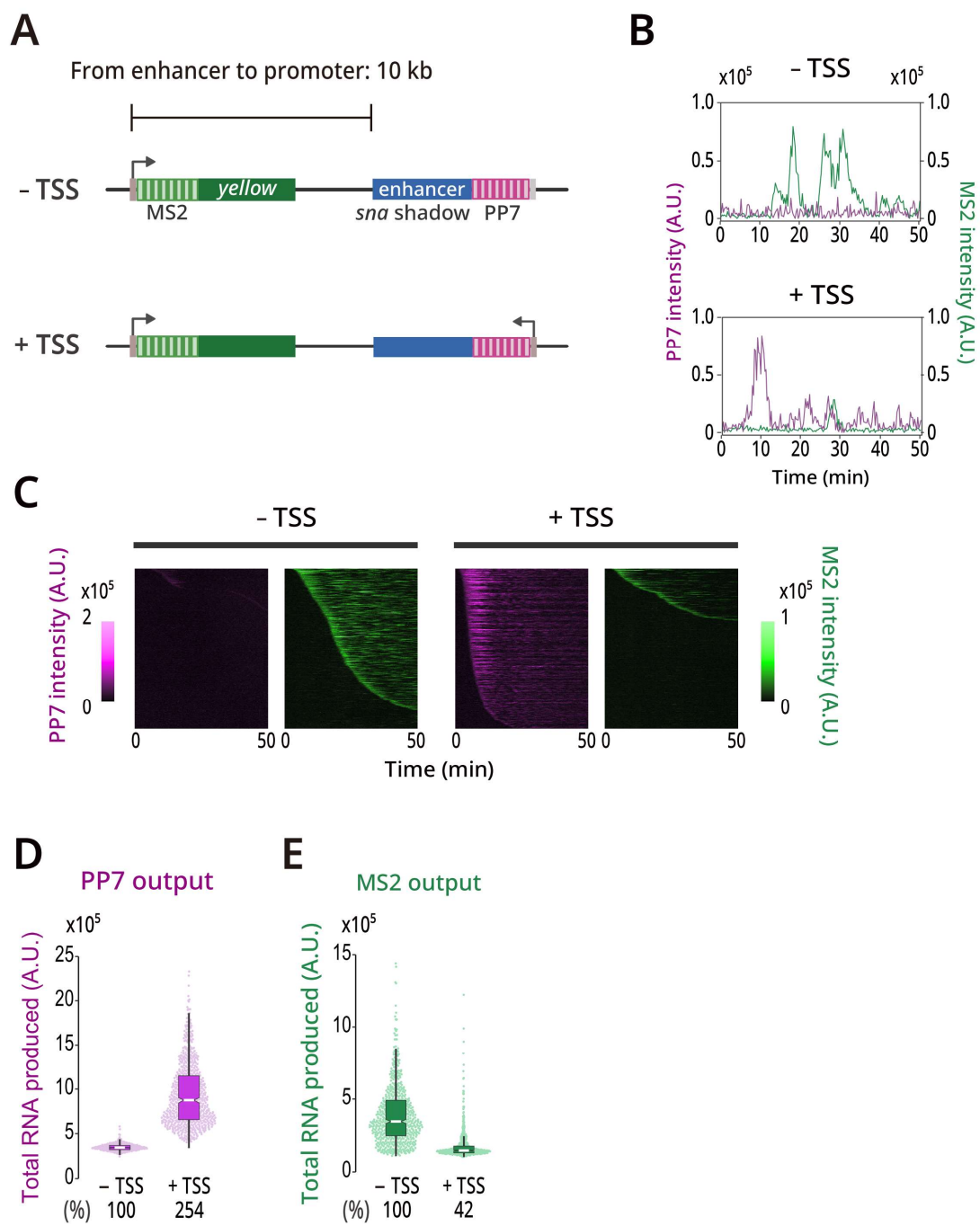
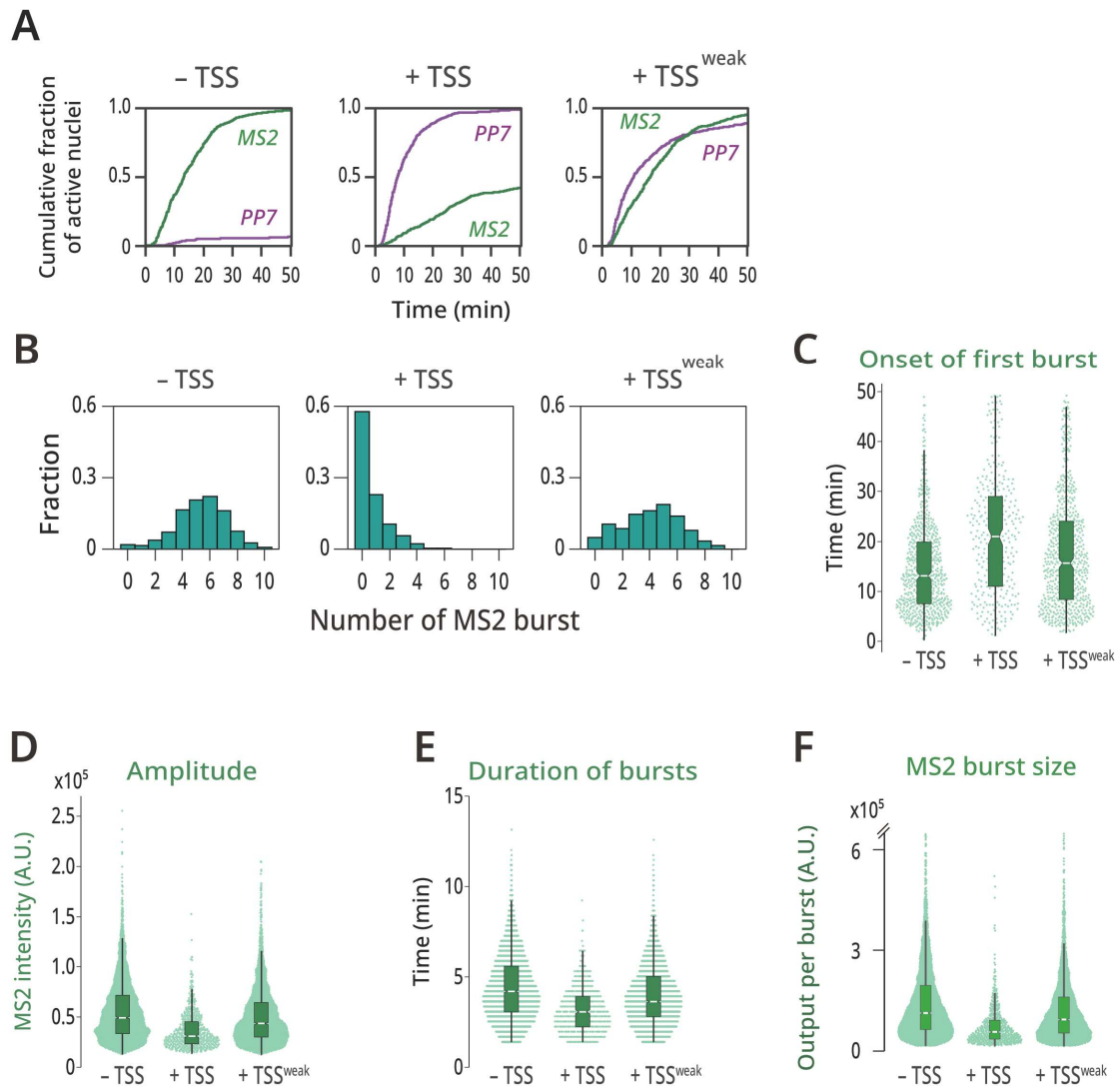


図 10 エンハンサー転写による転写抑制は遠位な位置からでも生じる

(図 10)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。 *yellow* 遺伝子のプロモーター領域からエンハンサー領域までの距離が 10 kb となるよう設計した。エンハンサー上流に TSS を持たない系統 (−TSS) および持つ系統 (+TSS) を比較した。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) 観察されたすべての核における MS2 および PP7 のシグナル強度変化をヒートマップで示した。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。−TSS および +TSS それぞれのレポーターについて合計で 662 および 703 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

さらに、エンハンサー転写誘導時にはどのような転写動態の変化が総転写量の減少を導いたのか明らかにするため、図 8 で検証した 3 系列に関して標的遺伝子転写の種々の特徴量を比較した。まず、撮影時間中においてまったく転写を活性化させていない細胞が多く見受けられたことから (図 8C)、撮影中に一度でも転写を活性化させた細胞つまり転写バーストを引き起こしうる細胞の割合を累積分布として経時的に評価した (図 11A)。その結果、たしかに撮影時間中に一度も遺伝子転写が生じていない核が多く存在していた。また、転写活性化細胞の増加割合についても抑制傾向が見られたことから、転写バーストが起こりにくくなっていることが予想された。そこで転写バーストの発生頻度に着目してその比較を行ったところ (図 11B)、転写活性化能を保持した核においても転写発生の頻度が低下していることが判明した。さらに、転写を活性化開始した時点を比較した場合にも転写開始時期に著しい遅延が見られたことから (図 11C)、転写活性化時期の遅延および転写発生頻度の低下の両者の効果により非活性化細胞の割合が増加したと予想される。次に、標的遺伝子の転写活性化を示した核だけを対象に、発生した個々の遺伝子転写バーストの性質に注目した。個別の転写バーストは、一度の転写発生時に走り出した RNA pol II の個数といえる Amplitude、転写活性化状態が続いた継続時間としての Duration、そして両者の結果生じる転写バーストのサイズといった特徴量から定量することができる。それらの比較により、エンハンサー転写は標的遺伝子転写における転写バーストにおいて、その Amplitude、Duration ひいては転写サイズのいずれにおいても抑制をもたらすことが明らかとなった (図 11D-F)。以上を要約するとエンハンサー領域における転写は、遺伝子の転写活性化の遅延と頻度低下をもたらし、転写が活性化したとしても短く弱い転写となる効果を有していた。これら複合的な影響により、標的遺伝子の転写活性が著しく抑制されていた。



**図 11 転写抑制が起因する転写動態の解析**

いずれも図 8 の観察データを基に解析を行った。

- (A) 一度でも PP7 または MS2 を発現した活性化細胞の割合における累積分布関数。
- (B) MS2 転写バースト頻度を観察時間中の転写バースト回数として算出。
- (C) 一度でも MS2 を発現した活性化細胞における最初の MS2 転写バーストの開始時間。
- (D) 個々の MS2 転写バーストの最大値の分布。
- (E) 個々の MS2 転写バーストの持続時間の分布。
- (F) 個々の MS2 転写バーストで産生された転写産物量の分布。二重線は全データの 99% 以上を図示していることを示す。

### 3-3 エンハンサー転写の過程において標的遺伝子の抑制をもたらす現象の同定

エンハンサー領域における段階的な強度での転写誘導により、エンハンサー領域での転写はその強度依存的に標的遺伝子の転写活性化を抑制することが明らかになった。そこで次に、エンハンサー転写により標的遺伝子が抑制される原因となる現象の同定を目指した。

#### 3-3-1 産生される eRNA には遠位に標的遺伝子を抑制する働きはない

初めに、エンハンサー転写によって産生される eRNA 自身がノンコーディング RNA としての働きを有し、標的遺伝子に対して遠位に働きかけている可能性を検証した。序章で紹介した通り（1-6 を参照）、一部の eRNA ではクロマチン結合タンパク質のもつ RNA 結合ドメインへの結合を介して、それらタンパク質の呼び込みに寄与している可能性が示唆されている<sup>62,64</sup>。本実験においても *sna shadow* エンハンサー由来の eRNA がトランスに働く可能性を考慮し、エンハンサーによる転写活性化領域とは異なる領域からその eRNA が産生される影響を確認した。一方の遺伝子座では転写開始点をもたない *sna shadow* エンハンサーによって *yellow* 遺伝子の転写を活性化し、同時に対立遺伝子座において *sna shadow* エンハンサーおよび転写開始点を配置することで eRNA の産生を誘導した（図 12A）。前者の遺伝子座のみを持つ系列（MS2 allele alone）および両者を有する系列（MS2 allele + PP7 allele）を比較したところ、PP7 を含む遺伝子座をもった系列ではエンハンサーの自己転写活性化により PP7 の発現が強く生じたものの（図 12B-D）、いずれの系列でも同程度に標的遺伝子発現の活性化が観察された（図 12B, C, E）。したがって、産生された *sna shadow* エンハンサーの eRNA に遠位から標的遺伝子を抑制する働きはないことが示唆された。

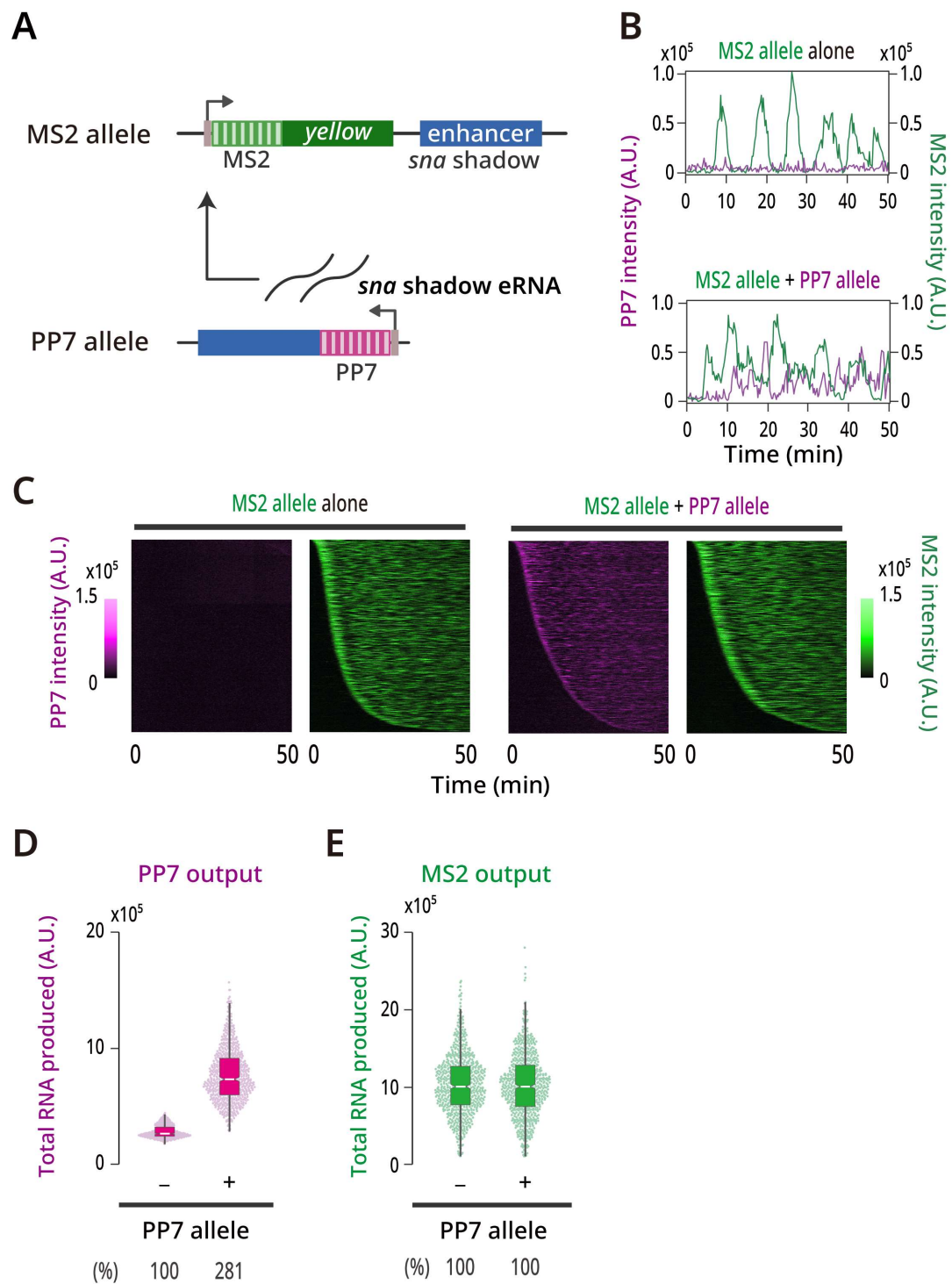


図 12 産生された eRNA に遠位に転写を抑制する働きはない

(図 12)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。一方の遺伝子座 (MS2 allele) では MS2-yellow レポーター遺伝子の下流に TSS をもたない *sna shadow* エンハンサーを配置した。もう一方の遺伝子座 (PP7 allele) には TSS をもち eRNA を産生する *sna shadow* エンハンサーを配置した。観察は MS2 allele のみ、MS2/PP7 allele 両者をもつ系統で行った。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。MS2 allele のみあるいは MS2/PP7 allele 両者をもつ系統それぞれについて合計で 719 および 704 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

