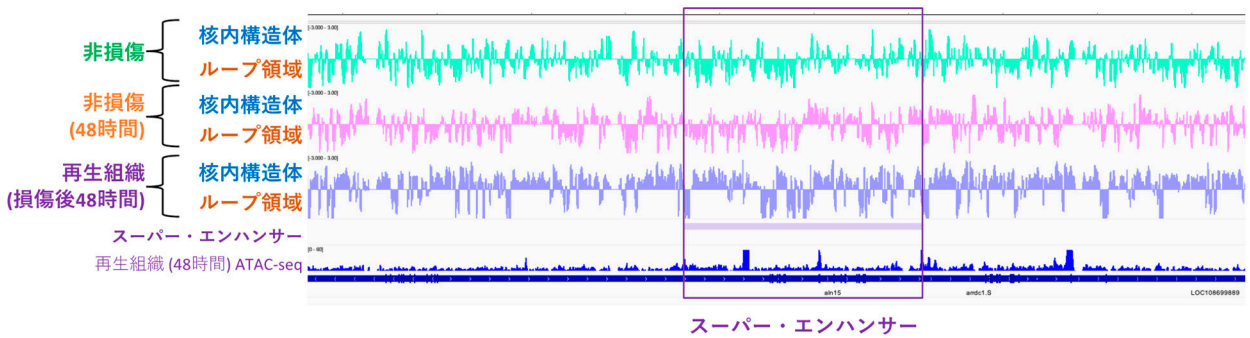
19　再生遺伝子KLFと標的因子のPMLボディ集積の意義	越智　陽城

【目的】これまでに我々は、腎組織の再生メカニズムの解明を目的として網羅的オープンクロマチン解析（ATAC-seq）とエピゲノム解析（ChiP-seq）を行い、クロマチンが閉じた状態から再生を開始させるためには、Kruppel-like factors（KLF）ファミリーの属する KLF15 とその標的遺伝子のアドレナリン受容体が鍵であること、アドレナリン受容体の作動薬を損傷後の腎組織に作用させると再生が促進されることを発見した（Suzuki N., PNAS, 2022）。この研究では標的遺伝子として、Sin3A Associated Protein 25（SAP25）や H1.5 linker histone（h1-5）など、エピゲノム制御に関わる遺伝子が含まれることも示している。なかでも SAP25 は、抑制型クロマチン構造を形成する転写因子 Sin3A と直接結合するだけでなく、ストレスシグナル依存的に KLF 型の転写因子と共に核内構造体のひとつ promyelocytic leukemia protein（PML）核内ボディに局在することが知られている。PML ボディは、抗ウイルス応答、DNA ダメージ応答、アポトーシス、老化などの細胞ストレスを探知し遺伝子の発現を制御する足場として働くことが知られており、近年は液-液相分離で形成されるメンブレンレス核オルガネラの 1 つであることが指摘されている。これら状況を鑑みるに我々が発見した、クロマチンオープニング因子 KLF やその標的遺伝子である SAP25 は、組織損傷によるストレスシグナルにより損傷応答・再生エンハンサーに結合するとともに、PML ボディなど液-液相分離で形成される核内構造体を介して、組織再生へと導く可能性を示唆するものである。しかしながら、組織再生における核内構造体の役割や損傷応答・再生エンハンサーが集積する意義については明らかになっていない。そこで本研究課題では、我々が発見した再生促進遺伝子 KLF15 の標的遺伝子 SAP25・Sin3a 複合体を起点として、損傷シグナルから、再生可否の決定、再生へと導くまでの再生初期段階における PML ボディを含む核内構造体の役割の解明を目的として行った。

【方法】腎組織再生においていずれのゲノム領域が核構造体に集積するのか明らかにするために、High-salt–recovered-sequence（HRS-seq/nuclear body–associated genomic sequences）を行った。腎組織の再生を生体イメージングできる Xla.Tg（Xtr.pax8:EGFP）トランスジェニック系統を用いて、損傷を与える前の近位尿細管領域の組織、再生中の組織、損傷を与えずに 48 時間培養した組織をそれぞれ採取した。また、損傷ストレス・再生特異的なスプライシングバリアントならびにイントロン残留型前駆体 mRNA の同定を目的として、ロングリード RNA- sequence（ISO-seq）を行った。

