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,德永 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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（博士課程）

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第　　号		学位申請者氏名	内野 哲志	
論文審査 審 査 員		氏　名	職　名	氏　名	職　名
	主査	木村 宏	教授	北口 哲也	准教授
	審査員	田口 英樹	教授		
		山口 雄輝	教授		
		徳永 万喜洋	教授		

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は「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」と題し，以下の７章より構成されている。

第１章「研究背景」では，背景となるクロマチンを鋳型とした転写の分子機構，細胞内での転写部位に関する知見，および，これまでの生細胞における転写活性の可視化法について説明している。転写を担う RNA ポリメラーゼ II（PolII）最大サブユニットの C 末端ドメインには繰返し配列（Ser-Tyr-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser）が存在するが，転写の開始時にはその５番目のセリン残基（Ser5）が，転写伸長時にはその 2 番目のセリン残基（Ser2）がリン酸化される。これらのリン酸化を生細胞で観察することによって転写開始部位や伸長部位の分布や動態を明らかにできるため，これらのリン酸化に特異的な遺伝子コード型細胞内可変領域抗体プローブ（mintbody）の開発が行われたことについて説明している。そして，リン酸化型 PolII の生細胞動態を解明することで，より詳細な転写機構を理解することが目的であると述べられている。

第２章「実験方法」では，本研究で用いられた実験の材料と方法の詳細を述べている。

第３章「Ser2ph-mintbody の評価」では，PolII の Ser2 リン酸化（Ser2ph）を認識する細胞内抗体（Ser2ph-mintbody）の特異性を検証した結果について述べている。精製した Ser2ph-mintbody タンパク質と様々なリン酸化ペプチドとの反応性を比較し，Ser2ph-mintbody は Ser2 リン酸化を持つペプチドに特異的に結合することを示している。また，ヒト HeLa 細胞内での Ser2ph-mintbody の分布を解析し，その集積する輝点の数や大きさがこれまでに化学固定された細胞で得られている転写伸長部位の性状と矛盾しないことを示している。さらに，PolII Ser2 のリン酸化を担う酵素である Cdk9 の阻害剤 flavopiridol や PolII の分解を誘導する triptolide の添加により，Ser2ph-mintbody の輝点の数が減少することを示している。これらのことから，Ser2ph-mintbody により生細胞内で Ser2ph がリン酸化された伸長型 PolII を特異的に標識できると結論付けている。

第４章「Ser5ph-mintbody の評価」では，PolII の Ser5 リン酸化（Ser5ph）を認識する細胞内抗体（Ser5ph-mintbody）の特異性を検証した結果について述べている。精製した Ser5ph-mintbody タンパク質と様々なリン酸化ペプチドとの反応性を比較し，Ser5ph-mintbody は Ser5 リン酸化を持つペプチドに特異的に結合するが，Ser2 と Ser5 の両者がリン酸化されている場合には結合せず，伸長型よりも開始型の PolII を特異的に認識すると考察している。また，HeLa 細胞内での Ser5ph-mintbody の輝点は Ser5 のリン酸化酵素である Cdk7 の阻害剤 THZ1 により消失するが，flavopiridol ではほとんど消失しないことも示し，Ser5ph-mintbody により Ser5 がリン酸化された開始型 PolII を特異的に標識できると結論付けている。

第５章「転写関連因子と Ser5ph および Ser2ph-mintbody の局在」では，さまざまな転写関連因子とそれぞれの mintbody との生細胞内での共局在性について，cross-correlation function による定量解析を行った結果を示している。ヒストンアセチル化酵素 p300 やアセチル化ヒストン結合タンパク質 BRD4 などの転写活性化に働く因子は Ser5ph-mintbody と，転写伸長や RNA プロセシングと関連するタンパク質は Ser2ph-mintbody との共局在性が高いことを示し，Ser5ph-mintbody と Ser2ph-mintbody はそれぞれ転写開始型，転写伸長型の PolII を標識するという結論を補強している。

第６章「転写開始部位と転写伸長部位の動態」では，生細胞における転写開始部位と転写伸長部位の動態解析を行っている。それぞれの mintbody が集積する輝点の重心の位置を時間軸に沿って追跡して平均二乗変位を計測し，拡散係数と指数係数を導出している。比較のために，DNA 複製部位を指標としたユークロマチンとヘテロクロマチン，さらに p300 が濃縮されるエンハンサー部位についても同様の解析を行っている。ユークロマチンと比較して Ser5ph-mintbody 輝点の拡散係数は小さく Ser2ph-mintbody は大きかったことを示している。

第７章「考察」では，前章までの結果をもとに，生細胞内の転写機構について考察している。Ser5ph-mintbody と Ser2ph-mintbody の局在性や運動性の違いから，当初考えられていた転写の開始から伸長までが同一部位で行われる「転写ファクトリー」のモデルとは異なり，転写開始と転写伸長は細胞核内の別々の部位で行われていることが述べられている。転写開始時には巨大な複合体が形成されるため運動性が低いのに対して，転写伸長時にはクロマチンが脱凝縮するため運動性が高くなるとの考えが示されている。

以上を要するに，本論文はリン酸化型 PolII を生細胞観察することにより転写開始と伸長が別々の場所で起こるという新しい転写機構の概念を提唱したものであり，理学上貢献するところが大きい。よって，本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。