### 3-3-2 標的遺伝子に対する対向性の転写はわずかに転写抑制をもたらす

次に検証した仮説として、エンハンサー領域で開始した転写が標的遺伝子領域にまで侵入することで転写を妨害しているモデルを想定した。酵母ゲノムにおいては、対向する遺伝子間で、それぞれから転写開始した RNA pol II が衝突することで転写が妨害されることが報告されている<sup>80</sup>。また、マウス ES 細胞を用いた研究においてもイントロン領域で開始したエンハンサー転写が標的遺伝子の転写を妨害する例も知られている<sup>65</sup>。本実験系においても、エンハンサー領域の転写開始点および標的遺伝子転写開始点が向かい合うように配置されていることから、上記の現象が生じている可能性を検証することとした。プロモーターおよび PP7 配列を含むエンハンサー領域カセットを標的遺伝子領域に対して反転させることで、対向性の転写から並行性の転写に組み替えた (図 13A, B)。観察された核全体での傾向として、PP7 発現においては大きな差は見られなかったものの、MS2 発現においては対向性転写と比較して並行性転写ではわずかに活性化時期の早期化が見られた (図 13C)。総転写産物量を比べてみると、PP7 発現量に差はないものの、MS2 発現量では対向性転写に対し並行性転写では若干の回復が見られた (図 13D, E)。一方で、エンハンサー領域からの転写が非誘導の系列を基準とする

と、いまだ顕著に抑制されていた（図 13E）。このことから、標的遺伝子領域に対するエンハンサー転写の方向性は、その転写抑制効果に寄与しているものの、主要な原因ではなかった。

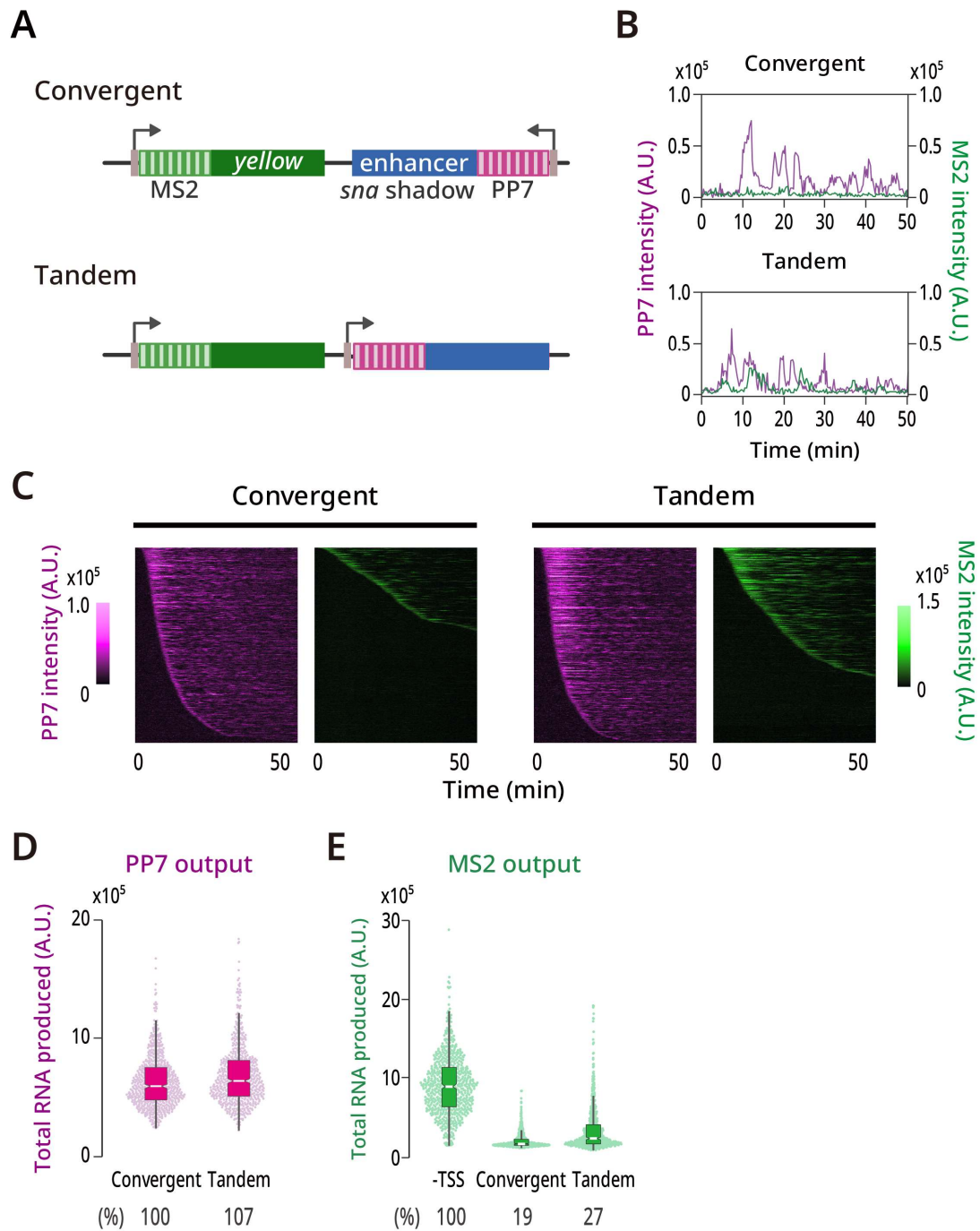


図 13 対向性の転写はわずかに隣接遺伝子の転写を妨害する

(図 13)

Convergent 系列のデータは図 8 における+TSS と同一のデータを使用。

- (A) 観察に用いたレポーター配列。一方のレポーターでは標的遺伝子からの転写とエンハンサー領域における転写が同方向を向くように設計した。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。Convergent および Tandem のレポーター系統それぞれについて合計で 719 および 638 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。  
-TSS は図 8 における-TSS と同一のデータに由来する。

### 3-3-3 エンハンサー領域上の転写通過が遺伝子の抑制に寄与している

産生される eRNA やエンハンサー転写の方向性などに転写抑制への寄与が見られなかったことから、次に転写が発生するという事象そのものが標的遺伝子の転写抑制に寄与している可能性を検討した。単一エンハンサーに駆動される複数プロモーター間では互いにエンハンサーとの相互作用における競合（プロモーター競合）が生じることが知られ<sup>81-83</sup>、標的遺伝子およびエンハンサーの転写開始点間で転写活性化能の奪い合いが生じている可能性が懸念された。さらに最近の研究から、転写活性化領域において産生された RNA の局所的な濃度上昇が転写活性化因子の集合を妨害するネガティブフィードバックが提唱されている<sup>84</sup>。したがって、転写される eRNA の配列非特異的に産生 RNA が標的遺伝子の転写活性化を妨害している可能性も考えられた。これらの仮説を検証するため、エンハンサー領域内へ向かって誘導していた転写（求心性転写）を、TSS および PP7 配列の反転によりエンハンサー領域外へ向かって誘導した（遠心性転写、図 14A, B）。これにより、エンハンサー領域上で転写が生じることではなく、エンハンサー活性化領域で転写が発生することが抑制に関与する可能性を検証することを目的とした。観察された核全体のシグナル強度を可視化すると、求心性転写で生じる遅延した転写活性化に対して、遠心性転写を誘導した際には転写活性化時期が早期化し、転写が強く活性化している傾向が見られた（図 14C）。転写活性の変化を総転写産物量から比較したところ、標的遺伝子の転写抑制が大幅に消失していた（図 14D, E）。また興味深いことに、遠心性転写誘導時には PP7 発現量も上昇していることから、エンハンサー領域での転写は自己転写活性も低下させていたことが明らかとなった（図 14D）。プロモーター競合や産生 eRNA によるネガティブフィードバックが生じていれば、エンハンサー領域における転写の方向性とは無関係に標的遺伝子の抑制が誘導されるはずである。よって、本研究において観察している転写抑制の原因においてそれら現象は不適であると結論付けた。同時に本実験から、エンハンサー領域における転写が標的遺伝子の転写抑制を導く条件として、エンハンサー領域上を転写つまり伸長中の RNA pol II が通過することが不可欠であると判明した。

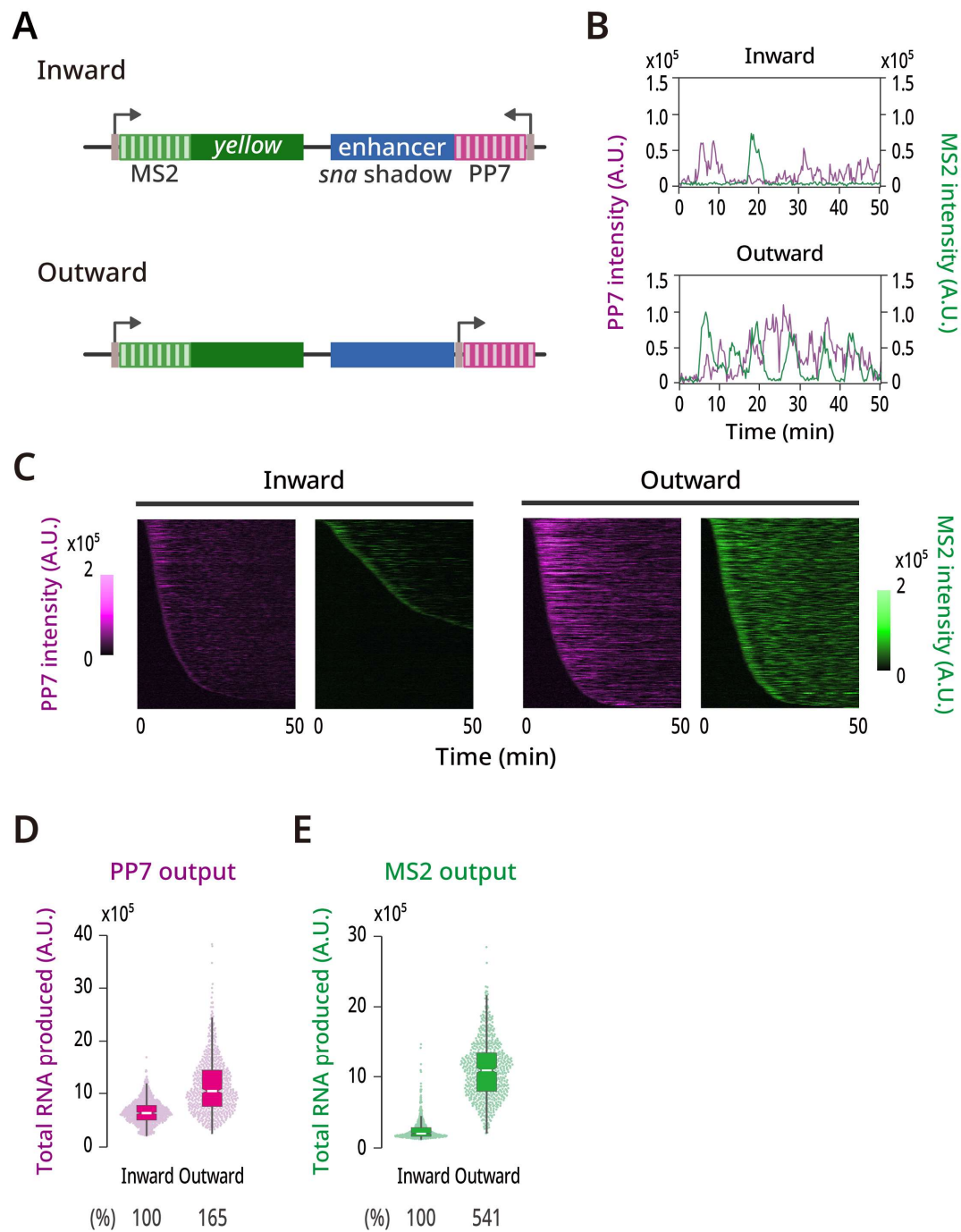


図 14 エンハンサー領域上の転写通過により転写活性化が抑制される

(図 14)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。一方のレポーターでは TSS および PP7 カセットを反転させることでエンハンサー領域に対して外方向へ転写を誘導した。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。Inward および Outward のレポーター系統それぞれについて合計で 739 および 666 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

転写活性だけでなく、産生された *yellow* 遺伝子の mRNA 存在量でも転写の回復を確認するため RT-qPCR を行った。その結果、エンハンサーに対して求心性転写を誘導している際の *yellow* mRNA 量と比較して、TSS がない場合と同程度まで転写活性化が見られた (図 9、図 15)。よって mRNA 存在量の観点からも、遠心性転写条件では標的遺伝子の抑制は認められなかった。

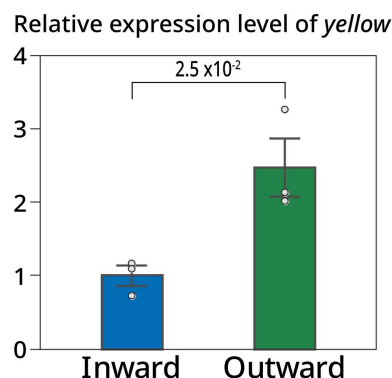


図 15 外向性転写誘導時の標的遺伝子 mRNA 存在量の相対比較

NC14 初期胚を用いて *yellow* 遺伝子の相対 mRNA 存在量を RT-qPCR により比較した ( $n = 3$ )。発現量は rp49 遺伝子により補正後、Inward を 1 として正規化した。p 値はスチューデント t 検定により算出。

### 3-3-4 *rho* NEE エンハンサー領域における転写も標的遺伝子を抑制する

ここまで、エンハンサー転写による遺伝子転写抑制はすべて *sna shadow* エンハンサーを用いて検証してきた。エンハンサー領域への RNApol II の侵入による活性化抑制が *sna shadow* エンハンサー特異的であるのか確かめるため、発生遺伝子でありエンハンサー領域の解析が進んでいる *rho* 遺伝子の NEE (neuroectoderm element) エンハンサー<sup>85</sup>を用いて同様の観察を行った。*rho* NEE エンハンサーの上流に転写開始点を配置しない条件、エンハンサーに対して内向きおよび外向きに転写開始点を配置する条件の合計 3 系列について *sna shadow* エンハンサーと同様に観察を行った (図 16A, B)。その結果、*sna shadow* エンハンサーで得られた結果と一致して、エンハンサー領域における求心性の転写では標的遺伝子の活性化が抑制される一方、遠心性転写が生じている場合にはエンハンサーおよび標的遺伝子がともに高い転写活性を示した (図 16C-E)。ここで、*sna shadow* エンハンサーは 1.6 kb ほどの長さであるのに対して、*rho* NEE エンハンサーは *rho* 遺伝子の発現パターン実現に十分な 666 bp の最小構成エンハンサーを使用した<sup>85</sup>。したがって、エンハンサー領域における転写を介した標的遺伝子の活性化抑制はエンハンサーの種別のみならず、転写されるエンハンサー領域の長さにも依存しないことが示唆された。