【結果】HRS-seq の解析により、損傷ストレス・再生特異的に核構造体に集積するゲノム領域を同定した。さらにスーパー・エンハンサー領域との比較を行ったところ、スーパー・エンハンサー領域のなかでも特定の領域が核内構造体に集積する傾向があることがわかった。また、ISO-seq の解析により、損傷ストレス・再生依存的なスプライシングバリアント、イントロン残留型 mRNA 前駆体と予想される転写産物が認められた。

損傷ストレス・再生依存的に核内構造体に集積するゲノム領域の同定



19. 再生遺伝子 KLF と標的因子の PML ボディ集積の意義

越智　陽城

山形大学 医学部 メディカルサイエンス推進研究所 生化学解析センター

Key words：腎再生，核内構造体，再生エンハンサー，3 次元ゲノム構造，ツメガエル

緒　言

これまでに我々は、腎組織の再生メカニズムの解明を目的として、網羅的オープンクロマチン解析やエピゲノム解析を行い、クロマチンが閉じた状態から再生を開始させるためには、Kruppel-like factors（KLF）ファミリーの属する KLF15 とその標的遺伝子のアドレナリン受容体が鍵であること、アドレナリン受容体の作動薬を損傷後の腎組織に作用させると再生が促進されることを発見した［1］。この研究では標的遺伝子はアドレナリン受容体遺伝子だけでなく、Sin3A Associated Protein 25（SAP25）や H1.5 linker histone（h1-5）など、エピゲノム制御に関わる遺伝子が含まれることを明らかにした［1］。なかでも SAP25 は、抑制型クロマチン構造を形成する転写因子 Sin3A と直接結合するだけでなく、ストレスシグナル依存的に KLF 型の転写因子と共に核内構造体のひとつ promyelocytic leukemia protein（PML）核内ボディに局在することが知られている。PML ボディは液-液相分離で形成された核内構造体の一つで、抗ウイルス応答、DNA ダメージ応答、アポトーシス、老化などの細胞ストレスを探知し遺伝子の発現を制御する足場として働く。我々が発見した、クロマチンオープニング因子 KLF とその標的遺伝子である SAP25 は、組織損傷によるストレスシグナルが、PML ボディを介して、組織再生へと導く可能性を示唆するものである。両生類や魚類の組織再生の研究から、組織が損傷を受けると 3～6 時間程度でアポトーシスが誘導されるが、これを阻害すると再生不全となることが知られている。PML ボディが形成できない PML 欠損マウスではアポトーシスが抑制されることが報告されている［2］。これらの知見を鑑みるに、PML ボディの足場がないとアポトーシスが誘導されず再生不全となることが予想され、そのメカニズムとして SAP25・Sin3a・KLF ファミリー転写因子の複合体が PML ボディの足場を利用して、組織損傷のストレスシグナルを感知、我々が発見したクロマチンオープニングの作用に加え、アポトーシスを制御している可能性が高い。しかしながら、組織再生における PML ボディなど液-液相分離で形成される核内構造体の役割やその分子メカニズムは全く明らかにされていない。そこで本研究課題では、我々が発見した再生促進遺伝子 KLF15 の標的遺伝子 SAP25・Sin3a 複合体を起点として、損傷シグナルから、再生可否の決定、再生へと導くまでの再生初期段階における PML ボディの役割の解明を目的として行った。

