

奨励金No.1508

ゲノム DNA 上の疾病原因領域を迅速に特定する新規技術の開発

鈴木 匠

茨城大学 准教授

Developing the novel technology that identifies rapidly disease-causing regions on the genome

Takumi Suzuki,

Ibaraki University, Associate professor



多くの疾病では、遺伝子間領域などに存在するエンハンサー領域に生じた突然変異が原因となっている。このため、疾病原因領域の特定には、エンハンサー配列の変異を調べることが必要だが、現在、社会に実装可能なエンハンサー解析技術は存在しない。本研究では、すべてのエンハンサーに関与するメディエーター複合体（MED）と呼ばれるタンパク質の挙動を追跡することによって、エンハンサー領域を特定する新規技術を開発した。

It is now widely known that mutations in the enhancer region cause many diseases. Therefore, it is necessary to investigate mutations in enhancers to identify disease-causing regions. However, currently there is no enhancer analysis technology that can be applied clinically. In this study, I have developed a novel technique to identify enhancer regions by tracking the behavior of proteins called mediator complex (MED), which interact with transcription factors bound to enhancers.

1. 研究内容

1.1 研究の背景

遺伝子の突然変異は、先天的な疾病だけでなく神経変性症やがんなどの後天的な疾病にも関与することが知られている。従来、これらの疾病では、それぞれの遺伝子においてタンパク質に翻訳される領域に変異が起こり、異常なタンパク質が合成されることが原因であると考えられてきた。しかし、近年の解析技術の急速な進歩によって、遺伝子本体の異常だけでなく、遺伝子間領域などに存在し遺伝子の発現を調節する領域（エンハンサーと呼ばれる）に生じた突然変異が非常に多くの疾病の原因となっていることが明らかになった [図1]。このことから、それぞれの疾病の原因を特定するには、遺伝子本体だけでなくエンハンサー領域の配列についても変異の有無を確認しなければならない。また、後天的な疾病の場合、特定の細

胞でのみ突然変異が発生し、その他の大部分の細胞では正常である場合が多く、変異を正確に検出するためには細胞タイプ特異的に解析する必要がある。しかし、現状では、社会に実装可能なエンハンサー解析技術は存在しない。

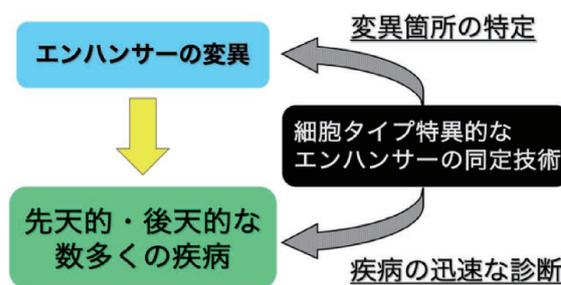


図1. 研究の概念図

申請者は、従来の方法とは異なる基本原理に立脚したエンハンサー解析法を開発するため、エンハンサーと相互作用するタンパク質の一群である

転写因子に注目した。転写因子は、エンハンサーに結合した後、RNAポリメラーゼなどの転写装置を引き寄せる、あるいは排除することによって、遺伝子発現を調節する。転写因子が結合する領域を同定は、エンハンサーの同定と同義であるため、エンハンサー解析法の基本原理として利用できる。

1.2 研究の方針

それぞれの転写因子はRNAポリメラーゼを含む転写装置をプロモーター領域にリクルートし転写を活性化・抑制する、という普遍的な性質を持つ [図2]。エンハンサーに結合している転写因子は、メディエーターというタンパク質複合体に結合し、このメディエーター複合体がそれぞれの遺伝子のプロモーター配列に転写装置を引き寄せる、あるいは結合を阻害する。

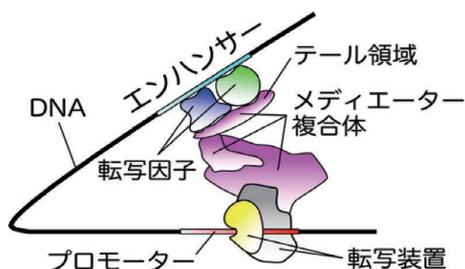


図2. メディエーター複合体

メディエーター複合体は、3つの領域に分けられ、このうちテール領域と呼ばれる箇所転写因子と結合している。テール領域は、MED2、MED3、MED15と呼ばれるサブユニットから構成されている。これらの構成因子は非常に多くの転写因子と結合するため、ゲノムDNA上でMED2、MED3、MED15が高頻度に接近した領域には転写因子が結合している、つまりエンハンサー領域である可能性が非常に高い。

以上のことから、本研究では、メディエーター複合体のテール領域構成因子に着目し、ゲノムDNA上におけるMED2、MED3、MED15の存在箇所を特定することによって、転写因子の結合箇所

を網羅的に特定し、エンハンサーを同定する方法の開発を目指した。

申請者はこれまで、遺伝子発現を制御するタンパク質である転写因子の機能を解析する新規手法DamIDの開発に携わってきた [Tang et al., 2022]。DamIDでは、任意のタンパク質のDNA結合パターンをアデニンのメチル化頻度という情報に置き換えて定量的に解析できる。目的のDNA結合タンパク質にDNAアデニンメチル基転移酵素 (Dam) を融合させる。Damは5'-GATC-3'配列を認識し、アデニンをメチル化するため、Dam融合タンパクが結合した領域の近傍の5'-GATC-3'配列はメチル化を受ける。つまり、高度にメチル化された領域は、目的のDNA結合タンパク質が高頻度に結合した領域であることを意味する。このため、Dam融合タンパク質を発現誘導した後、ゲノムワイドなDNAメチル化パターンを解析すれば、目的のタンパク質が結合した領域を特定できる。