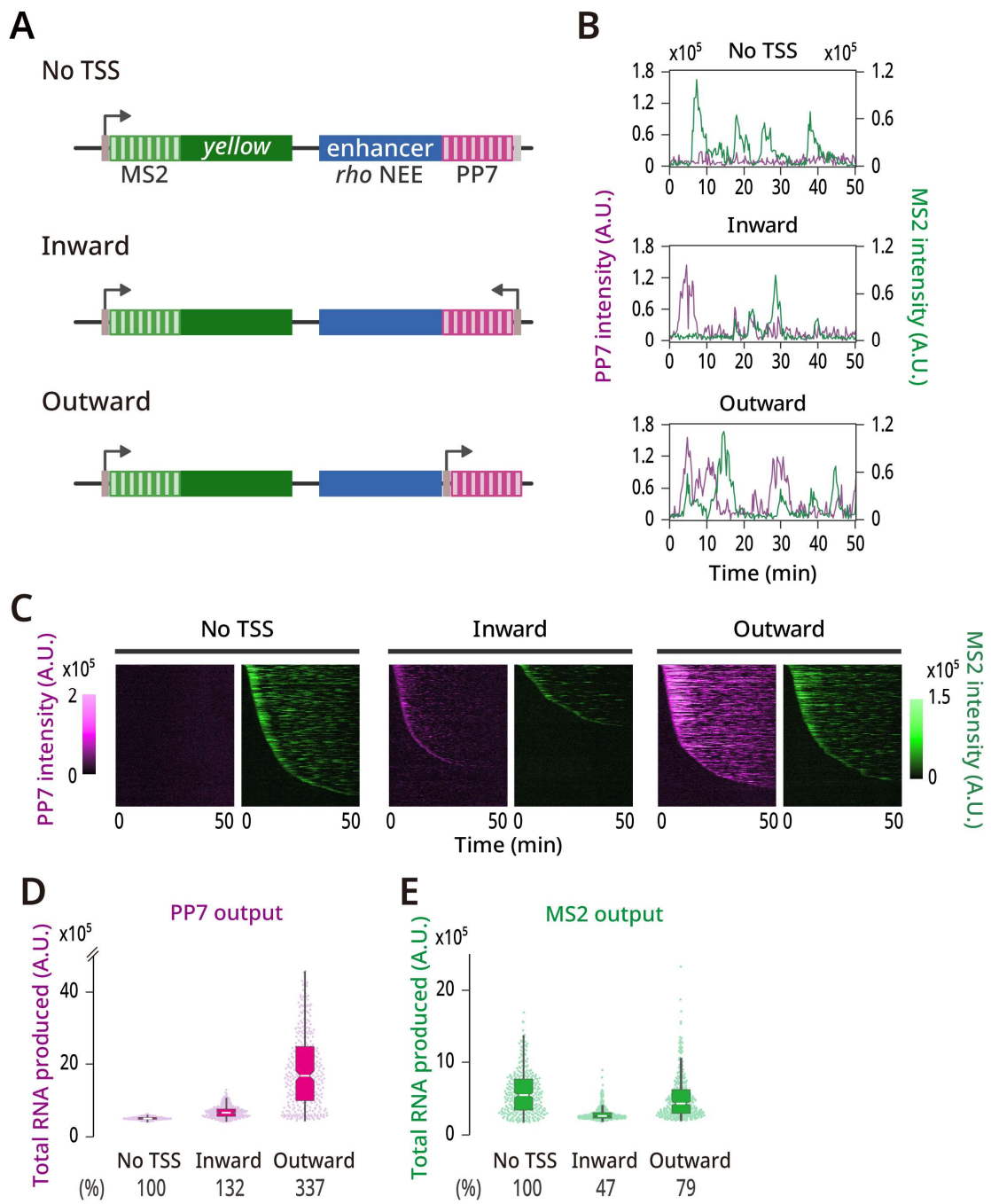


図 16 *rho* NEE エンハンサー上の転写も標的遺伝子活性化を抑制する

(図 16)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。MS2-yellow レポーター遺伝子の下流に *rho* NEE エンハンサーおよび 24x PP7 リピート配列を配置した (−TSS)。PP7 配列に隣接して DSCP を TSS モチーフとして配置した (Inward)。TSS-PP7 カセットを反転させることでエンハンサー領域に対して外方向へ転写を誘導した (Outward)。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。−TSS、Inward および Outward のレポーター系統それぞれについて合計で 331、313 および 345 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。二重線は全データの 99%以上を図示していることを示す。

### 3-3-5 エンハンサー領域における両方向性の転写も標的遺伝子を抑制する

ショウジョウバエではエンハンサー領域に存在する転写開始点の性質として一方向性が強いことが知られる<sup>49</sup>。一方で、哺乳類では転写開始点から上流および下流へ向かって両方向性の転写が生じていることが知られる<sup>47</sup>。ショウジョウバエにおいても一部の転写開始点では両方向性の転写が生じているため、両方向性の転写においても標的遺伝子の転写活性化を抑制する機能を保持しているのか確かめた。図 14 で使用した遠心性転写レポーター系を利用し、さらにエンハンサーと遠心性 TSS の間にエンハンサー方向へ転写を開始する転写開始点を挿入した (図 17A, B)。その結果、遠心性転写条件では見られなかった標的遺伝子活性化の抑制が、両方向性のエンハンサー転写条件では再度観察された (図 17C-E)。また、このとき観察された PP7 発現量の低下は図 14 において示唆された、エンハンサー転写による自己転写活性の低下と整合するものであった。これら結果から、ショウジョウバエゲノムにおいても両方向性のエンハンサー転写は標的遺伝子の抑制に対して機能的に働くことが確かめられた。

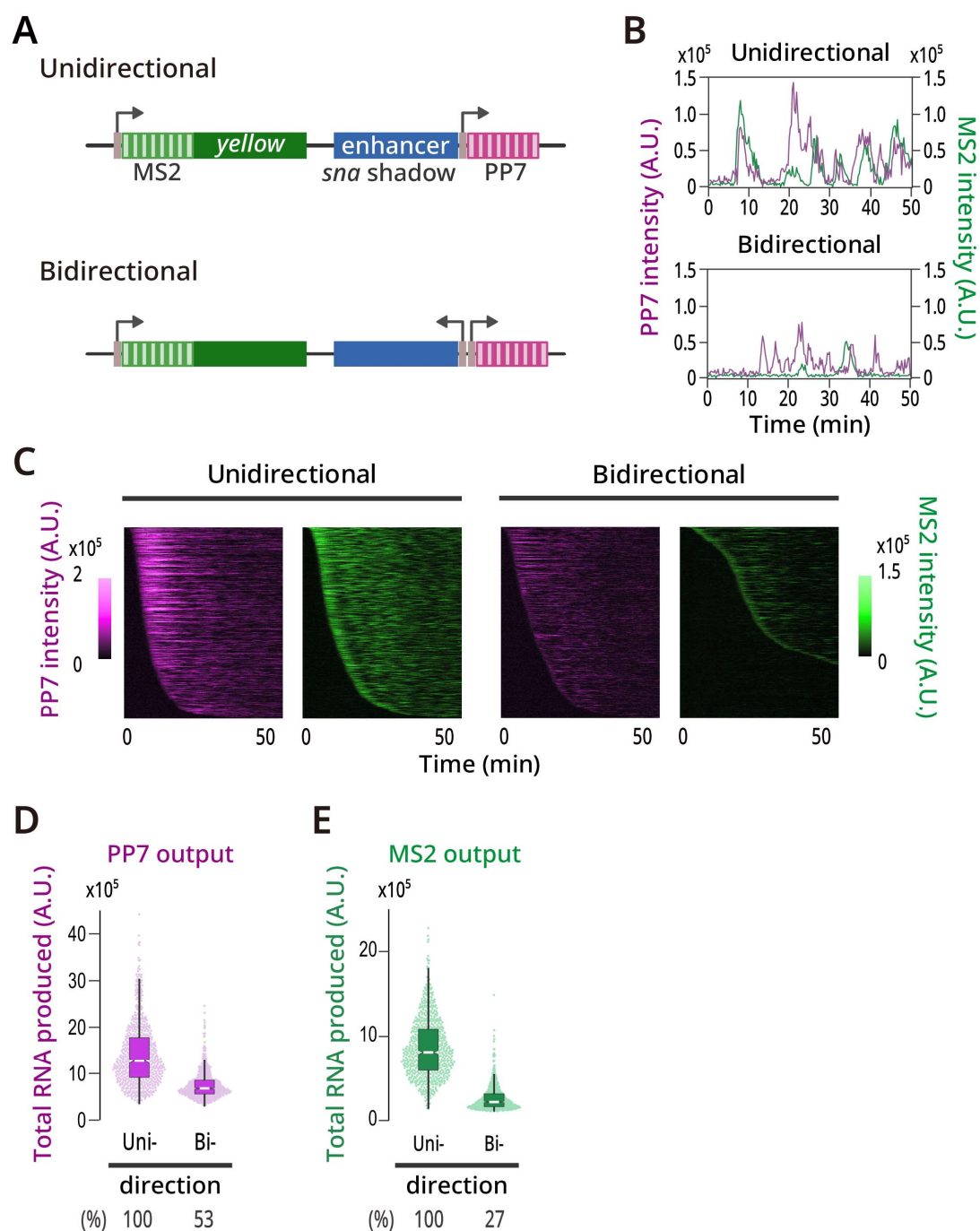


図 17 両方向性の転写は標的遺伝子活性化を抑制する

(図 17)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。エンハンサーに隣接する遠心性 TSS にさらにエンハンサー方向へ向かう TSS を加え両方向性の TSS を設計した。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。Unidirectional および Bidirectional のレポーター系統それぞれについて合計で 717 および 672 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

### 3-4 エンハンサー領域への RNA pol II の侵入は転写因子の集合を妨害する

エンハンサー領域での転写における様々な条件を個別に検証した結果、エンハンサー領域を転写機構が通過するという事象が標的遺伝子の転写活性化抑制に寄与していることが明らかとなった。転写つまり RNA pol II がエンハンサー領域を通過することにより、どのようにエンハンサーおよび標的遺伝子の活性化が抑制されるのかを検討した。その一つの仮説として、エンハンサー領域上を通過する RNA pol II によってエンハンサー領域への転写因子の結合が妨げられている可能性に至った(図 18)。近年の研究から、RNA pol II による転写は DNA をヌクレオソームから引きはがすと知られ<sup>86-88</sup>、同様に DNA を相互作用している転写因子から引きはがしている可能性を考慮した。また、RNA pol II により転写が行われている領域では DNA はヘリケースにより開裂されている。転写因子が有する DNA 結合ドメインは DNA 二重らせんの形成する主溝など立体構造を認識することが知られ<sup>89,90</sup>、RNA pol II による転写は DNA の構造的な変化により転写因子の結合を妨げている可能性も考慮した。

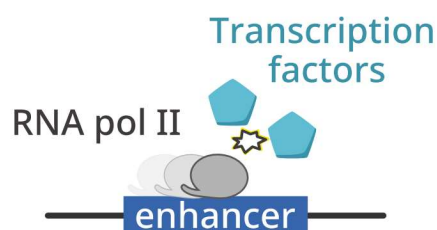


図 18 作業仮説：転写伸長中の RNA pol II が転写因子の DNA 結合を妨害する

### 3-4-1 エンハンサー領域に集合する転写因子の可視化

エンハンサー領域における転写が転写因子の集合に与える影響を定量するため、エンハンサー領域へ結合する内在転写因子を蛍光タンパク質により標識することとした。*sna* 遺伝子では、転写因子 Dorsal および Zelda のエンハンサー結合によりエンハンサーおよび *sna* 遺伝子発現が活性化することが知られる。本研究で使用している *sna shadow* エンハンサー内にも Zelda および Dorsal 結合ピークが存在していることから(図 19A)、CRISPR/Cas9 により内在 Dorsal および Zelda に GFP 標識を施した。Dorsal-GFP については本研究において作製を行い、Zelda-GFP については深谷雄志博士より提供いただいた。最近の研究から、Dorsal および Zelda は転写活性化領域において複数分子が集合するクラスターを形成することが知られており<sup>44,45</sup>、作製した Dorsal-GFP および Zelda-GFP においても同様の現象が観察できるのか確認した。そこで、*sna-MS2* 系統(深谷雄志博士より提供)を用いて *sna* 遺伝子転写領域における転写因子の局所濃度を可視化した。*sna-MS2* の転写位置を MCP-mCherry により特定し、その領域における転写因子の局所的な集合を Dorsal-GFP あるいは Zelda-GFP シグナルにより観察した(図 19B)。観察は Airyscan 超解像顕微鏡により行い、*sna* 遺伝子領域の位置を 3 次元画像内で特定したのち、その Z 平面画像において遺伝子領域付近の GFP シグナルを定量した(図 19C)。得られた画像を平均化し、周囲の転写因子量に対する相対的な局所濃度をヒートマップとして可視化したところ、Dorsal では周囲のおよそ 1.6 倍(図 19D)そして Zelda ではおよそ 1.3 倍(図 19E)の局所的な集合が見られた。*sna shadow* エンハンサーに結合する Dorsal および Zelda について、その集合を可視化することができたことから、次にエンハンサー領域における転写がこの集合を妨害する影響を有しているのか検証に進んだ。

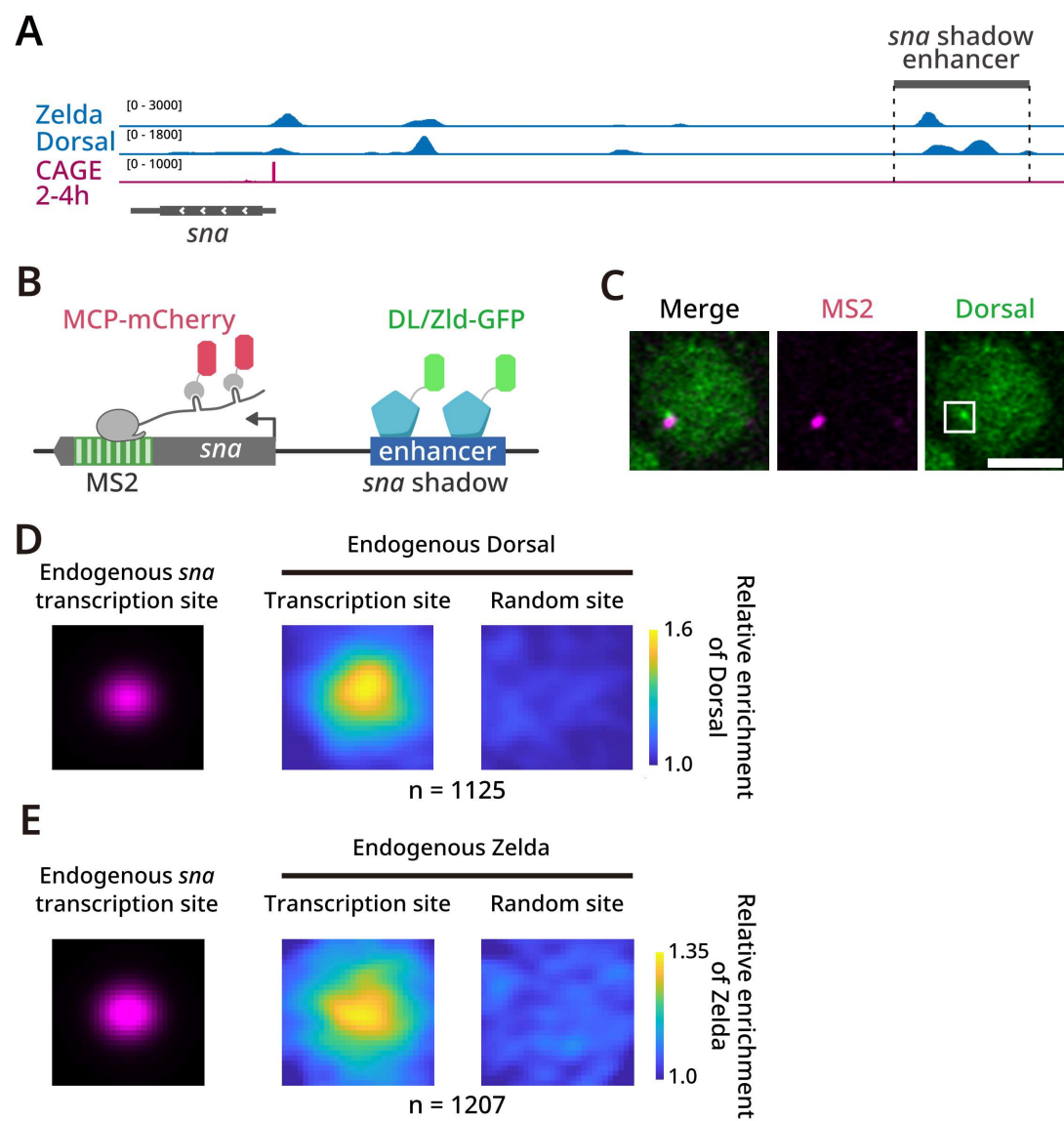


図 19 内在 *sna* 遺伝子上における転写因子の局所的な集合の可視化

(図 19)

