

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 濱本 航多

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（図 1）。

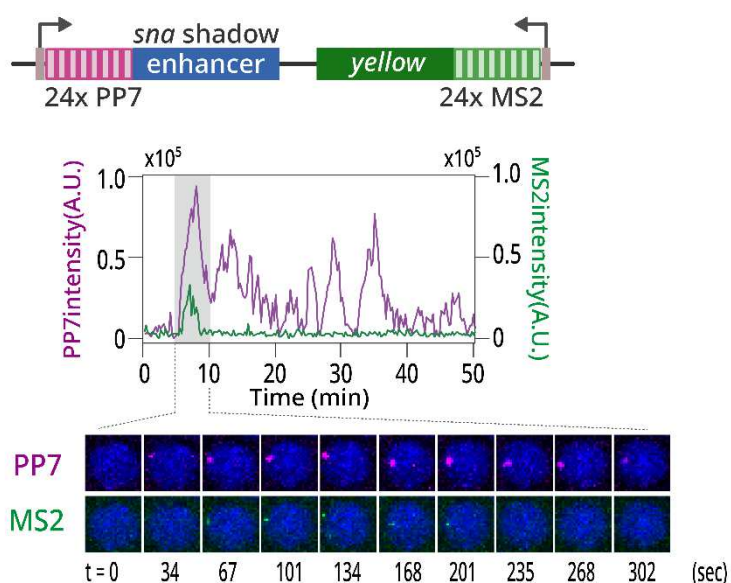


図 1 エンハンサーおよび標的遺伝子転写活性の同時可視化系

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（図 2）。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。

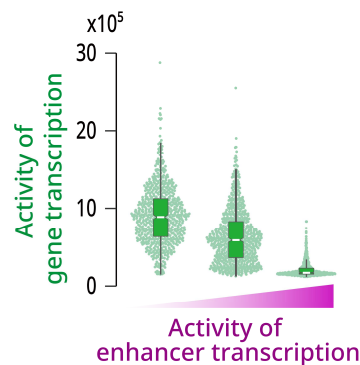


図 2 エンハンサー転写活性に対する標的遺伝子転写活性

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（図3）。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。

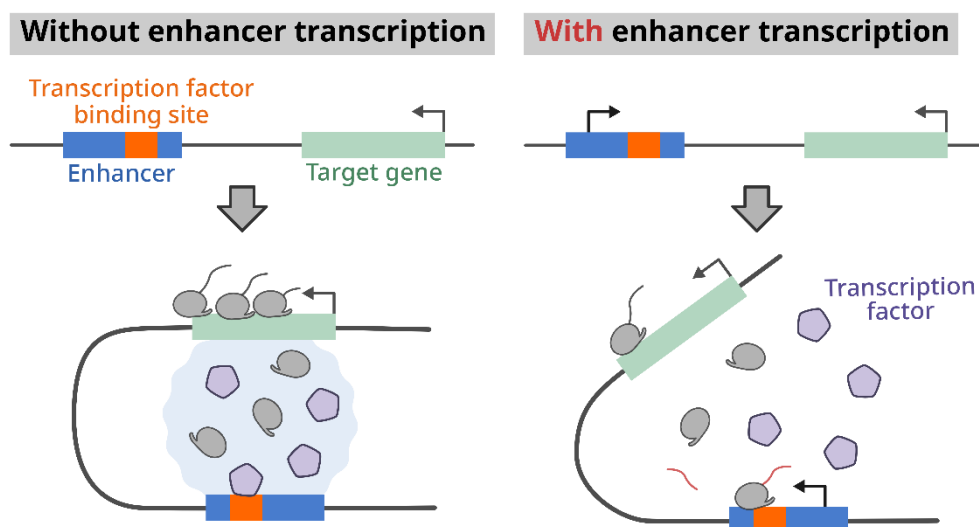


図 3 本研究の成果：転写因子結合領域への転写の侵入は転写因子の集合を妨害する