

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	リン酸化型RNAポリメラーゼII可視化プローブによる転写部位の生細胞観察
Title(English)	
著者(和文)	内野哲志
Author(English)	Satoshi Uchino
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12333号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,田口 英樹,山口 雄輝,徳永 万喜洋,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12333号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工 系  
Department of Graduate major in 生命理工 コース  
学生氏名： 内野 哲志  
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (Science)  
Academic Degree Requested Doctor of  
指導教員(主)： 木村 宏  
Academic Supervisor(main)  
指導教員(副)：  
Academic Supervisor(sub)

要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

真核生物ではほとんどの遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写される。Pol II の最大サブユニットの C 末端領域には 7 アミノ酸の繰り返し配列(YSPTSPS)が存在し、転写開始時には 5 番目のセリン(Ser5)が、伸長時には 2 番目のセリン(Ser2)がそれぞれリン酸化される。生化学的な手法や固定細胞を用いたこれまでの研究から、HeLa 細胞の 1 つの転写部位では平均して 8 個の伸長型(Ser2ph) Pol II が集積して転写を行っていると考えられている。ここに開始型(Ser5ph)Pol II が加わることで、転写開始から伸長の一連の転写反応が、直径約 80 nm の「転写ファクトリー」で行われるという仮説が提唱されている。しかし、蛍光タンパク質を融合した Pol II の生細胞動態解析では転写ファクトリーの観察は困難であり、さらにリン酸化状態を区別して検出することも難しいため、転写活性化における Pol II の時空間的な動態については不明な点が多くある。そこで本研究では、リン酸化型 Pol II 動態を解明し、より詳細な転写機構を理解することを目的として、Ser5ph 及び Ser2ph Pol II に特異的な遺伝子コード型一本鎖抗体蛍光プローブ mintbody (modification-specific intracellular antibody) を開発し、生細胞内で転写開始部位と伸長部位の動態解析を行った。

始めに、Ser2ph-mintbody について、大腸菌組み換えタンパク質を精製し ELISA 法を用いて生化学的に特異性を確認した。生細胞内での特異性の検証として、Ser2ph-mintbody を安定に発現する HeLa 細胞を Ser2 リン酸化阻害剤で処理、輝点の数の変化の測定と FRAP 解析を行った。その結果、輝点の数の減少と蛍光回復時間の短縮が見られた。これは、Ser2ph-mintbody が生細胞内で Pol II Ser2ph を特異的に認識していることを示唆している。また、添加した薬剤が、Ser2 リン酸化レベルの減少を誘導すること、および mintbody の発現に影響を与えないことをウエスタンブロッティングによって確認した。続いて、Ser2ph-mintbody によって観察される輝点の細胞核あたりの総数を計測したところ、およそ 4,000~5,000 程度であった。これは、固定細胞で観察されてきた転写ファクトリーの数(~8,000 個)と近い値である。また、輝点のサイズを測定したところ、どの輝点も直径約 200 nm であった。これは光学限界であり実際には 200 nm 以下の構造である可能性が高く、これまでに報告されている HeLa 細胞の転写ファクトリーのサイズ(~80 nm)と矛盾しない。さらに、細胞分裂中の Ser2ph-mintbody を観察したところ、分裂前期から前中期にかけて輝点が消失し、分裂終期の細胞核が形成される際に再び輝点が出現し始めた。この結果も、これまでの報告と一致する。

Ser5ph-mintbody についても、Ser2ph-mintbody と同様に ELISA による生化学的な検証と阻害剤を用いた生細胞観察によって特異性を確認した。また、Ser2ph-mintbody と同時に発現させ、

多色蛍光観察を行うため、Ser5ph-mintbody に融合する赤色蛍光タンパク質の検討や、さらなる改良を行った。改良型の Ser5ph-mintbody を用いることで、効率よく Ser2ph 及び Ser5ph-mintbody が明るく検出される細胞を取得できるようになった。

各 mintbody によって標識される転写開始部位や伸長部位と転写関連因子との局在の相関性を計測した。Ser5ph-mintbody は、転写開始に関連する TBP や、開始から伸長への移行に重要な CDK9 などと高い相関性を示した。また、エンハンサーに関連する p300 よりも転写開始点付近に存在している BRD4 の方が、Ser5ph-mintbody と相関があった。一方で、Ser2ph-mintbody は CDK12 や SRSF1 といった転写伸長やスプライシングに関連する因子と高い相関性があった。これらの結果は、転写開始部位と伸長部位の局在が異なっていることを示している。