- (A) 内在 *sna* 遺伝子領域周辺の IGV (Integrative genome browser) スナップショット。使用しているデータは、野生型ショウジョウバエ NC13 初期胚での Zelda ChIP-seq (GSM763061, Harrison et al., 2011)、野生型ショウジョウバエ受精後 2-4 間初期胚での Dorsal ChIP-seq (GSM1341814, He et al., 2015) および野生型ショウジョウバエ受精後 2-4 時間初期胚での CAGE-seq (ERR1425056, Schor et al., 2017) データ
- (B) 転写活性化領域およびその周辺での転写因子の可視化方法を表した模式図。転写中の *sna*-MS2 の位置を MCP-mCherry により可視化し、その周辺における Dorsal-GFP あるいは Zelda-GFP の分布を定量した。
- (C) Airyscan 超解像顕微鏡を用いた、MS2 発現領域を含む Z 平面画像での MS2 および Dorsal-GFP シグナル画像。白枠は MS2 発現位置を中心とする解析に使用した 29 x 29 ピクセル領域。スケールバーは 3  $\mu$ m を示す。
- (D) 平均化した *sna*-MS2 シグナルのヒートマップ画像 (左)。MS2 発現領域を中心として平均化した Dorsal-GFP シグナルのヒートマップ画像 (中央)。無作為に選ばれた地点を中心として平均化した Dorsal-GFP シグナルのヒートマップ画像 (右)。20 個体の初期胚から観察された合計 1125 個の MS2 転写中の核を解析した。
- (E) 平均化した *sna*-MS2 シグナルのヒートマップ画像 (左)。MS2 発現領域を中心として平均化した Zelda-GFP シグナルのヒートマップ画像 (中央)。無作為に選ばれた地点を中心として平均化した Zelda-GFP シグナルのヒートマップ画像 (右)。20 個体の初期胚から観察された合計 1207 個の MS2 転写中の核を解析した。

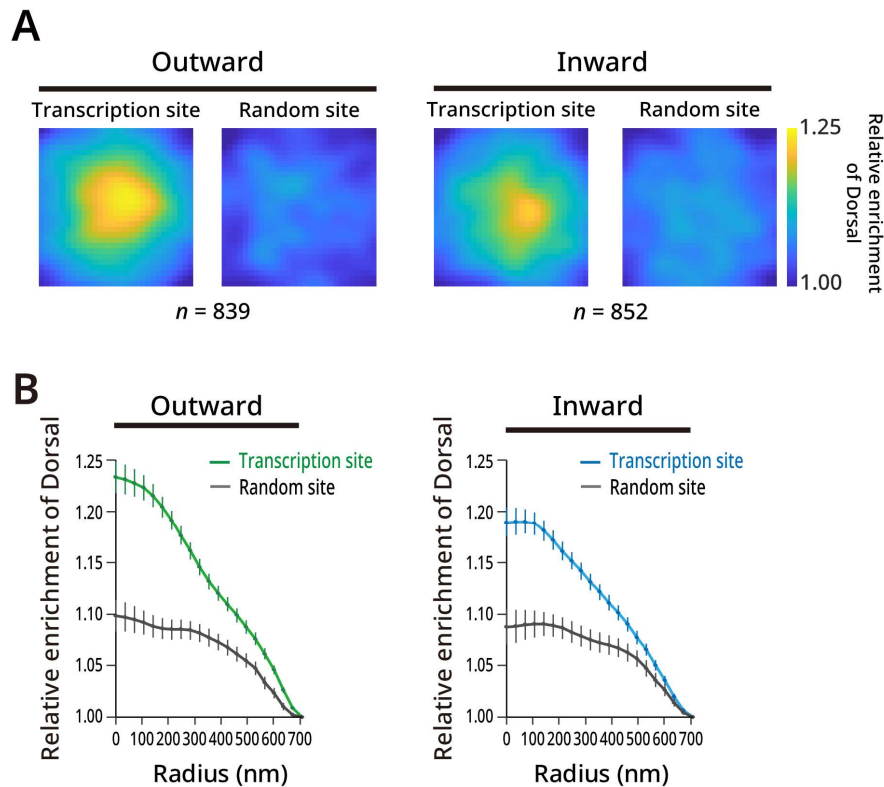
### 3-4-2 エンハンサー領域における転写は転写因子の集合を妨げる

まずエンハンサー転写が転写因子 Dorsal の集合に与える影響を定量するため、図 14 において使用した求心性および遠心性エンハンサー転写の 2 系統において、Dorsal-GFP の局所濃度を可視化した。遠心性転写の系統において Dorsal の分布を観察すると、レポーター配列上の *sna* shadow エンハンサー領域においても、無作為に選択した領域と比べ Dorsal の局所的なクラスター形成が観察された (図 20A 左)。一方で、遠心性転写の場合と比べ、エンハンサー領域上を RNA pol II が通過する求心性の転写の場合には、その集合が減弱している傾向が見られた (図 20A 右)。より詳細に局所的な転写因子集合の差を比較するため、転写領域からの距離に対する転写因子の相対濃度をプロットした。その結果、実際に求心性転写の系統では全体に低い相対濃度を示していた (図 20B、 $p=0.02$ )。このことから、エンハンサー領域上を通過するように生じる転写によってエンハンサー上への転写因子の集合が妨害されることが明らかとなった。

同様に、Zelda においてもエンハンサー転写の影響を観察したところ、Zelda-GFP も遠心性転写レポーター上へ集積していた (図 21A 左)。しかし、Zelda に関しても求心性転写条件では転写因子クラスターが分散しているような分布が得られた (図 21A 右)。中心距離に対する分布として可視化した場合においても、求心性のエンハンサー転写により転写因子クラスターの集合が減弱している傾向があった (図 21B、 $p=0.42$ )。Zelda については Dorsal と比較して、内在 *sna* 遺伝子上においてもレポーター配列上においても局所的集合の程度がわずかに弱く観察された。これは両者の発現量の違いや、Zelda がパイオニア転写因子として NC14 において活性化される遺伝子群に対して広範に結合するのに対し、Dorsal は背腹軸を決定する遺伝子群にのみ結合するという標的遺伝子数の差、あるいは Zelda は転写活性化のためのクロマチン弛緩に関わるという役割の違いに由来していると考えられる。

以上の結果から、転写因子 Dorsal および Zelda いずれにおいても、エンハンサー転写によりエンハンサー領域上への集積の減少が見られた。したがって、エンハンサー領域

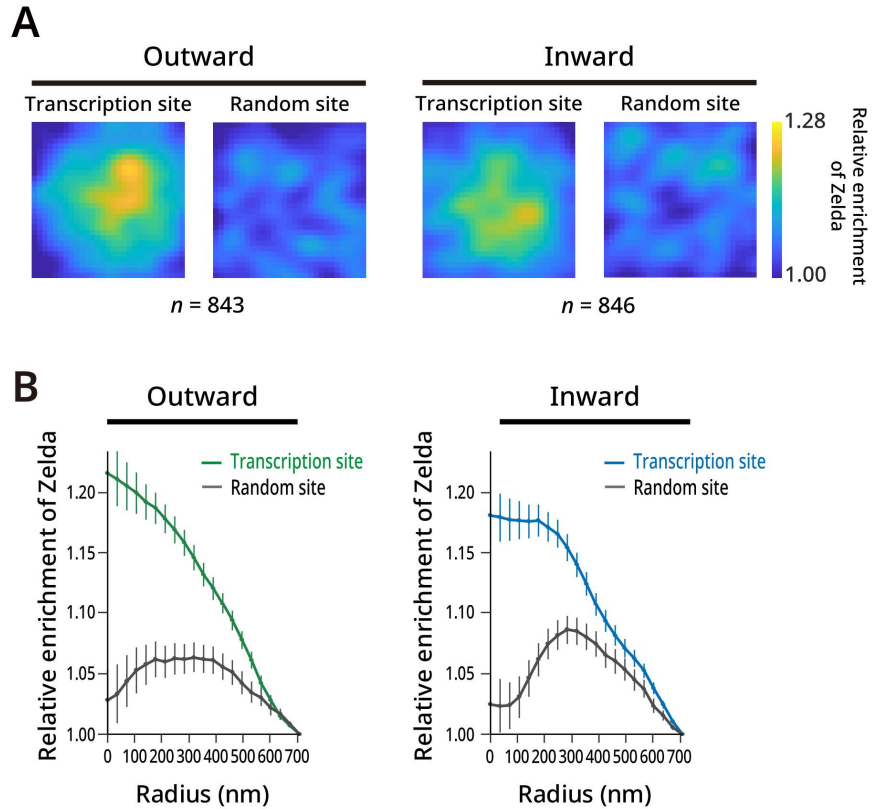
における転写は転写因子群のエンハンサーへの結合を妨害することにより、エンハンサーによる標的遺伝子の転写活性化を妨げていることが示唆された。



**図 20 エンハンサー領域による転写は Dorsal の局所的な集合を妨害する**

エンハンサー領域から遠心性の転写を誘導したレポーター（左、図 14A 下）および求心性の転写を誘導したレポーター（右、図 14A 上）系統において PP7 発現と Dorsal-GFP シグナルを定量した。

- (A) PP7 発現領域および無作為に選ばれた地点を中心として平均化した Dorsal-GFP シグナルのヒートマップ画像。Outward、Inward それぞれの系統において 50 個体ずつの初期胚から観察された合計 839 および 852 個の PP7 転写中の核を解析した。
- (B) (A) で示されたヒートマップにおいて中心からの距離に対する相対 Dorsal-GFP 濃度をプロットした分布曲線。Outward および Inward の各データ曲線における面積を用いてウィルコクソンの順位和検定を行った ( $p = 0.02$ )。エラーバーは標準誤差を示す。



**図 21 Zelda の局所的な集合に対するエンハンサー転写の影響**

エンハンサー領域から遠心性の転写を誘導したレポーター（左、図 14A 下）および求心性の転写を誘導したレポーター（右、図 14A 上）系統において PP7 発現と Zelda-GFP シグナルを定量した。

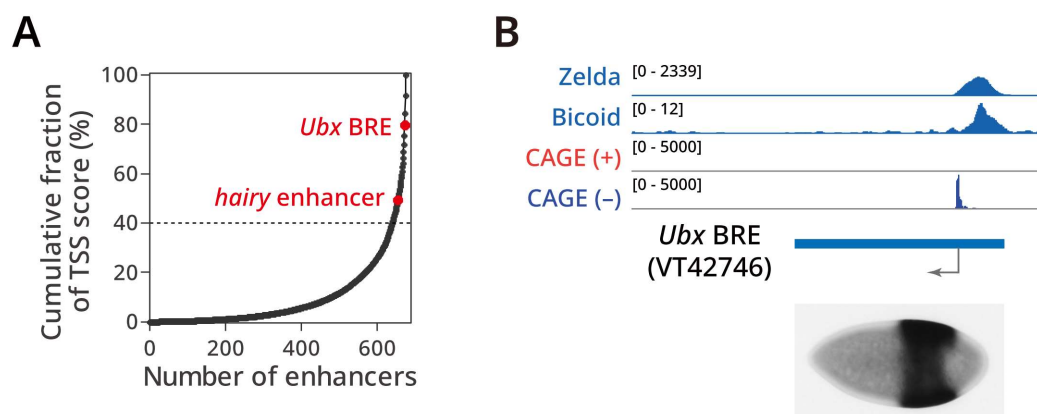
- (A) PP7 発現領域および無作為に選ばれた地点を中心として平均化した Zelda -GFP シグナルのヒートマップ画像。Outward、Inward それぞれの系統において 50 個体ずつの初期胚から観察された合計 846 および 843 個の PP7 転写中の核を解析した。
- (B) (A) で示されたヒートマップにおいて中心からの距離に対する相対 Zelda -GFP 濃度をプロットした分布曲線。Outward および Inward の各データ曲線における面積を用いてウィルコクソンの順位和検定を行った ( $p = 0.42$ )。エラーバーは標準誤差を示す。

### 3-5 内在エンハンサーに存在する転写開始点の機能検証

ショウジョウバエのゲノム中に形成したレポーター系の活用により、エンハンサーにおける転写が転写因子の集合を妨げることが示唆された。一方で、上述の検証は内在的に転写が生じていないエンハンサーにおいて人工的に転写を誘導することでその影響を検証していた。そこで、ここまでで見られたエンハンサー転写の遺伝子制御に対する抑制的な効果が内在ゲノム中のエンハンサーにおいても生じているのか検証を行った。

#### 3-5-1 発生過程において領域内で転写を引き起こすエンハンサーの同定

内在性エンハンサー転写の機能を明らかにするため、ショウジョウバエ初期胚においてエンハンサー活性と転写活性をともに有するゲノム領域（転写性エンハンサー）の同定を目指した。方法として、複数の公開 NGS データを組み合わせることで再解析することにより、目的のゲノム領域を同定した。まず一つ目に、ショウジョウバエ初期胚においてゲノム網羅的にエンハンサー活性を示すゲノム領域を同定し、さらにその標的遺伝子まで検証したデータセットを用いた<sup>6</sup>。二つ目に、受精後 2-3 時間のショウジョウバエ初期胚において CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)-seq 法によりゲノム中の転写開始点およびその強度を評価したデータを利用した<sup>74</sup>。これらを組み合わせることで、発生遺伝子エンハンサー上における転写開始シグナルを定量した。その結果、678 個の解析対象エンハンサーの中から 37 個のエンハンサーを転写性エンハンサーとして同定した（図 22A、補足-1）。得られた転写性エンハンサーの中でも *Ubx* (*Ultrabithorax*) 遺伝子を標的とするエンハンサーに注目した（図 22B）。*Ubx* 遺伝子は翅形成に関わる遺伝子として長く研究されてきた遺伝子であり、同定されたゲノム領域も BRE (bx region enhancer) と呼ばれる *Ubx* 遺伝子の発現パターンを決めるエンハンサーとして古くから知られる領域を含んでいたことから、このゲノム領域を用いて内在エンハンサー由来の転写を可視化、解析することとした。



**図 22 内在性エンハンサー転写を引き起こすゲノム領域の同定**

- (A) 発生遺伝子を標的とするエンハンサーにおける TSS スコアの累積分布関数。合計 678 個のエンハンサーにおいて CAGE-seq データに由来する転写開始シグナルの評価を行った。点線は転写性エンハンサーの判定基準とした閾値。
- (B) 内在 *Ubx* 遺伝子領域周辺の IGV スナップショット。使用しているデータは、野生型ショウジョウバエ NC13 初期胚での *Zelda* ChIP-seq (GSM763061, Harrison et al., 2011) 野生型ショウジョウバエ NC14 初期胚での *Bicoid* ChIP-seq (GSE86966, Hannon et al., 2017) および野生型ショウジョウバエ受精後 2-4 時間初期胚での CAGE-seq (E-MTAB-478, Schor et al., 2017) 統合データ。

### 3-5-2 *Ubx* BRE のエンハンサー転写は標的遺伝子転写活性化と協調的である

図 22B に示されるように *Ubx* BRE では強く一方向性にエンハンサー転写が生じていることがわかる。そこでエンハンサー転写の方向に対して上流に *MS2-yellow* レポーター遺伝子、下流に PP7 配列を配置することで、標的遺伝子の転写活性化および BRE 内部からの転写を同時に可視化した (図 23A)。このとき、解析において同定した *Ubx* エンハンサー領域のうち、*Zelda* ピークおよび転写開始点を含む約 1.2 kb を用いた。観察を行ったところ、標的遺伝子およびエンハンサー転写の両者の転写活性を検出することに成功した (図 23B, C)。このことから、内在性エンハンサーにおいて生じるエンハンサー転写は、周囲の領域により誘導されるのではなくエンハンサー自身の活性によって活性化することも示唆された。次に、内在性エンハンサー転写が標的遺伝子に与える影響を調べるため、PP7 非発現中または発現中のタイムフレーム間で標的遺伝子の発現強度

を比較した。その際、非活性化状態の核を除くため PP7 および MS2 のいずれも発現していないタイムフレームは除外した。その結果、*Ubx* BRE はエンハンサー転写中により強く標的遺伝子を活性化していた (図 23D)。よって、*Ubx* BRE ではエンハンサー転写は標的遺伝子の活性化に対して抑制的な働きを有しておらず、反対に協調的に両者の転写を活性化していることが示唆された。ここで、人工的にエンハンサー転写を誘導した実験系で観察されたエンハンサー転写の抑制的な働きが見られなかった原因として、2つの可能性が挙げられた。ひとつは内在の転写性エンハンサーでは RNA pol II の通過に対して耐性あるいは寛容性があるという可能性である。また、もう一つは、*Ubx* BRE ではエンハンサー転写がその領域内部から転写因子結合領域と反対方向へ向かって生じているため (図 22B)、転写因子集合に対する妨害が生じなかったという可能性である。これら検証を行うため、*Ubx* BRE を用いてさらに解析を進めた。