これを応用し、任意の細胞において、MED2、MED3、MED15とDamの融合タンパク質を発現させ、メチル化された領域を特定することによってエンハンサー領域を同定する技術 (MED-Dam) の開発を最終的な目標とした [図3]。

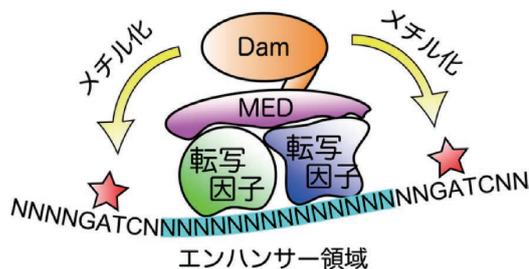


図3. MED-Damの原理

1.3 研究成果

まず、テール領域構成因子であるMED2、MED3、MED15とDamの融合タンパク質 [図3] を発現する遺伝子組換え系統の作出を行った。

本研究では、細胞タイプ特異的な解析を行うた

めに、Gal4/UASシステム [図4] を用いた。このシステムでは、転写因子 Gal4 が UAS 配列を認識し、その下流の遺伝子を強力に発現誘導する [Brand and Perrimon, 1993]。UAS 配列の下流にそれぞれの MED と Dam をコードする配列が挿入された系統を作出すれば、Gal4 によって MED 融合 Dam タンパク質の発現を制御できる。



図4. Gal4/UAS システム

MED2、MED3 については Dam 融合タンパク質を発現する遺伝子組換え系統の作出に成功した。MED15 に関しては、PCR 法による増幅が困難であったため、発現コンストラクトの構築には至らなかった。MED15 については、今後、人工遺伝子合成等の手法によって、配列を取得し、pUAS-LT3-Dam ベクターに挿入する予定である。

当初の計画では、MED-Dam の発現誘導実験に *eve-Gal4* と *bsh-Gal4* を使用する予定であったが、いずれを用いて MED-Dam の発現を誘導した場合においても胚性致死となった。このため、新たに MED2-Dam、MED3-Dam の誘導に適した Gal4 系統を探索した。その結果、MED-Dam を誘導可能な 26 系統を特定した。このうち、R35H02 系統は、脳神経系の一部の神経幹細胞で特異的に発現しており、比較的少数の細胞での解析が必要な本研究に非常に適していた。そこで、以降の解析では R35H02 系統を用いた。

MED-Dam 解析に先立ち、解析対象の遺伝子を絞り込むために R35H02 を発現している神経幹細胞において Dam 融合 RNA ポリメラーゼ II (RNA-pollII-Dam) を発現させてトランスクリプトーム解析を行なった。この結果、有意に発現している約 5000 の遺伝子を同定した。このうち、1つ以上の

エンハンサー領域が同定されている遺伝子に注目したところ、*sloppy-paired1 (slp1)* と *dacapo (dap)* がこのリストに含まれていたため [図5]、この2遺伝子を MED-Dam の解析対象とした。

dacapo の遺伝子座における MED2 の接近パターンを解析したところ、転写開始点の上流約 2 kbp ほどの領域に強いシグナルが検出された [図5]。この領域では、胚発生期における中枢神経系のエンハンサーに含まれていることが知られている [Liu et al., 2002]。この領域が、実際に幼虫期の視覚中枢でエンハンサーとして機能しているかどうかは、今後の解析において検証する必要がある。

sloppy-paired1 の遺伝子座には、転写開始点の上流約 6.2 kbp ほどの領域に強いシグナルが検出された [図5]。この領域には、今回用いた R35H02 系統の作出に用いられた調節領域が含まれており [Janet et al., 2013]、MED-Dam の結果と一致している。以上のことから、今回開発した MED-Dam によって、実際にエンハンサーとして機能している領域を検出することが可能であることがわかった。

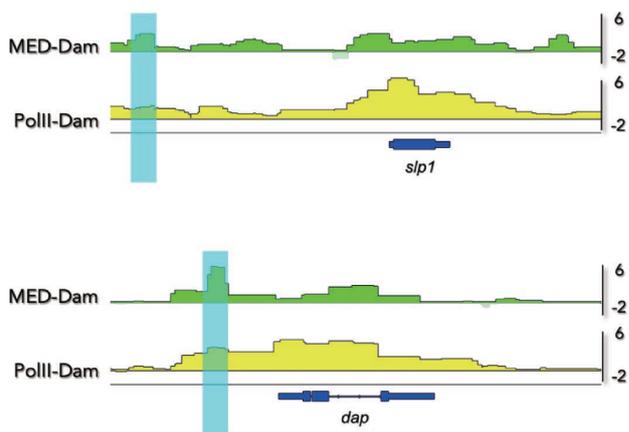


図5. *slp1*, *dap* 遺伝子近傍の MED-Dam 結合パターン

2. 発表（研究成果の発表）

なし