方　法

1. 腎再生組織で核内構造体に集積するゲノム領域の抽出

腎組織再生においていずれのゲノム領域が核構造体に集積するのか解析を行った。解析に用いた細胞は腎組織の再生を生体イメージングできる Xla.Tg（Xtr.pax8:EGFP）トランスジェニック系統を用いた［3］。ステージ 36/37 の損傷を与える前の近位尿細管領域の組織、近位尿細管領域に損傷を与えた後 18℃で 48 時間培養した再生中の組織、損傷を与えずに 18℃で 48 時間培養した組織、をそれぞれ採取した。採取した細胞は CELLBANKER 1（Takara Bio）中で保存した。High-salt–recovered-sequence（nuclear body–associated genomic sequences）を行うために、保存した細胞は 4,000 rpm で回収した後、核を抽出した。抽出した核を 2 M NaCl で処理すると、～10 μm のハローを形成することが報告されている［4］。また、HRS 画分には、PML ボディ、核小体、カハー

ル体、核ラミナなどの核内構造体が含まれている［4］。抽出した核を PDVF メンブレン（ポアサイズ 0.22 μm、Sterile 2ml centrifugal filter units with 0.22 μm pore and 12 ml collection tubes）のカラムにアプライし、メンブレン上で核を NaCl 処理しハローを形成させた。次に、制限酵素 DpnⅡ（New England Biolab）を用いて、メンブレン上でハローを形成したゲノム DNA の切断を行った。切断後に分離を行い、ハローにより切断を免れた画分を HRS 画分、DpnⅡにより切断された画分をループ画分とした［3］。それら切断 DNA を 4,150 TapeStation System を用いて電気泳動を行った結果、ハロー構造により切断を免れたゲノム領域のサイズは 12 kbp 程度であること、ループ画分に溶出されたゲノムサイズは 1 kbp 程度であることがわかった（図 1）。

