

Title	再構成系による生命の転写総体形成原理の理解
Sub Title	Investigation of the design principle of transcriptome formation by bottom-up synthetic biology
Author	藤原, 慶 (Fujiwara, Kei)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2022.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では、精製因子からなるゲノム転写系を利用し、ボトムアップの立場から転写総体を構成するために必要な要素とその効果を理解することを目的とする。生命の自己複製はゲノムDNAが転写翻訳され多種多様な分子が合成されることに由来するが、DNA配列のみならず、DNAのダイナミックな構造変化や異常転写、転写後の調節などが重要な役割を担うことが分かってきた。しかし、転写総体を制御する因子は必須なものや機能重複が多く、従来の遺伝子欠損・過剰発現といった解析では理解が難しい現状があった。これまでトップダウン的な解析から、生命においてはゲノム構造を制御する因子や転写終結因子が転写総体のダイナミックレンジに重要であることが示唆されていた。そこで、この仮説を我々が開発した精製されたバクテリアゲノムと転写因子のみでほぼすべての遺伝子を転写する系(再構成されたゲノム転写系、iGeTX)を利用することで検証することにした。まずはグローバルな転写制御を担うことが知られている核様体タンパク質H-NS、転写終結因子Rho、NusA、NusGに着目して研究を進行した。H-NSについては、精製方法を検討し、濃度依存的に部分DNA配列を利用したレポーター系の転写を抑制可能であることを確認した。Rho、NusA、NusGに関しては、HisSUMOタグをつけたコンストラクトを利用し、ポリエチレンジアミン処理、硫酸沈殿、Niカラム精製、Ulp1処理によるHisSUMOタグの除去、ヘパリンカラム処理(Rho)もしくは陰イオン交換(NusA、NusG)を通して精製に成功した。Rhoについては各種検討の結果、RNaseの混入が問題となることが示された。この問題は市販のRNase inhibitorを利用することで解決できた。得られたタンパク質群を利用し、これらを組み合わせた7条件に関してRNAseq解析を行った。得られた結果は解析中であるが、因子依存的にトランスクリプトームが変化されることが確認された。今後、転写終結点、アンチセンス転写の因子依存性などに注目し、解析を進行していく。</p> <p>The purpose of this study is to elucidate the design principle for the transcriptome formation from a bottom-up approach. The self-replication of living cells is derived from the transcription-translation of the genomic DNA, resulting in the synthesis of diverse molecules. However, it has been discovered that not only DNA sequences but also dynamic structural changes and abnormal transcription and post-transcriptional regulation play important roles. Factors controlling the transcriptome are essential or have a lot of functional redundancy, making it difficult to understand through conventional analyses such as genetic deletion or overexpression. Previously, top-down analyses have suggested that factors controlling genome structure and transcription termination factors are important for the dynamic range of transcriptome formation. In this study, we aimed to verify this hypothesis using a reconstituted genome transcription system (iGeTX), which uses a purified bacterial genome and transcription factors to transcribe genes encoded in genome. We first focused on the nucleoid protein H-NS, transcription termination factors Rho, NusA, and NusG, which are known to be involved in global transcriptional control. Regarding H-NS, we confirmed that it can suppress transcription of a reporter system using a DNA fragment prepared by PCR in a concentration-dependent manner after refinement of the purification method. For Rho, NusA, and NusG, we successfully purified them using constructs with a HisSUMO tag and purification steps such as polyethyleneimine treatment, ammonium sulfate precipitation, Ni column purification, removal of HisSUMO tags by Ulp1 treatment, and purification using heparin columns (Rho) or anion exchange (NusA, NusG). Our investigation showed that RNase contamination is a problem with Rho, but we also found that this issue was resolved using commercially available RNase inhibitors. Using the obtained proteins, we performed RNAseq analysis for seven conditions in their combination. The results are currently being analyzed, but it has been confirmed that the transcriptome changes depending on the factors. We are now focusing on factor-dependent transcription termination points, antisense transcription, and continue the analysis.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2022000010-20220115