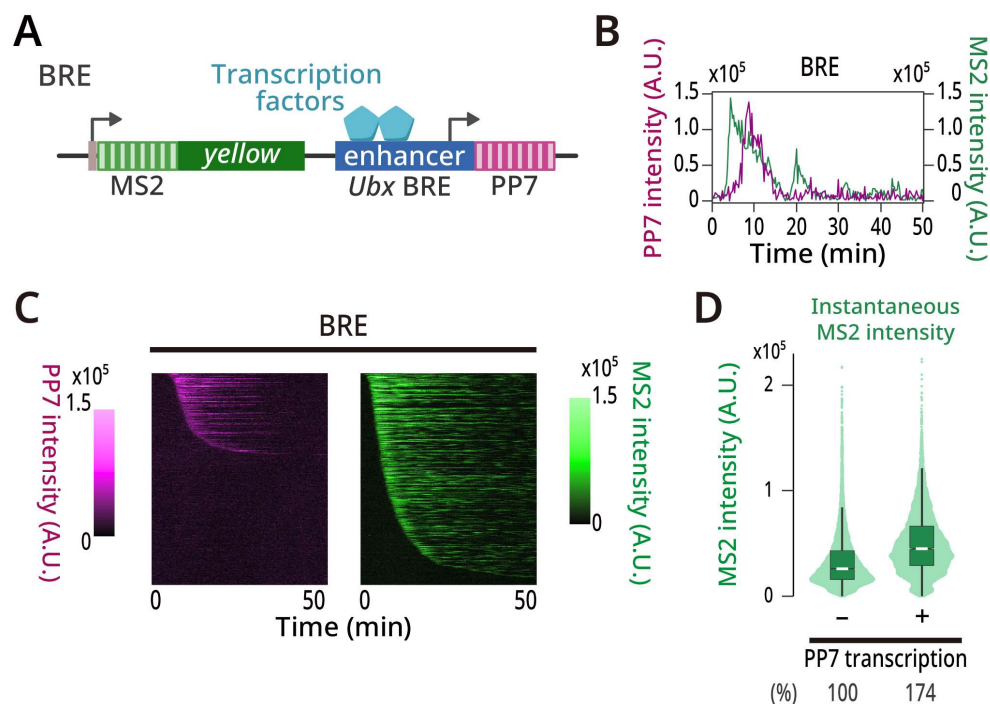


図 23 *Ubx* BRE はエンハンサー転写と協調的に標的遺伝子を活性化する

(図 23)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。MS2-yellow レポーター遺伝子の下流に、下流の PP7 方向へエンハンサー転写が開始するよう約 1.2 kb の *Ubx* BRE を配置した。
- (B) MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。合計で 582 個の核領域を 3 個体の初期胚の観察から得た。
- (D) PP7 の発現の有無によりグループ分けされた各タイムフレームでの MS2 転写活性の分布。PP7 あるいは MS2 いずれかが転写状態のタイムフレームを対象とした。3 個体の初期胚に由来する合計 224 個の PP7 転写を示した核を用いた。パーセント表記は中央値の相対値を表す。

### 3-5-3 *Ubx* BRE はエンハンサー転写方向の制御により活性化抑制を回避する

*Ubx* BRE においては、内在性のエンハンサー転写が標的遺伝子活性化に対して抑制的に働かなかった。抑制が見られなかった原因が BRE 内から開始する転写が転写因子結合領域と逆方向を向いているためであると仮説を立て、転写因子結合領域上を通過するように転写を誘導した場合には活性化の抑制が生じるのか検証する。方法として、*Ubx* BRE の向きを反転させたのち、内在転写開始点の上流側への転写開始点付加の有無により比較を行った (図 24A)。これにより、内在転写開始点の上流に存在する転写因子結合領域を通過するような転写の影響を定量することを図った。観察の結果、転写開始点付加条件でのみ PP7 の発現が見られ、そのとき標的遺伝子に関して転写活性の低下および活性化する核の割合の減少傾向も見られた (図 24B, C)。総転写産物量を比較したところ、転写因子結合領域へ向かう転写を誘導した場合には、標的遺伝子の転写活性が強く抑制されていた (図 24D, E)。また、このとき *Ubx* BRE の反転による標的遺伝子転写活性の低下も見られたが、これは図 13 で確認された対向性の転写衝突による転写活性の低下と一致するものであった。以上の結果から、*Ubx* BRE は RNA pol II の転写因子結合領域への侵入により活性化抑制を受ける性質を潜在的に有していること、その抑制を回避するように内在の転写開始点を保持することで高い転写活性化能を維持していることが明らかになった。

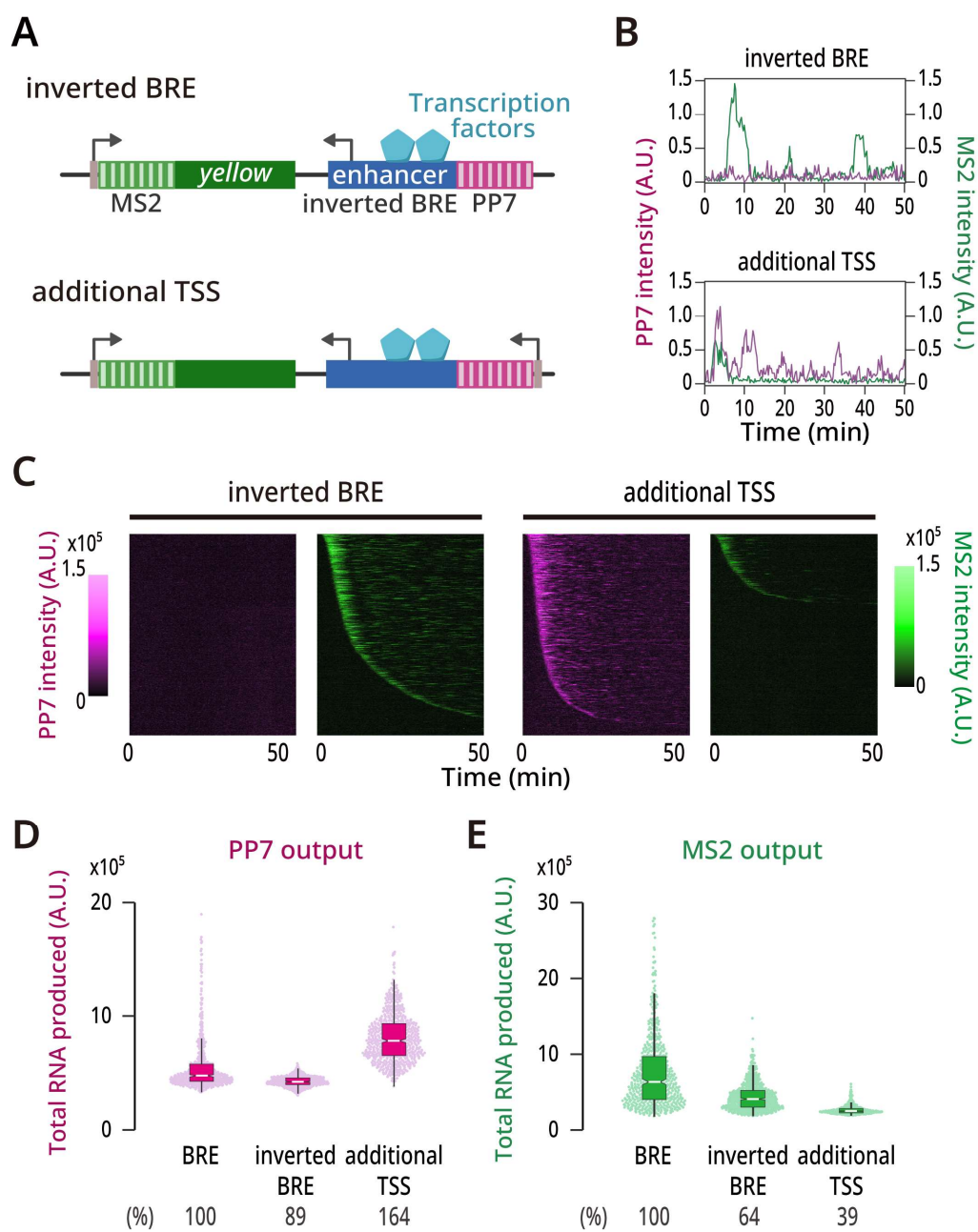


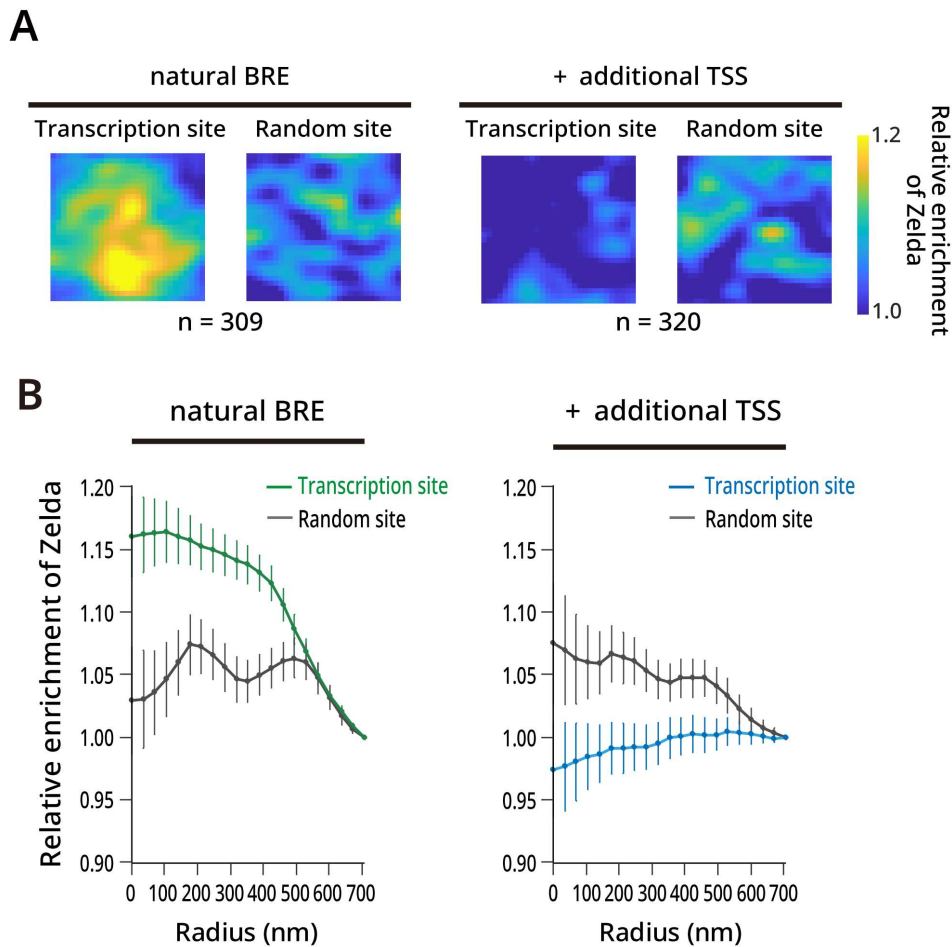
図 24 Ubx BRE も転写因子結合領域への RNA pol II 侵入により活性化を抑制される

(図 24)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。図 23A において使用したレポーター (BRE) から BRE-PP7 カセットを反転させた (inverted BRE)。さらに BRE に隣接して TSS を付加した (additional TSS)。
- (B) MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。inverted BRE および additional TSS のレポーター系統それぞれについて合計で 654 および 636 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。BRE は図 23 における BRE と同一のデータに由来する。

### 3-5-4 *Ubx* BRE においても RNA pol II の侵入は転写因子の集合妨害を導く

*Ubx* BRE において転写開始点をさらに付加することで転写活性化の抑制が見られた。この効果が *sna shadow* エンハンサーにおける抑制効果と同様に、エンハンサー領域における転写因子の集合妨害に起因するものであるか検証を行った。*Ubx* BRE においても *Zelda* 結合ピークが存在していることから (図 22B)、図 24 において観察した 2 系統について MS2 発現領域における *Zelda* の分布を定量した。*sna shadow* エンハンサーにおける観察と一致して、*Ubx* BRE においても転写因子結合領域を転写が通過しない場合には顕著に *Zelda* クラスターの形成が観察された (図 25A, B 左)。転写開始点をさらに付加した場合も *sna shadow* エンハンサーと同様、クラスター形成の減弱が認められた (図 25A, B 右、 $p = 0.01$ )。これらの結果から、内在遺伝子のエンハンサーにおいても転写因子結合領域への RNA pol II の侵入は転写因子の集合を妨げ、標的遺伝子の活性化を抑制していた。



**図 25 内在の転写性エンハンサーにおいても転写因子結合領域への RNA pol II の侵入は転写因子の集合を妨害する**

野生型の *Ubx* BRE（左、図 24A 上）および TSS を付加した BRE（右、図 24A 下）を含むレポーター系統において MS2 転写領域での Zelda-GFP シグナルを定量した。

(A) MS2 発現領域および無作為に選ばれた地点を中心として平均化した Zelda -GFP シグナルのヒートマップ画像。natural BRE および+additional TSS それぞれの系統において 50 個体ずつの初期胚から観察された合計 309 および 320 個の MS2 転写中の核を解析した。

(B) (A) で示されたヒートマップにおいて中心からの距離に対する相対 Zelda -GFP 濃度をプロットした分布曲線。natural BRE および+additional TSS の各データ曲線における面積を用いてウィルコクソン順位和検定を行った ( $p = 0.01$ )。エラーバーは標準誤差を示す。

### 3-5-5 転写因子結合領域を通過する内在エンハンサー転写は標的遺伝子と排他的に活性化する

*Ubx* BRE では内在エンハンサー転写の方向が転写因子結合領域と逆方向であったために、標的遺伝子の活性化と協調的にエンハンサー転写も活性化されることが示唆された。そこで、エンハンサー転写による標的遺伝子活性化に対する抑制が内在ゲノムにおいても利用されている現象であるのか確かめるため、転写因子結合領域に指向する転写開始点をもったエンハンサーにおいて観察を行うこととした。その条件を満たすエンハンサーとして、本研究により同定した転写性エンハンサーの中から、ペアルール遺伝子のひとつであり抑制性転写因子として働く *hairy* 遺伝子のエンハンサーを見出した（図 22A）。*hairy* エンハンサーは中央にもつ転写因子結合領域に対し、その領域を向く転写開始点を有している（図 26A）。この *hairy* エンハンサーを用いて *Ubx* BRE と同様にレポーターを構築し、標的遺伝子とエンハンサー領域の転写を同時可視化した（図 26B, C）。MS2 および PP7 の発現が両者ともに同一核で見られたことから、*Ubx* BRE における解析（図 23D）と同様に、エンハンサー転写活性の有無に応じて各タイムフレームの標的遺伝子転写活性をプロットした（図 26D）。その結果、*Ubx* BRE ではエンハンサー転写と協調的に標的遺伝子が転写活性化していた一方で、*hairy* エンハンサーではエンハンサー転写活性化時に標的遺伝子転写活性の低下が認められた。データの分布からエンハンサー転写時には標的遺伝子が発現していないとみられる核も多く見受けられ、これらの結果は内在エンハンサーにおいてもエンハンサー転写による標的遺伝子抑制が生じている可能性を強く支持するものであった。