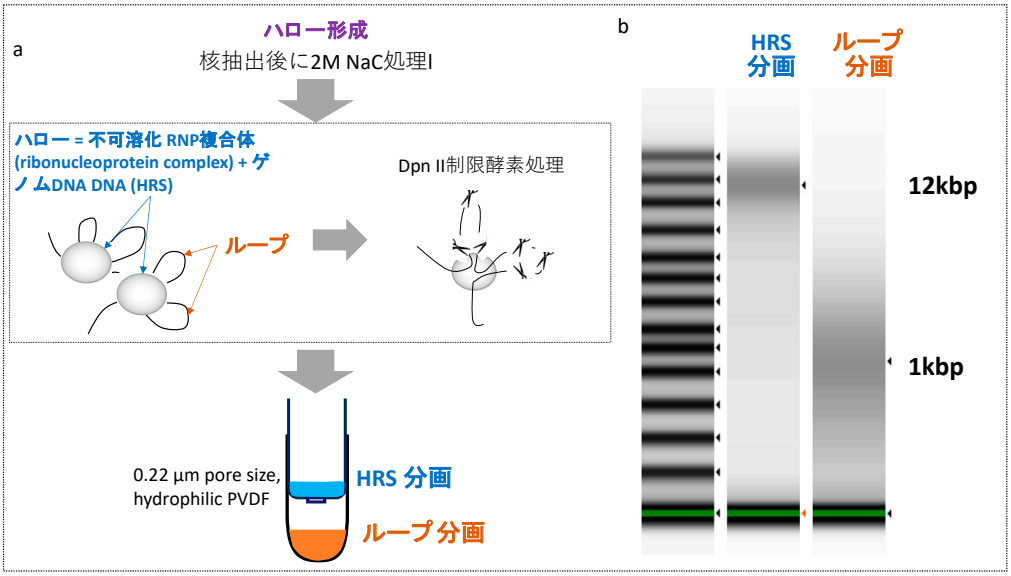


図 1. 核構造体に集積するゲノム領域の抽出

a） HRS 画分の精製。

b） DpnⅡ制限処理後の電気泳動。

次に画分したゲノムがいずれの領域由来であるのか調べるために、全ゲノム解析を行った。まず、サンプル密閉式超音波破砕装置 BIORUPTOR を用いて、各画分のゲノムを 300 bp 前後のサイズに切断し、ThruPLEX DNA-Seq Kit（Takara Bio）を用いてライブラリーを作製した。シーケンスは、NovaSeq6000 を用い、PE150 で各サンプル 18 Gb（計 108 Gb）のシーケンスデータを得た（Novogene）。シーケンスデータは、Xenopus laevis のゲノム配列に（GCF_001663975.1_Xenopus_laevis_v2）に bowtie2（v 2.4.1）を用いてマッピングを行った。その結果、各画分から得られたリード数は以下であった。損傷なし 0 日目 HRS 画分（62,455,908 reads）、損傷あり再生中 48 時間 HRS 画分（83,064,257 reads）、損傷なし 48 時間 HRS 画分（81,412,294 reads）、損傷なし 0 日目ループ画分（94,507,393 reads）、損傷あり再生中 48 時間ループ画分（29,788,625 reads）、損傷なし 48 時間ループ画分（75,006,817 reads）であった。次に HRS 画分とループ画分のエンリッチメントを比較することを目的として、BEDTools（v2.30.0）に実装されている bamCompare を用い解析を行った。解析条件は以下を用いた。bamCompare -b1 HRS_unique.bam -b2 Loop unique.bam --scaleFactorsMethod None --normalizeUsing RPKM -o output。

2. 腎組織再生にけるスーパー・エンハンサー領域の抽出

スーパー・エンハンサーはエンハンサーが密接する領域を指し、単独で存在するエンハンサーと比較して強力に遺伝子発現を誘導するゲノム構造・機能を有することが指摘されている［5］。近年、スーパー・エンハンサーに結合する転写因子やその複合体を形成する因子などが自身のもつ天然変性領域を介して液-液相分離し、核内でクラスターを形成することが報告された［6］。スーパー・エンハンサー領域を予測する方法として、活性化した

エンハンサーの指標であるヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化（H3K27ac）に対するクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）や開いているクロマチン領域も網羅的に同定する Assay for Transposase-Accessible Chromatin シーケンス（ATAC-seq）が知られている。我々は、腎組織再生における H3K27ac ChIP-seq と ATAC-seq のデータを得ている（Accession numbers PRJDB9147 and PRJDB13124）[1]。まず、これらデータを用いて、腎再生中のスーパー・エンハンサー領域を抽出した。スーパー・エンハンサー領域の予測には、Ranking Of Super Enhancer（ROSE）を使用した。

3. 腎再生組織を用いたロングリードシーケンス

Arid1b は AT-rich interaction domain（ARID）ファミリーに属する転写因子で cBAF タイプのクロマチンリモデリング複合体を構成する。ARID はゲノムの中でも A/T を豊富に含む領域に直接結合する転写因子であるが、最近 Arid1b は lncRNA である NEAT1 に結合すること、これにより SWI/SN 複合体を核構造体の一つパラスペックルに局在させる役割も持つことが報告された [7]。さらに、Arid1b の機能抑制はゲノムからの転写に影響を与えるだけでなく、パラスペックルの主たる役割のスプライシング制御にも影響を及ぼすことが明らかとなった [8]。また、ストレス応答とスプライシングに目を向けると、核内ストレス体（nSB）ではストレスを感知すると細胞はイントロン残留型前駆体 mRNA を増大させ、ストレス回復期に迅速に機能的なタンパク質を作れるよう備えることが知られている [8]。これら核内構造体における転写後のストレス応答システムを鑑みるに、再生中の細胞において再生エンハンサーの核内構造体への集積に続き、核内構造体でのスプライシング制御が再生イベントの鍵となる可能性がある。そこで、再生組織における転写産物を網羅的な同定を行った。ステージ 36/37 の近位尿細管領域に損傷を与えた後 18℃で 48 時間培養した再生中の組織、損傷を与えずに 18℃で 48 時間培養した組織をそれぞれ採取した。Preparing Iso-Seq libraries using SMRTbell prep kit 3.0 を用いて逆転写ならびにライブラリー作製を行った。また、それらライブラリーは、SquelⅡ/Ⅲe によりシーケンスを行った。ライブラリー作製ならびにシーケンスについては、先進ゲノム支援のサポートを受けて行った。Transcriptome Annotation by Modular Algorithms（TAMA）により、Xenopus laevis のゲノム配列に（GCF_001663975.1_Xenopus_laevis_v2）に対してマッピング、バリアントコールを行った。