転写開始部位と伸長部の動態を解析するために、各 mintbody の輝点を数秒間追跡した。比較のため DNA 複製ドメインのマーカーとして PCNA、エンハンサーのマーカーとして p300 を用いた。PCNA は S 期初期にはユークロマチンに集積し、S 期後期になるにしたがってヘテロクロマチンに集積する。Ser5ph-mintbody で標識される転写開始部位は、p300 の輝点と同程度の移動度を示し、ユークロマチン複製ドメインよりもわずかに動きにくかった。一方で、Ser2ph-mintbody によって標識される転写伸長部位は、ユークロマチン複製ドメインよりも大きな移動度を示し、転写開始部位と伸長部の移動性の違いが明らかになった。

本研究で開発した Ser5ph および Ser2ph-mintbody は、生細胞内において転写開始部位と転写伸長部位をそれぞれ検出することができる強力なツールである。Ser5ph および Ser2ph-mintbody を用いた本研究によって、転写開始部位は動きにくく、伸長部位は動きやすいことが分かった。転写開始の際には、エンハンサーとプロモーターの相互作用や転写因子等が集積するため、転写開始部位は一般的なユークロマチンよりも動きが制限されていると考えられる。一方で、転写伸長中のクロマチンは脱凝縮することで非常に弛緩した状態となるため、転写伸長部位は大きく動いていると考えられる。これまで、転写の開始反応と伸長反応は核内の同一の区画で行われていたと考えられていたが、本研究によって、これらの反応は核内の異なるコンパートメントで起きていることが示唆された。

(1942 字)

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース : Department of, Graduate major in	生命理工 生命理工	系 コース	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(Science)
学生氏名 : Student's Name	内野 哲志		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	木村 宏	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words )

In eukaryotic nuclei, most genes are transcribed by RNA polymerase II (Pol II). The C-terminal domain of the largest subunit of Pol II contains heptapeptide (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) repeat, whose Ser5 and Ser2 are phosphorylated during the initiation and elongation of transcription, respectively. To detect the initiated and elongating forms of Pol II in living cells, I developed genetically encoded live-cell probes, termed modification-specific intracellular antibody, or mintbody, based on monoclonal antibodies specific to phosphorylated Ser5 and Ser2 (Ser5ph and Ser2ph), respectively.

The specificities of Ser5ph- and Ser2ph-mintbodies were verified in vitro using an enzyme-linked immunosorbent assay with the purified recombinant mintbodies expressed in *E.coli*. In HeLa cells, the mintbodies were concentrated in numerous small foci, but became diffused by transcription inhibitor treatments, which agrees with the idea that Ser5ph- and Ser2ph-mintbody foci represent transcription initiation and elongation sites, respectively. The size and number of Ser2ph-mintbody foci in HeLa cells were consistent with previous estimations in fixed cells. Time-laps analysis has revealed that Ser2ph-mintbody foci almost disappeared during prophase to prometaphase. After complete disappearance during metaphase to anaphase, Ser2ph-mintbody foci reappeared when the nucleus forms during telophase to G1.

Next, the distribution of Ser5ph- and Ser2ph-mintbody foci relative to HaloTag-tagged transcription-related proteins was compared. Ser5ph-mintbody foci were closely associated with proteins related to transcription initiation, such as CDK9 and TBP. By contrast, Ser2ph-mintbody foci were associated with proteins involved transcription elongation and splicing, like CDK12 and SRSF1.

Finally, to understand the dynamics of transcription initiation and elongation sites, I analyzed the mobility of Ser5ph- and Ser2ph-mintbody foci and compared with euchromatin and heterochromatin replication domain and foci enriched in p300 that is concentrated at enhancers. Ser5ph-mintbody and p300-enriched foci were less mobile than euchromatic domain, while Ser2ph-mintbody foci more mobile.

In this study, by visualizing transcription initiation and elongation sites using Ser5ph- and Ser2ph-mintbodies, respectively, I showed their difference in localization and dynamics. The data suggest that the transcription initiation and elongation occur at different compartment in a nucleus. (327 words)

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。  
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).