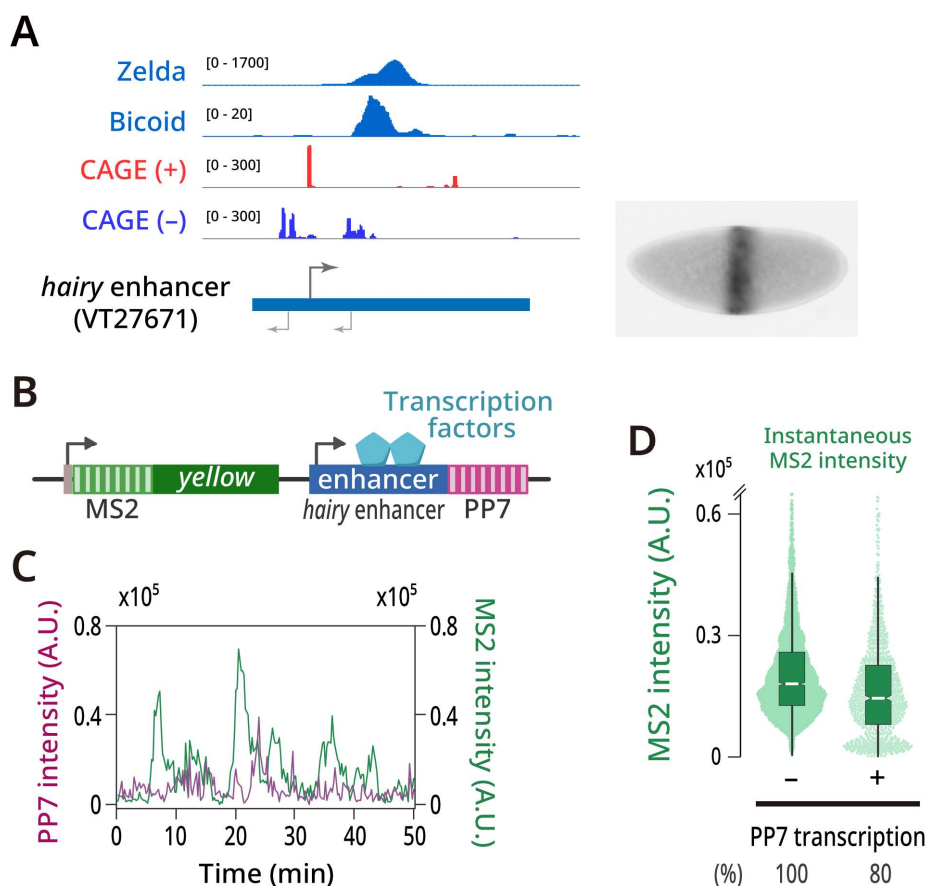
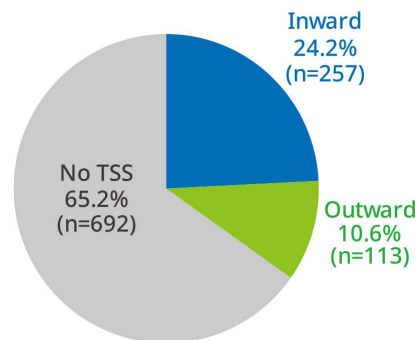


図 26 転写因子結合領域上を通過する内在エンハンサー転写は標的遺伝子の転写活性と排他的に生じる

- (A) 内在 *hairy* エンハンサー周辺の IGV スナップショット。使用しているデータは、野生型ショウジョウバエ NC13 初期胚での Zelda ChIP-seq (GSM763061, Harrison et al., 2011) 野生型ショウジョウバエ NC14 初期胚での Bicoid ChIP-seq (GSE86966, Hannon et al., 2017) および野生型ショウジョウバエ受精後 2-4 時間初期胚での CAGE-seq (E-MTAB-478, Schor et al., 2017) 統合データ。
- (B) 観察に用いたレポーター配列。MS2-*yellow* レポーター遺伝子の下流に、下流の PP7 方向へエンハンサー転写が開始するよう約 1.3 kb の *hairy* エンハンサーを配置した。
- (C) MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (D) PP7 の発現の有無によりグループ分けされた各タイムフレームでの MS2 転写活性の分布。PP7 あるいは MS2 いずれかが転写状態のタイムフレームを対象とした。3 個体の初期胚に由来する合計 78 個の PP7 転写を示した核を用いた。パーセント表記は中央値の相対値を表す。二重線は全データの 99%以上を図示していることを示す。

*Ubx* BRE および *hairy* エンハンサーを用いた実験により、内在のエンハンサーでは転写開始点の方向が標的遺伝子制御に重要であると示唆された。そこで、内在エンハンサーにおいて、それらが包含する転写因子結合領域に対して付近に求心性あるいは遠心性の転写開始点をもっている割合を調べた。解析には公開データを利用し、ショウジョウバエ初期胚において発生遺伝子プロモーターに対してエンハンサー活性をもつことが報告されているゲノム領域のデータセット<sup>6</sup>、NC13 および NC14 のショウジョウバエ初期胚に対する Zelda ChIP-seq データ<sup>91</sup>、およびショウジョウバエのゲノム網羅的に転写開始点としての活性を評価した RAMPAGE-seq 公開データ<sup>77</sup>の三者を活用した。これらを組み合わせ、Zelda 結合領域をもつ合計 1062 個のエンハンサーが、付近にどのような方向性の転写開始点を保有しているか調べた。その結果、全体の約 25%ものエンハンサーにおいて、エンハンサー転写開始点が転写因子結合領域に向かって形成されていることが判明した (図 27)。これらエンハンサーでは、転写因子結合領域に向かうエンハンサー転写により標的遺伝子の転写活性が弱く調節されていることが予想される。このことは、先行研究において発生遺伝子エンハンサーでは標的遺伝子に対する転写活性化能とエンハンサー転写活性の間に負の相関が見られる<sup>54</sup>と報告されたことにも一致している。反対に、ハウスキーピング遺伝子のエンハンサーなどでは遠心性の転写開始点が多いために、ゲノム上のエンハンサーに対して網羅的になされた解析では正の相関が見られた可能性が想定される<sup>46,47,52,53</sup>。



**図 27 多くのエンハンサーが転写因子結合領域に向かう転写開始点を周辺に持つ**

Zelda 結合領域をもつエンハンサーに対して、その結合領域から前後 500 bp 以内に転写開始点をもたない (No TSS)、1 つ以上の求心性の転写開始点をもつ (Inward)、遠心性の転写開始点をもつ (Outward) エンハンサーに分類した。

### 3-6 内在エンハンサーにおける転写開始点の獲得が遺伝子制御に与える影響

これまでの結果から、内在ゲノムにおいても転写因子結合領域に向けた転写開始点の存在は遺伝子の転写活性化を抑制する機能をもつことが示唆された。これは進化の過程において、転写調節領域における転写開始点の形成が遺伝子の転写活性を適切な強度に調節してきた可能性を示している。そこで、内在エンハンサー領域における新規転写開始点の形成が内在標的遺伝子活性に対して影響を与えるか検証した。検証には *rho* NEE エンハンサーおよび *rho* 遺伝子を用いた。*rho* 遺伝子は *rho* NEE エンハンサー単独でその活性が制御されていることが報告されており<sup>85,92</sup>、*rho* NEE エンハンサーの活性変化が直接的に *rho* 遺伝子の活性状態に反映されることが期待された。*rho*-MS2 のショウジョウバエ系統に対し、さらに CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により転写開始点および PP7 配列を付加した系列、PP7 配列のみを付加した系列を作製した（図 28A）。MS2 により内在 *rho* 遺伝子の転写活性、PP7 により *rho* NEE エンハンサーにおける転写活性を同時に可視化することに成功した（図 28B, C）。内在エンハンサーおよび遺伝子においても、転写開始点の付加により標的遺伝子の転写が抑制され、その転写開始点を除去すると元の転写量にまで回復することが確認された（図 28D, E）。ここで興味深いことに、総転写産物量は強く抑制が見られた一方で、標的遺伝子が活性化し始めるタイミングおよび活性化する核の割合には大きな変化が見られなかった（図 28C, F, G）。このことは内在エンハンサーでの新規転写開始点の形成が、標的遺伝子の転写量を抑制しながら、初期胚における標的遺伝子の発現時期および空間的な発現パターンを維持していることを示している。

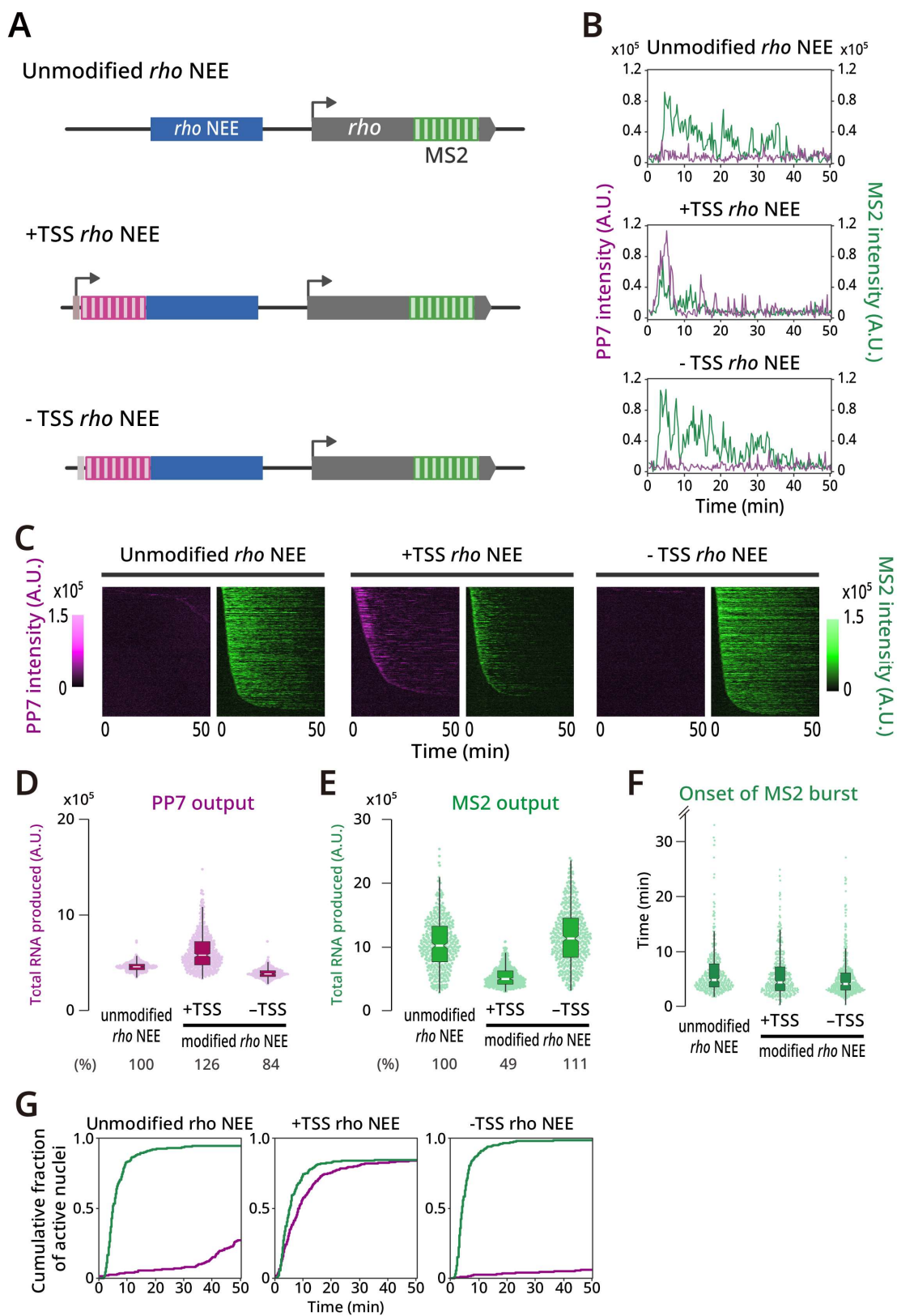


図 28 内在ゲノムにおける新規転写開始点の形成は転写量の制御に寄与する

(図 28)

- (A) 観察に用いたレポーター配列。*rho* 遺伝子の 3' UTR 領域に MS2 配列が付加されている (Unmodified *rho* NEE)。 *rho* NEE の上流へ TSS および PP7 カセットを付加することで転写を誘導した (+TSS *rho* NEE)。 *rho* NEE の上流へ PP7 リピート配列のみ付加した (-TSS *rho* NEE)。
- (B) 各レポーターにおける MS2 および PP7 シグナルの観察例。
- (C) すべての核における MS2 および PP7 シグナル強度変化のヒートマップ。各行が個々の核由来のデータを表しており、各列が個々のタイムフレームを表している。核は PP7 および MS2 シグナルそれぞれについて最初の転写が開始した時期の早いものから順に並び替えた。Unmodified *rho* NEE、+TSS *rho* NEE および -TSS *rho* NEE のレポーター系統それぞれについて合計で 390、419 および 448 個の核領域を 3 個体ずつの初期胚の観察から得た。
- (D, E) PP7 または MS2 の総転写産物量の分布。パーセント表記は中央値の相対値を表す。
- (F) 一度でも MS2 を発現した活性化細胞における最初の MS2 転写バーストの開始時間
- (G) 一度でも PP7 または MS2 を発現した活性化細胞の累積分布関数。

# 第四章

## 考察

本研究では、ショウジョウバエ初期胚において、エンハンサー転写および標的遺伝子転写活性の同時可視化に成功した。その活用により、エンハンサー領域における転写の発生は標的遺伝子の活性化に対して抑制的に働くことを明らかにした。さらに、この抑制効果の起因として、産生 eRNA やプロモーター競合の寄与はなく、エンハンサー領域上を RNA pol II が通過することが重要であった。エンハンサー内に存在する転写因子結合領域を RNA pol II が通過することにより、エンハンサー領域への転写因子の集合が妨害されていた。一方で内在ゲノムでは、転写因子結合領域に対するエンハンサー転写開始点の配置によって、抑制効果を利用しているエンハンサーだけでなく回避しているエンハンサーもあることが示唆された。さらに、内在エンハンサーにおける新規転写開始点の形成は発現領域パターンに影響することなく転写活性を低下させることが明らかとなった（図 29）。以上の結果から、エンハンサー領域におけるノンコーディング転写は進化の過程において、発現パターン制御とは独立した遺伝子発現量の制御機構として働いてきた可能性を見出した。

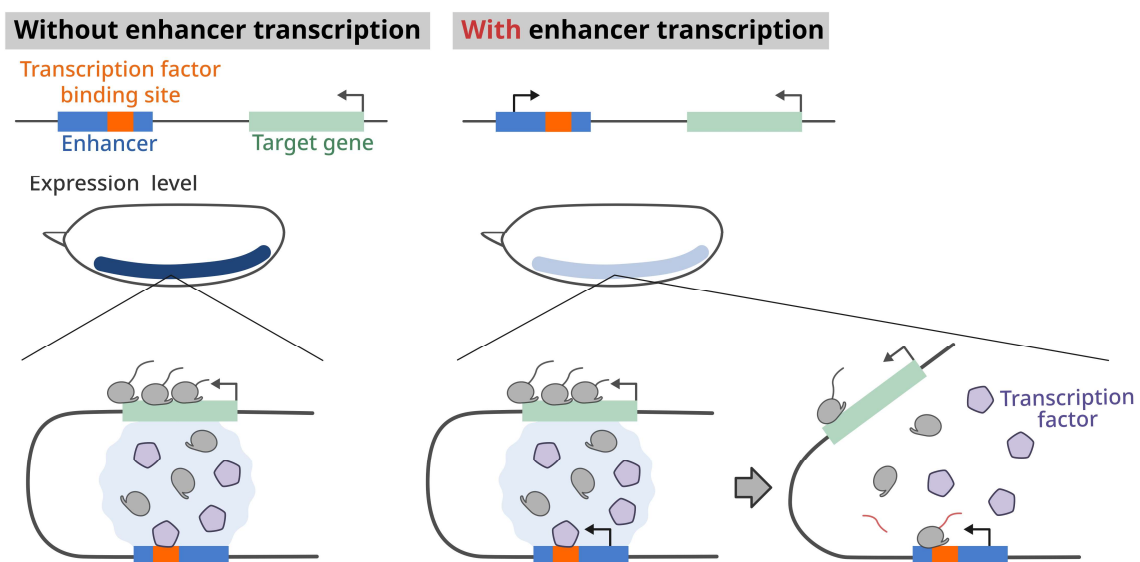


図 29 本研究の成果

エンハンサー領域における転写は転写因子結合領域に侵入することで転写因子の集合を妨害し、転写発現領域のパターンを維持したまま転写活性を抑制する。

#### 4-1 転写因子結合領域を通過する転写を介した活性化抑制機構

本項では、転写因子結合領域を通過する転写がどのようにしてエンハンサーの活性化を妨げているのか議論したい。超解像顕微鏡を用いた観察により、RNA pol II が転写因子結合領域を通過することにより、Dorsal や Zelda といった転写因子の集合が妨害されていることが示された（図 20、図 21）。一方で、転写因子結合領域上の転写がどのような過程を経て転写因子結合の妨害を導いているのかという点は十分に解明できていない。その妨害機構としては、RNA pol II の通過そのものが重要であるか、転写に伴い産生される eRNA もシスに関与するか、という大きく二つに大別できる。