結果および考察

1. 損傷ストレス・再生依存的に核構造体に集積するゲノム領域の同定

arrestin domain containing 1（ARRDC1）遺伝子近傍のスーパー・エンハンサーに着目すると、ステージ 36/37 の損傷を与える前の近位尿細管領域と損傷を与えずに 18℃で 48 時間培養した組織では、HRS（核構造体）画分とループ画分のピークがランダムに認められる。一方、再生中の組織では、スーパー・エンハンサー領域の特定の領域ではループ画分のピークが有意に低下する（図 2b）。また、スーパー・エンハンサーの近傍でも、再生中の組織ではループ画分のピークが有意に低下する（図 2a）。これらの結果は、損傷ストレス・再生依存的に核構造体に集積するゲノム領域が存在すること、現時点ではその領域はスーパー・エンハンサー領域との相関は認められないことを示している。今後、核構造体に対する各種抗体と HCR DNA-FISH により、いずれの核構造体に前述のゲノム領域が損傷ストレス・再生依存的に集積するのか解析を進めるとともに、それらゲノム領域の欠損実験とエンハンサー解析を行う。これにより、それら損傷ストレス・再生依存的に核構造体に集積するゲノム領域の生物学的意義を明らかにする。

2. 再生特異的なスププライシングバリアントの同定

Gene モデルでは、LOC108711763 と LOC108711764 と 2 つの遺伝子として予測されていたが、ロングリードシーケンスの結果は、非損傷組織おいては、LOC108711763 と LOC108711764 が一つの転写産物として検出された。また、興味深いことに、損傷ストレスを与えた再生中の組織では、LOC108711764 と予測されている転

写産物が検出されており、さらにイントロンが残留している（図 3)。先に述べたように、ストレス応答とスプライシングに目を向けると、核内ストレス体（nSB）ではストレスを感知すると細胞はイントロン残留型前駆体 mRNA を増大させ、ストレス回復期に迅速に機能的なタンパク質を作れるよう備えることが知られている［8]。図 3 で示した遺伝子は、LOC108711764 の Gene モデルより短い遺伝子構造を示しているが、単なるイントロン残留型前駆体 mRNA とは異なる意義を持つ可能性がある。今後、スプライシング阻害やイントロン残留型前駆体 mRNA の顕微注入などの個体レベルでの実験により、これらスプライシングレベルでの生物学的意義を明らかにする。

