T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

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)	要約
Type(English)	Outline

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

論文要約

論文タイトル

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

著者

内野哲志

概要

真核生物でほとんどの遺伝子の転写を担う RNA ポリメラーゼ II(Pol II)は、その最大サブユニットの C 末端繰返し配列中の Ser5 が転写開始時に、Ser2 が伸長時にリン酸化される。これらのリン酸化型 Pol II を追跡するために、特異的一本鎖抗体蛍光プローブ(mintbody)を開発した。生細胞において、リン酸化 Ser5-mintbody は転写開始に関連する因子と、リン酸化 Ser2-mintbody は転写伸長に関連する因子とそれぞれ高い共局在性が見られた。また、それぞれの mintbody の集積場所、すなわち転写の開始と伸長の場所の動きを計測したところ、転写伸長場所は転写開始場所や一般的なクロマチンに比べて大きな動きを示すことがわかった。これらの結果から、転写の開始と伸長は核内の異なる区画で行われていると示唆された。

第 1 章 研究背景

1-1. クロマチンと転写
1-2. 転写ファクトリー、転写部位
1-3. Live-imaging of Transcription (Pol II)
1-4. Live-imaging of Transcription (RNA)
1-5. 転写とクロマチン動態
1-6. mintbody
1-7. 本研究

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をもとに、1 つの転写部位では開始型(Ser5ph)と伸長型(Ser2ph)の Pol II が集積しており、転写開始から伸長の一連の転写反応が 1 つの区画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、開始型と伸長型を区別して検出することが困難であるため、転写活性化におけるリン酸化型 Pol II の時空間的な知見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-mintbody 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行った。

第 2 章　実験方法

2-1. ELISA による mintbody の特異性の検証
2-2. DNA 作製と精製
2-3. 生細胞培養と観察
2-4. ウエスタンブロッティング

ELISA の手順や DNA コンストラクトの作製方法、生細胞観察や画像データの解析方法など、本研究で用いた実験方法について記述した。

第 3 章　Ser2ph-mintbody の評価

大腸菌組み換えタンパク質を精製し、ELISA によって生化学的な特異性の検証を行った。また、生細胞内での特異性を検証するために、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し、mintbody の輝点への影響を観察した。これらの結果から、Ser2ph-mintbody は生細胞内の転写伸長部位を特異的に認識していることが示された。続いて Ser2ph-mintbody の輝点の大きさや数を計測した。これまで報告されていた HeLa 細胞の転写伸長部位の大きさや数と比較したところ、矛盾はなかった。また、細胞分裂期には Ser2ph-mintbody の輝点が消失することが確認できた。これは、分裂期には転写が抑制されるという以前の報告と一致する。

第 4 章　Ser5ph-mintbody の評価

Ser2ph-mintbody と同様に、ELISA と阻害剤を用いた生細胞観察によって Ser5ph-mintbody の特異性を確認した。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。

第 5 章　転写関連因子と Ser5ph および Ser2ph-mintbody の局在

Ser5ph および Ser2ph-mintbody によって標識される転写開始部位や伸長部位と転写に関連する因子との局在の相関性を計測した。Ser5ph-mintbody は、転写開始や伸長への移行に関連する TBP や CDK9 といった因子と、Ser2ph-mintbody は転写伸長に関連する CDK12 などの因子とそれぞれ正の相関を示した。エンハンサーや転写開始点に関連する p300 や BRD4 は、Ser2ph-mintbody よりも Ser5ph-mintbody とより

高い相関があった。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。

第 6 章　転写開始部位と転写伸長部位の動態

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、クロマチン複製ドメインやエンハンサー領域の動きと比較した。Ser5ph-mintbody で標識される転写開始部位は、エンハンサー領域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位の移動性の違いが明らかになった。

第 7 章 考察

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できる強力なツールである。これらの mintbody は、これまでより詳細な転写活性化の検出や、個体発生や病態変化における遺伝子発現制御機構の解明に貢献できると考える。

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ると考えられていたが、Ser5ph および Ser2ph-mintbody を用いた本研究によって、これらの反応は核内の異なるコンパートメントで起こっていることが示唆された。

参考文献

付録

APRIN e-Learning「JST コース(1)生命医科学系」
博士課程における研究発表

謝辞