前者についてはまず、長く研究されてきた転写干渉という現象が考えられる<sup>93</sup>。転写干渉とは、ある転写開始点に由来する RNA pol II が下流遺伝子のプロモーター領域まで侵入することで、転写開始前複合体形成ひいては RNA pol II の呼び込みを妨げる現象である。ショウジョウバエでは *adb-A* および *Ubx* 遺伝子領域において、ノンコーディング RNA の転写開始点から生じた転写がそれぞれの遺伝子転写開始点に対して転写干渉を引き起こすことが知られている<sup>94-96</sup>。エンハンサー転写においても同様に、RNA pol II による転写が転写因子結合領域へ侵入することで物理的に転写因子の集合を妨害している可能性は高い。また、異なる観点として、エンハンサー領域上で生じた転写が DNA のトポロジカルな状態変化を介してクロマチンのアクセシビリティを変化させている説も考えられる。転写の進行方向では DNA 二重らせんがさらにねじれることで正の DNA 超らせんが、逆方向では反対に DNA 二重らせんが緩む方向に歪みが生じることによって負の DNA 超らせんが生じることが知られる<sup>97</sup>。同時に、正の DNA 超らせん領域ではクロマチンアクセシビリティが低下し、負の DNA 超らせん領域では向上することが示唆されている<sup>98</sup>。これらの知見は、3-4-2 でエンハンサー領域上を転写が通過する場合には転写因子の集合が減弱した結果や、3-5-2 において転写因子結合領域から離れる方向に転写が生じている *Ubx* BRE エンハンサーではエンハンサー領域における転写が標的遺伝子活性化に対して協調的に働いていた結果と一致するものである。したがって、

非コード領域における転写はその前後のクロマチンアクセシビリティを変化させることで転写制御に寄与している可能性は十分に考えられる。

次に、エンハンサー転写における産生 eRNA がシスに働く可能性も本研究では完全には排除していない。3-3-1 で示したように、産生された eRNA が由来するエンハンサーの標的遺伝子ヘトランスに働いていないことは判明している（図 12）。また、図示していないが図 8 の実験において転写される *sna* shadow エンハンサーの配列を反転させても標的遺伝子の抑制は消失しなかった。つまり、転写されるエンハンサーの配列に非依存的に転写抑制が生じていることが示唆された。以上を踏まえ、エンハンサー配列非依存的に eRNA がシスに転写因子結合妨害に働く可能性として、エンハンサー領域 DNA の鋳型鎖に新規合成中の eRNA が結合してつくられる R ループ構造が寄与している説が考えられる。R ループ構造とは、転写領域において鋳型鎖 DNA および新規合成 RNA からなる DNA:RNA ハイブリッド結合と一本鎖状態の非鋳型鎖からなる構造であり、プロモーターや活性化エンハンサーで高頻度に形成されている<sup>99</sup>。さらに、エンハンサー領域では他の遺伝子間領域と比較して GC 含有量が高く<sup>100</sup>、グアニンリッチな RNA とシトシンリッチな DNA 配列からなる R ループ構造は安定であることも知られる<sup>99</sup>。加えて、グアニンリッチな RNA において G4 構造と呼ばれる特殊な高次構造が形成されることでさらに R ループが安定化される効果も示唆されている<sup>101</sup>。上記のような eRNA を介したエンハンサー領域におけるクロマチン構造変化により、転写因子によるモチーフ認識や結合が妨害されている可能性は十分に見込まれる。

eRNA の関与の有無により区別した仮説をそれぞれ想定したが、これらは相互排他的なものではなく両者ともに協調的に機能しうるものである。転写因子結合領域上における転写を介した活性化抑制機構については今後さらなる検証が必要である。

#### 4-2 内在ゲノムにおける非コード転写開始点の機能的意義

エンハンサー領域における転写開始点は進化の過程において、なぜ形成され、どのような機能を果たしてきたのであろうか。本研究により、内在 *rho* NEE エンハンサー領域

を通過する転写開始点の形成は標的遺伝子の発現領域パターンを維持したまま転写量を低下させることが明らかになった (図 28)。レポーター系を用いた実験系では活性化細胞の割合が大きく減少し発現領域が変化したこと (図 16)、内在エンハンサーではなんらかの作用により、完全な活性の喪失を回避していると考えられた。この差異を生み出す理由として、内在ゲノムにおいては複数エンハンサーによる制御や TAD 形成などを介したクロマチン立体構造による制御が存在することで、転写因子の結合妨害による活性化抑制が緩衝されたと予想される。実際に活性化エンハンサー同士が一か所に集合していることが知られ<sup>41,102</sup>、このことは複数エンハンサーにより制御される内在 *sna* 遺伝子領域において Dorsal や Zelda の集合度がレポーター領域への集合度より高いことと一致する (図 19-図 21)。これら立体構造による発現領域の補償があることにより、エンハンサー転写による影響が転写量のみに残ったものと思われる。つまり、発現領域のパターン形成を TAD やループ形成といったクロマチン構造変化が担い、発現量の調節をエンハンサー転写が担っていると考えられる。

また、本研究における観察から *Ubx* BRE で生じている内在エンハンサー転写は標的遺伝子転写活性化に対して協調的に生起することが明らかとなった (図 23)。転写因子結合領域を通過しない転写開始点においても、その多くが進化的に保存されていることからなんらかの機能を有していると考えられる。その機能のひとつとして既に、エンハンサー転写がその領域におけるクロマチンのアクセシビリティを高めていることが知られる<sup>103</sup>。特に本研究で観察している転写は、NC14 初期胚におけるごく初期の胚性遺伝子活性化であり、パイオニア転写因子 Zelda によるクロマチン弛緩<sup>104</sup>は胚性遺伝子活性化に重要な過程である。そうした領域でエンハンサー転写を介した手段でもクロマチンを弛緩させていることは理にかなっている。さらに、最近の研究から遺伝子と比べ短鎖の eRNA には相分離を介した液滴形成を促進することが示唆された<sup>84</sup>。相分離を介した液滴形成は RNA 依存的であることは知られており<sup>105</sup>、eRNA を足場として形成された液滴が転写ハブとして働くことにより標的遺伝子を活性化している可能性がある。あるいは、ゲノム上で転写を開始する RNA pol II のおよそ 90%は非特異的な領域に結

合しているといわれることから<sup>106</sup>、そうした非特異な転写を引き起こす RNA pol II が転写因子結合領域に侵入しないよう、その逆方向へ向かう転写開始点を保存しているのかもしれない。

ここまでは既に標的遺伝子をもつエンハンサーとして機能している領域における転写開始点の機能について議論してきた。しかし、ゲノム上には非遺伝子かつ非調節領域にも転写開始点は多く存在している。それらに関して進化的な観点から考察すると、エンハンサー転写開始点は潜在的なプロモーターだと捉えることも可能である。活性化エンハンサーはクロマチンのアクセシビリティや H3K27ac などのヒストン修飾パターンなど、多くの点でプロモーターと類似している<sup>107</sup>。また、強い転写開始点を有するエンハンサーがプロモーターとしても働き<sup>79,108</sup>、反対にプロモーターの一部はエンハンサーとしても機能しうる<sup>54,79</sup>。したがって、現存のゲノム上の転写開始点の中には、潜在的なプロモーターあるいはエンハンサー候補として機能をもたないまま中立的に保存されているものも存在していると考えられる。

以上のことから、内在ゲノムに存在する転写開始点はそのゲノム上での位置や方向といった背景に依存して多様な機能を示すことが考えられる。今後は、転写開始点とその周囲を取り囲む環境の関係を明らかにすることで、個々の転写開始点の機能的分類を進めた上で、それぞれの機能様式について解明されることが期待される。

#### 4-3 今後の展望

本研究により、非コード領域において生じた転写が転写因子結合領域に侵入することで、転写因子群の集合を妨げ活性化を阻害することが明らかとなった。さらに、内在ゲノムにおいても転写開始点の形成は同様の効果をもたらすことが判明した。しかし、内在ゲノムに存在している転写開始点においては、標的遺伝子活性化に対する機能的相関は観察できたものの因果関係を十分に明らかにすることはできていない。特に、遺伝子転写と協調的な活性化様態を示した *Ubx* BRE から生じているエンハンサー転写に関しては、標的遺伝子活性化に対する促進的効果の有無を検証するため、既に転写開始領域

の欠失を試みた。しかし、転写開始点付近の配列を欠損してもエンハンサー転写が生じていたことから、転写開始領域と転写開始点を形成する責任領域は異なることが示唆された。エンハンサー転写開始点を形成している責任領域はその上流 300 bp 程度に位置する配列であった例も知られることから<sup>109</sup>、*Ubx* BRE においてもエンハンサー転写に必要な領域および標的遺伝子の転写活性化に必要な領域を区別してそれぞれ同定する必要がある。また、*Ubx* BRE では標的遺伝子の活性化を示した細胞で必ずしもエンハンサー転写が生じたわけではない。この細胞間の差異を生み出す理由として競合的に結合している転写因子の占有率の違いが示唆されている<sup>110</sup>。したがって、転写開始点の形成に関わる配列を網羅的に同定およびモチーフ解析することにより、エンハンサー転写誘導に寄与している転写因子の特定までもできる可能性がある。

本研究では主に、アクチベーターとして働く転写因子結合領域に対する RNA pol II の侵入がエンハンサー活性化に対して抑制効果をもつことを明らかにした。一方で、エンハンサーの多くにはその活性化を抑えるリプレッサーが結合することも知られる。本研究により明らかとなったエンハンサー転写を介した転写因子結合に対する妨害は、リプレッサー結合領域に対する RNA pol II の侵入においても観察され、その場合にはエンハンサー転写が転写活性化に対して促進的に働くと考えられる。ショウジョウバエでは、*Ubx* 遺伝子を含む BX-C 遺伝子複合体領域に Fab-7 PRE (Polycomb group response elements) と呼ばれるポリコム複合体による転写抑制が生じているゲノム領域が存在している。この領域における転写活性化への切り替えにはノンコーディング転写の PRE 通過が必要である可能性が示唆されており<sup>111</sup>、これは本研究における結果と整合するものである。今後は、本研究において行った Zelda 結合領域通過性の転写開始点の同定 (図 27) と同様に、リプレッサー結合領域を通過する転写開始点の同定を行い、転写の通過による抑制因子の結合妨害がゲノム上で普遍的に起きているのか検証を進めたい。

最後に、遺伝子イントロン領域に存在するエンハンサーにおいて、本研究から明らかとなった転写因子結合妨害の作用が生じている可能性について議論したい。エンハンサー転写だけでなく、エンハンサーがイントロン領域に存在する場合には、遺伝子転写の

過程においてもエンハンサー領域上を転写が通過する。エンハンサーのうち3分の1程度が遺伝子領域内に存在することからも<sup>6</sup>、遺伝子の転写を介したエンハンサー領域上のRNA pol II 通過は高頻度に発生していることが想像される。イントロン領域に存在するエンハンサーはRNA pol II の通過に対して抵抗性を有している可能性や、標的遺伝子が転写活性化するごとに転写の通過が起きることによってネガティブフィードバックが形成されている可能性も考えられる。イントロン内外に存在するエンハンサーに関して、それらがイントロン領域内あるいは遺伝子領域外に存在することで標的遺伝子の活性化が受ける影響を検証したい。これにより、エンハンサー転写開始点だけでなくエンハンサー自体の配置においても転写調節機能に重要な要素を見出すことができると思われる。

本研究では、非遺伝子領域に存在する転写開始点について、その機能的意義に注目した。その結果、エンハンサー領域において生じる転写が転写因子結合領域へ侵入することで、転写因子のクロマチン結合に対する制御ひいては遺伝子発現制御を実現できることを明らかにした。これまで転写という現象は、遺伝子制御におけるアウトプットとしてみなされてきた。しかし、転写に伴うクロマチン構造の変化は転写制御を担う因子のひとつとして働きうるものであった。したがって、本研究は転写という現象が担う遺伝子発現制御機構の一端を解き明かしたといえる。今後の研究の進展により、転写そのものが遺伝子発現を制御する詳細なメカニズムやそれらが働く生理的現象の解明が期待される。

補足

## 補足-1 本研究により同定されたエンハンサー転写活性をもつエンハンサー

2-18 に記載の方法により同定された転写性エンハンサーの一覧（図 22A）。FlyEnhancer ID は参照データベースにおける各エンハンサーの標識番号（<https://enhancers.starklab.org>）。TSS score は各エンハンサーにマッピングされた CAGE-seq リード数をエンハンサー長で正規化したスコアであり、エンハンサー転写活性の評価に用いた。Cumulative fraction of TSS score は TSS スコアの累積分布であり、TSS スコア全体の 60%を占有するエンハンサーを転写性エンハンサーとして次ページに示した。

(前ページより続き)

Location of enhancer	Fly Enhancer ID	Target gene	TSS score (reads/kb)	Enhancer size (kb)	Cumulative fraction of TSS score
chr3L:9,797,330-9,797,598	VT28267	<i>llp4</i>	6007.5	0.268	100.0
chr3R:20,574,703-20,575,504	VT46946	<i>tld</i>	5048.7	0.801	91.6
chr3R:20,997,630-20,999,927	VT47167	<i>danr</i>	3410.5	2.297	84.5
chr3R:12,524,782-12,526,937	VT42746	<i>Ubx</i>	3116.0	2.155	79.7
chr3R:12,747,382-12,749,489	VT42849	<i>Abd-B</i>	2499.3	2.107	75.3
chr3R:17,201,451-17,203,140	VT45189	<i>mod(mdg4)</i>	2016.0	1.689	71.8
chr2L:10,388,040-10,390,080	VT5287	<i>da</i>	1903.4	2.04	68.9
chr3L:14,749,272-14,751,412	VT30868	<i>Trl</i>	1390.2	2.14	66.3
chr3R:21,008,302-21,010,513	VT47173	<i>danr</i>	1165.1	2.211	64.3
chr3R:12,526,519-12,528,610	VT42747	<i>Ubx</i>	1122.0	2.091	62.7
chr3R:12,075,311-12,077,425	VT42491	<i>tara</i>	1034.5	2.114	61.1
chr3L:20,396,551-20,398,733	VT33785	<i>trbl</i>	999.1	2.182	59.6
chr2R:11,016,930-11,019,079	VT17013	<i>chn</i>	910.7	2.149	58.2
chr2L:2,752,765-2,754,884	VT1404	<i>Bacc</i>	870.7	2.119	57.0
chr2L:11,794,041-11,794,478	VT6030	<i>crol</i>	691.1	0.437	55.7
chr2R:19,467,816-19,469,873	VT21426	<i>apt</i>	664.1	2.057	54.8
chr2R:2,583,575-2,585,628	VT12642	<i>Rab2</i>	638.1	2.053	53.8
chr3L:20,398,155-20,400,412	VT33786	<i>trbl</i>	637.1	2.257	52.9
chr3R:12,073,519-12,075,931	VT42490	<i>tara</i>	610.3	2.412	52.0
chr3R:12,745,522-12,747,731	VT42848	<i>Abd-B</i>	608.4	2.209	51.2
chr3R:18,352,267-18,354,359	VT45801	<i>CG5346</i>	600.4	2.092	50.3
chr3L:8,645,778-8,647,917	VT27671	<i>h</i>	596.5	2.139	49.5
chr3L:20,688,420-20,690,975	VT33934	<i>kni</i>	576.1	2.555	48.6
chr2L:2,162,032-2,164,151	VT1082	<i>aop</i>	554.0	2.119	47.8
chr2R:20,400,628-20,402,887	VT21906	<i>Letm1</i>	504.6	2.259	47.1
chr2L:2,163,674-2,165,773	VT1083	<i>aop</i>	455.5	2.099	46.3
chr3R:7,604,792-7,606,922	VT40165	<i>Lk6</i>	452.1	2.13	45.7
chr3R:2,684,413-2,686,617	VT37567	<i>ftz</i>	444.6	2.204	45.1
chr2R:10,060,721-10,062,851	VT16530	<i>cg</i>	416.9	2.13	44.4
chr2L:8,844,948-8,847,235	VT4450	<i>SoxN</i>	405.3	2.287	43.9
chr3R:15,166,068-15,168,266	VT44122	<i>DI</i>	397.2	2.198	43.3
chr2R:1,597,188-1,599,358	VT12230	<i>ap</i>	392.6	2.17	42.7
chr2L:21,843,469-21,845,803	VT11145	<i>tsh</i>	384.7	2.334	42.2
chr3R:15,140,147-15,142,388	VT44107	<i>DI</i>	384.2	2.241	41.6
chr2L:21,841,894-21,844,018	VT11144	<i>tsh</i>	374.8	2.124	41.1
chr3L:9,013,475-9,016,012	VT27864	<i>Doc1</i>	368.9	2.537	40.6
chrX:5,479,796-5,481,897	VT57351	<i>Vsx1</i>	368.4	2.101	40.1

## 引用文献

1. Banerji, J., Rusconi, S. & Schaffner, W. Expression of a  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308 (1981).
2. Banerji, J., Olson, L. & Schaffner, W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**, 729-40 (1983).
3. Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T. & Tonegawa, S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **33**, 717-28 (1983).
4. Mercola, M., Wang, X.F., Olsen, J. & Calame, K. Transcriptional enhancer elements in the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Science* **221**, 663-5 (1983).
5. Consortium, E.P. et al. Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature* **583**, 699-710 (2020).
6. Kvon, E.Z. et al. Genome-scale functional characterization of *Drosophila* developmental enhancers *in vivo*. *Nature* **512**, 91-5 (2014).
7. Kvon, E.Z., Waymack, R., Gad, M. & Wunderlich, Z. Enhancer redundancy in development and disease. *Nature Reviews Genetics* **22**, 324-336 (2021).
8. Whitney, P.H., Shrestha, B., Xiong, J., Zhang, T. & Rushlow, C.A. Shadow enhancers modulate distinct transcriptional parameters that differentially effect downstream patterning events. *Development* **149**, dev200940 (2022).
9. Sur, I. & Taipale, J. The role of enhancers in cancer. *Nat Rev Cancer* **16**, 483-93 (2016).
10. Cano-Gamez, E. & Trynka, G. From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Front Genet* **11**, 424 (2020).
11. Park, J. et al. Dissecting the sharp response of a canonical developmental enhancer reveals multiple sources of cooperativity. *Elife* **8**(2019).
12. Keller, S.H., Jena, S.G., Yamazaki, Y. & Lim, B. Regulation of spatiotemporal limits of developmental gene expression via enhancer grammar. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 15096-15103 (2020).
13. Li, X. & Noll, M. Compatibility between enhancers and promoters determines the transcriptional specificity of gooseberry and gooseberry neuro in the *Drosophila* embryo. *EMBO J* **13**, 400-6 (1994).
14. Merli, C., Bergstrom, D.E., Cygan, J.A. & Blackman, R.K. Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes. *Genes Dev* **10**, 1260-70 (1996).
15. Furlong, E.E.M. & Levine, M. Developmental enhancers and chromosome topology. *Science* **361**, 1341-1345 (2018).