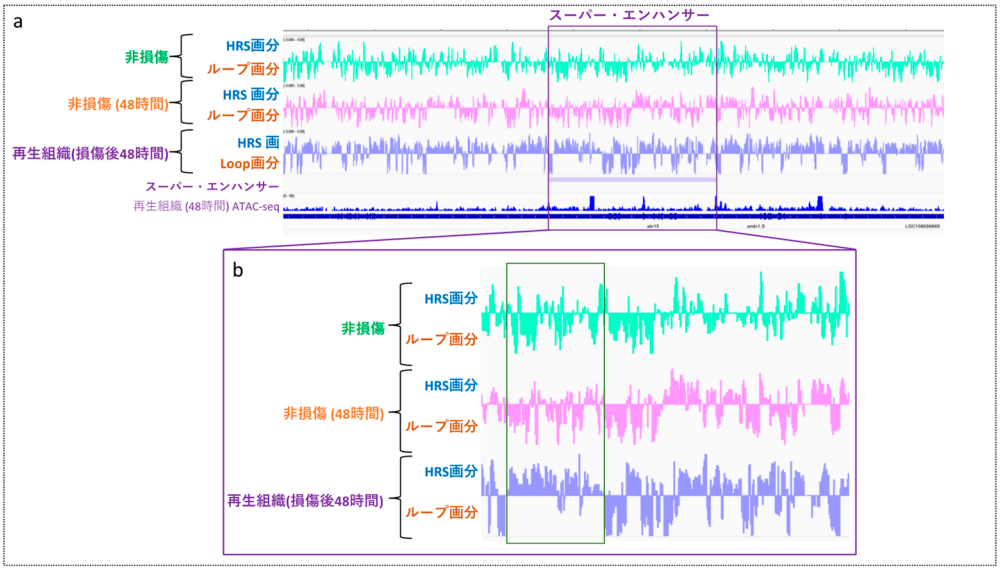


図 2. 損傷ストレス・再生依存的に核構造体に集積するゲノム領域

a） arrestin domain containing 1（ARRDC1）遺伝子近傍のスーパー・エンハンサーと損傷ストレス・再生依存的に核構造体に集積するゲノム領域。

b） a）の拡大図。



図 3. 損傷ストレス・再生依存的なスプライシングバリアントの同定

LOC108711763 遺伝子と LOC108711764 遺伝子領域。

共同研究者・謝辞

本研究を進めるにあたり国立遺伝学研究所分子生命史研究の川口茜博士にご助言をいただいた。また、ロングリードシーケンスについては、先進ゲノム支援（PAGS）（22H04925）国立遺伝学研究所先端ゲノミクス推進センターのクリュコフキリル博士と野口英樹博士のサポートを受けた。

文　献

1） Suzuki N, Kanai A, Suzuki Y, Ogino H, Ochi H. Adrenergic receptor signaling induced by Klf15, a regulator of regeneration enhancer, promotes kidney reconstruction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Aug 16;119(33):e2204338119. Epub 2022 Aug 8. PMID:35939709 DOI: 10.1073/pnas.2204338119

2） Hofmann TG, Will H. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. Cell Death Differ. 2003 Dec;10(12):1290-9. PMID: 12934066 DOI: 10.1038/sj.cdd.4401313

3） Suzuki N, Hirano K , Ogino H, Haruki Ochi H. Arid3a regulates nephric tubule regeneration via evolutionarily conserved regeneration signal-response enhancers. Elife. 2019 Jan 8:8:e43186. PMID: 30616715　PMCID: PMC6324879　DOI: 10.7554/eLife.43186

4） Baudement MO, Cournac A, Court F, Seveno M, Parrinello H, Reynes C, Sabatier R, Bouschet T, Yi Z, Sallis S, Tancelin M, Rebouissou C, Cathala G, Lesne A, Mozziconacci J, Journot L, Forné T. High-salt-recovered sequences are associated with the active chromosomal compartment and with large ribonucleoprotein complexes including nuclear bodies. Genome Res. 2018 Nov;28(11):1733-1746. Epub 2018 Oct 4.　PMID: 30287550 DOI: 10.1101/gr.237073.118

5） Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK, Sharp PA. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. Cell. 2017 Mar 23;169(1):13-23. PMID: 28340338 DOI: 10.1016/j.cell.2017.02.007

6） Boija A, Klein IA, Sabari BR, Dall'Agnese A, Coffey EL, Zamudio AV, Li CH, Shrinivas K, Manteiga JC, Hannett NH ,　Abraham BJ ,　Afeyan LK , Guo YE, Rimel　JK , Fant CB, Schuijers J , Lee TI, Taatjes DJ, Young RA. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. Cell. 2018 Dec 13;175(7):1842-1855.e16. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30449618 DOI: 10.1016/j.cell.2018.10.042

7） Reddy D, Bhattacharya S, Levy M, Zhang Y, Gogol M, Li H, Florens L, Workman JL. Paraspeckles interact with SWI/SNF subunit ARID1B to regulate transcription and splicing. EMBO Rep. 2023 Jan 9;24(1):e55345.　Epub 2022 Nov 10. PMID: 36354291 DOI: 10.15252/embr.202255345

8） Ninomiya K, Adachi S, Natsume T, Iwakiri J, Terai G, KAsai K, Hirose T. LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation. EMBO J. 2020 Feb 3;39(3):e102729. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31782550 DOI: 10.15252/embj.2019102729