16. Nora, E.P. et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature* **485**, 381-5 (2012).
17. Dixon, J.R. et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376-80 (2012).
18. Sanborn, A.L. et al. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6456-65 (2015).
19. Li, G. et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* **148**, 84-98 (2012).
20. Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P. & Hough, P.V. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5670-4 (1991).
21. Dynan, W.S. & Tjian, R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**, 79-87 (1983).
22. Su, W., Jackson, S., Tjian, R. & Echols, H. DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev* **5**, 820-6 (1991).
23. Krivega, I., Dale, R.K. & Dean, A. Role of LDB1 in the transition from chromatin looping to transcription activation. *Genes Dev* **28**, 1278-90 (2014).
24. Cross, A.J., Jeffries, C.M., Trehwella, J. & Matthews, J.M. LIM domain binding proteins 1 and 2 have different oligomeric states. *J Mol Biol* **399**, 133-44 (2010).
25. Deng, W. et al. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell* **149**, 1233-44 (2012).
26. Miller Jr, O.L. & McKnight, S.L. Post-replicative nonribosomal transcription units in *D. melanogaster* embryos. *Cell* **17**, 551-563 (1979).
27. Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S.M. & Cox, E.C. Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell* **123**, 1025-36 (2005).
28. Chubb, J.R., Treck, T., Shenoy, S.M. & Singer, R.H. Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Curr Biol* **16**, 1018-25 (2006).
29. Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y. & Tyagi, S. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol* **4**, e309 (2006).
30. Fukaya, T., Lim, B. & Levine, M. Enhancer Control of Transcriptional Bursting. *Cell* **166**, 358-368 (2016).
31. Yokoshi, M., Kawasaki, K., Cambon, M. & Fukaya, T. Dynamic modulation of enhancer responsiveness by core promoter elements in living *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Res* **50**, 92-107 (2022).
32. Bulger, M. & Groudine, M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* **144**, 327-39 (2011).

33. Heist, T., Fukaya, T. & Levine, M. Large distances separate coregulated genes in living *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 15062-15067 (2019).
34. Chen, H. et al. Dynamic interplay between enhancer-promoter topology and gene activity. *Nat Genet* **50**, 1296-1303 (2018).
35. Benabdallah, N.S. et al. Decreased Enhancer-Promoter Proximity Accompanying Enhancer Activation. *Mol Cell* **76**, 473-484 e7 (2019).
36. Alexander, J.M. et al. Live-cell imaging reveals enhancer-dependent Sox2 transcription in the absence of enhancer proximity. *Elife* **8**, e41769 (2019).
37. Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R.A., Chakraborty, A.K. & Sharp, P.A. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**, 13-23 (2017).
38. Kwon, I. et al. Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains. *Cell* **155**, 1049-1060 (2013).
39. Boehning, M. et al. RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 833-840 (2018).
40. Cho, W.K. et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* **361**, 412-415 (2018).
41. Espinola, S.M. et al. *Cis*-regulatory chromatin loops arise before TADs and gene activation, and are independent of cell fate during early *Drosophila* development. *Nat Genet* **53**, 477-486 (2021).
42. Rushlow, C.A., Han, K., Manley, J.L. & Levine, M. The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* **59**, 1165-77 (1989).
43. Liang, H.L. et al. The zinc-finger protein Zelda is a key activator of the early zygotic genome in *Drosophila*. *Nature* **456**, 400-3 (2008).
44. Mir, M. et al. Dynamic multifactor hubs interact transiently with sites of active transcription in *Drosophila* embryos. *Elife* **7**(2018).
45. Yamada, S. et al. The *Drosophila* Pioneer Factor Zelda Modulates the Nuclear Microenvironment of a Dorsal Target Enhancer to Potentiate Transcriptional Output. *Curr Biol* **29**, 1387-1393 e5 (2019).
46. De Santa, F. et al. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol* **8**, e1000384 (2010).
47. Kim, T.K. et al. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182-7 (2010).
48. Djebali, S. et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**, 101-8 (2012).
49. Core, L.J. et al. Defining the status of RNA polymerase at promoters. *Cell Rep* **2**, 1025-35 (2012).
50. Bonn, S. et al. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. *Nat Genet* **44**, 148-56 (2012).

51. Chen, R.A. et al. The landscape of RNA polymerase II transcription initiation in *C. elegans* reveals promoter and enhancer architectures. *Genome Res* **23**, 1339-47 (2013).
52. Kaikkonen, M.U. et al. Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Mol Cell* **51**, 310-25 (2013).
53. Hah, N. et al. A rapid, extensive, and transient transcriptional response to estrogen signaling in breast cancer cells. *Cell* **145**, 622-34 (2011).
54. Rennie, S. et al. Transcription start site analysis reveals widespread divergent transcription in *D. melanogaster* and core promoter-encoded enhancer activities. *Nucleic Acids Res* **46**, 5455-5469 (2018).
55. Andersson, R. et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* **507**, 455-461 (2014).
56. Henriques, T. et al. Widespread transcriptional pausing and elongation control at enhancers. *Genes Dev* **32**, 26-41 (2018).
57. Lai, F., Gardini, A., Zhang, A. & Shiekhattar, R. Integrator mediates the biogenesis of enhancer RNAs. *Nature* **525**, 399-403 (2015).
58. Pefanis, E. et al. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* **161**, 774-89 (2015).
59. Imamura, K. et al. Diminished nuclear RNA decay upon Salmonella infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *Embo Journal* **37**, e97723 (2018).
60. Hirabayashi, S. et al. NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed *cis*-regulatory elements. *Nat Genet* **51**, 1369-1379 (2019).
61. Natoli, G. & Andrau, J.C. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu Rev Genet* **46**, 1-19 (2012).
62. Bose, D.A. et al. RNA Binding to CBP Stimulates Histone Acetylation and Transcription. *Cell* **168**, 135-149 e22 (2017).
63. Li, W. et al. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* **498**, 516-20 (2013).
64. Tsai, P.F. et al. A Muscle-Specific Enhancer RNA Mediates Cohesin Recruitment and Regulates Transcription In *trans*. *Mol Cell* **71**, 129-141 e8 (2018).
65. Cinghu, S. et al. Intragenic Enhancers Attenuate Host Gene Expression. *Mol Cell* **68**, 104-117 e6 (2017).
66. Nojima, T. et al. Deregulated Expression of Mammalian lncRNA through Loss of SPT6 Induces R-Loop Formation, Replication Stress, and Cellular Senescence. *Mol Cell* **72**, 970-984 e7 (2018).
67. Tan-Wong, S.M., Dhir, S. & Proudfoot, N.J. R-Loops Promote Antisense Transcription across the Mammalian Genome. *Mol Cell* **76**, 600-616 e6 (2019).

68. Fukaya, T. Dynamic regulation of anterior-posterior patterning genes in living *Drosophila* embryos. *Curr Biol* **31**, 2227-2236 e6 (2021).
69. Yokoshi, M., Segawa, K. & Fukaya, T. Visualizing the Role of Boundary Elements in Enhancer-Promoter Communication. *Mol Cell* **78**, 224-235 e5 (2020).
70. Venken, K.J., He, Y., Hoskins, R.A. & Bellen, H.J. P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science* **314**, 1747-51 (2006).
71. Groth, A.C., Fish, M., Nusse, R. & Calos, M.P. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* **166**, 1775-82 (2004).
72. Ren, X. et al. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 19012-7 (2013).
73. Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics* **9**, 62-66 (1979).
74. Schor, I.E. et al. Promoter shape varies across populations and affects promoter evolution and expression noise. *Nat Genet* **49**, 550-558 (2017).
75. Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S.L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **37**, 907-915 (2019).
76. Ringrose, L. Transgenesis in *Drosophila melanogaster*. in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 561 3-19 (Springer, 2009).
77. Batut, P., Dobin, A., Plessy, C., Carninci, P. & Gingeras, T.R. High-fidelity promoter profiling reveals widespread alternative promoter usage and transposon-driven developmental gene expression. *Genome Res* **23**, 169-80 (2013).
78. Pfeiffer, B.D. et al. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9715-20 (2008).
79. Mikhaylichenko, O. et al. The degree of enhancer or promoter activity is reflected by the levels and directionality of eRNA transcription. *Genes Dev* **32**, 42-57 (2018).
80. Hobson, D.J., Wei, W., Steinmetz, L.M. & Svejstrup, J.Q. RNA polymerase II collision interrupts convergent transcription. *Mol Cell* **48**, 365-74 (2012).
81. Oudelaar, A.M. et al. A revised model for promoter competition based on multi-way chromatin interactions at the  $\alpha$ -globin locus. *Nat. Commun.* **10**, 1-8 (2019).
82. Ohtsuki, S. & Levine, M. GAGA mediates the enhancer blocking activity of the *eve* promoter in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **12**, 3325-30 (1998).
83. Choi, O.R. & Engel, J.D. Developmental regulation of beta-globin gene switching. *Cell* **55**, 17-26 (1988).
84. Henninger, J.E. et al. RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell* **184**, 207-225 e24 (2021).

85. Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E. & Levine, M. The *dorsal* gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **6**, 1728-39 (1992).
86. Filipovski, M., Soffers, J.H.M., Vos, S.M. & Farnung, L. Structural basis of nucleosome retention during transcription elongation. *Science* **376**, 1313-1316 (2022).
87. Kujirai, T. et al. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science* **362**, 595-598 (2018).
88. Farnung, L., Vos, S.M. & Cramer, P. Structure of transcribing RNA polymerase II-nucleosome complex. *Nat. Commun.* **9**, 5432 (2018).
89. Müller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L. & Harrison, S.C. Structure of the NF- $\kappa$ B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* **373**, 311-317 (1995).
90. Laughon, A. DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* **30**, 11357-67 (1991).
91. Harrison, M.M., Li, X.Y., Kaplan, T., Botchan, M.R. & Eisen, M.B. Zelda binding in the early *Drosophila melanogaster* embryo marks regions subsequently activated at the maternal-to-zygotic transition. *PLoS Genet* **7**, e1002266 (2011).
92. Rogers, W.A., Goyal, Y., Yamaya, K., Shvartsman, S.Y. & Levine, M.S. Uncoupling neurogenic gene networks in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **31**, 634-638 (2017).
93. Palmer, A.C., Egan, J.B. & Shearwin, K.E. Transcriptional interference by RNA polymerase pausing and dislodgement of transcription factors. *Transcription* **2**, 9-14 (2011).
94. Gummalla, M. et al. *abd-A* regulation by the *iab-8* noncoding RNA. *PLoS Genet* **8**, e1002720 (2012).
95. Castro Alvarez, J.J. et al. Repression of the Hox gene *abd-A* by ELAV-mediated Transcriptional Interference. *PLoS Genet* **17**, e1009843 (2021).
96. Petruk, S. et al. Transcription of *bxd* noncoding RNAs promoted by trithorax represses *Ubx* in cis by transcriptional interference. *Cell* **127**, 1209-21 (2006).
97. Pommier, Y., Nussenzweig, A., Takeda, S., & Austin, C. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 407-427 (2022).
98. Johnstone, C. P. & Galloway, K. E. Supercoiling-mediated feedback rapidly couples and tunes transcription. *Cell Rep.* **41**, 111492 (2022).
99. Kuznetsov, V.A., Bondarenko, V., Wongsurawat, T., Yenamandra, S.P. & Jenjaroenpun, P. Toward predictive R-loop computational biology: genome-scale prediction of R-loops reveals their association with complex promoter structures, G-quadruplexes and transcriptionally active enhancers. *Nucleic acids research* **46**, 7566-7585 (2018).
100. Li, L., Zhu, Q., He, X., Sinha, S. & Halfon, M.S. Large-scale analysis of transcriptional *cis*-regulatory modules reveals both common features and distinct subclasses. *Genome Biol* **8**, R101 (2007).

101. Ratmeyer, L., Vinayak, R., Zhong, Y.Y., Zon, G. & Wilson, W.D. Sequence specific thermodynamic and structural properties for DNA.RNA duplexes. *Biochemistry* **33**, 5298-304 (1994).
102. Allahyar, A. et al. Enhancer hubs and loop collisions identified from single-allele topologies. *Nat Genet* **50**, 1151-1160 (2018).
103. Mousavi, K. et al. eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol Cell* **51**, 606-17 (2013).
104. Schulz, K.N. et al. Zelda is differentially required for chromatin accessibility, transcription factor binding, and gene expression in the early *Drosophila* embryo. *Genome Res* **25**, 1715-26 (2015).
105. Banani, S.F. et al. Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* **166**, 651-663 (2016).
106. Steinmetz, E.J. et al. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Mol Cell* **24**, 735-746 (2006).
107. Andersson, R. & Sandelin, A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nat Rev Genet* **21**, 71-87 (2020).
108. Arnold, C.D. et al. Genome-wide assessment of sequence-intrinsic enhancer responsiveness at single-base-pair resolution. *Nat Biotechnol* **35**, 136-144 (2017).
109. Fedoseeva, D.M., Kretova, O.V., Gorbacheva, M.A. & Tchurikov, N.A. Individual effects of the *copia* and *gypsy* enhancer and insulator on chromatin marks, eRNA synthesis, and binding of insulator proteins in transfected genetic constructs. *Gene* **641**, 151-160 (2018).
110. Hu, S. et al. Transcription factor antagonism regulates heterogeneity in embryonic stem cell states. *Mol Cell* **82**, 4410-4427 e12 (2022).
111. Schmitt, S., Prestel, M. & Paro, R. Intergenic transcription through a polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev* **19**, 697-708 (2005).

## 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、指導教員としての豊富な知識に基づく助言と研究者としての対等な議論を通じて研究の指針を示してくださった深谷雄志准教授に心より深く感謝申し上げます。研究を進める上で、基礎的な実験技術から研究計画まで多くの議論を重ねていただいた川崎洸司博士に厚く感謝いたします。論文作成において、有益な助言を数多くいただき、さらに実験上の助力までいただいた牧野支保博士と梅村悠介氏に深く感謝いたします。研究室における煩雑な事務処理やショウジョウバエの管理・維持においてサポートしていただいた滝下仁美氏にお礼申し上げます。ショウジョウバエの飼料作製でお世話になりました佐藤美佐子氏に感謝いたします。学会等で議論およびご意見いただいた多くの研究者の方々に感謝いたします。

最後に、惜しみない経済援助をいただき、いつも暖かく見守ってくれた両親に感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Dynamic interplay between non-coding enhancer transcription and gene activity in development.

Kota Hamamoto, Yusuke Umemura, Shiho Makino, Takashi Fukaya

*Nature Communications*, **14**, 826 (2023).

DOI: 10.1038/s41467-023-36485-1