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	理工学部	職名	准教授	補助額	300 (A) 千円
	氏名	藤原 慶	氏名 (英語)	KEI FUJIWARA		
研究課題 (日本語)						
再構成系による生命の転写総体形成原理の理解						
研究課題 (英訳)						
Investigation of the design principle of transcriptome formation by bottom-up synthetic biology						
1. 研究成果実績の概要						
<p>本研究では、精製因子からなるゲノム転写系を利用し、ボトムアップの立場から転写総体を構成するために必要な要素とその効果を理解することを目的とする。生命の自己複製はゲノム DNA が転写翻訳され多種多様な分子が合成されることに由来するが、DNA配列のみならず、DNAのダイナミックな構造変化や異常転写、転写後の調節などが重要な役割を担うことが分かってきた。しかし、転写総体を制御する因子は必須なものや機能重複が多く、従来の遺伝子欠損・過剰発現といった解析では理解が難しい現状があった。これまでトップダウン的な解析から、生命においてはゲノム構造を制御する因子や転写終結因子が転写総体のダイナミックレンジに重要であることが示唆されていた。そこで、この仮説を我々が開発した精製されたバクテリアゲノムと転写因子のみでほぼすべての遺伝子を転写する系(再構成されたゲノム転写系、iGeTX)を利用することで検証することにした。まずはグローバルな転写制御を担うことが知られている核様体タンパク質 H-NS、転写終結因子 Rho、NusA、NusG に着目して研究を進行した。H-NS については、精製方法を検討し、濃度依存的に部分 DNA 配列を利用したレポーター系の転写を抑制可能であることを確認した。Rho、NusA、NusG に関しては、HisSUMO タグをつけたコンストラクトを利用し、ポリエチレンジアミン処理、硫酸沈殿、Ni カラム精製、Ulp1 処理による HisSUMO タグの除去、ヘパリンカラム処理(Rho)もしくは陰イオン交換(NusA、NusG)を通して精製に成功した。Rho については各種検討の結果、RNase の混入が問題となることが示された。この問題は市販の RNase inhibitor を利用することで解決できた。得られたタンパク質群を利用し、これらを組み合わせた 7 条件に関して RNAseq 解析を行った。得られた結果は解析中であるが、因子依存的にトランスクリプトームが変化されることが確認された。今後、転写終結点、アンチセンス転写の因子依存性などに注目し、解析を進行していく。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>The purpose of this study is to elucidate the design principle for the transcriptome formation from a bottom-up approach. The self-replication of living cells is derived from the transcription-translation of the genomic DNA, resulting in the synthesis of diverse molecules. However, it has been discovered that not only DNA sequences but also dynamic structural changes and abnormal transcription and post-transcriptional regulation play important roles. Factors controlling the transcriptome are essential or have a lot of functional redundancy, making it difficult to understand through conventional analyses such as genetic deletion or overexpression. Previously, top-down analyses have suggested that factors controlling genome structure and transcription termination factors are important for the dynamic range of transcriptome formation. In this study, we aimed to verify this hypothesis using a reconstituted genome transcription system (iGeTX), which uses a purified bacterial genome and transcription factors to transcribe genes encoded in genome. We first focused on the nucleoid protein H-NS, transcription termination factors Rho, NusA, and NusG, which are known to be involved in global transcriptional control. Regarding H-NS, we confirmed that it can suppress transcription of a reporter system using a DNA fragment prepared by PCR in a concentration-dependent manner after refinement of the purification method. For Rho, NusA, and NusG, we successfully purified them using constructs with a HisSUMO tag and purification steps such as polyethyleneimine treatment, ammonium sulfate precipitation, Ni column purification, removal of HisSUMO tags by Ulp1 treatment, and purification using heparin columns (Rho) or anion exchange (NusA, NusG). Our investigation showed that RNase contamination is a problem with Rho, but we also found that this issue was resolved using commercially available RNase inhibitors. Using the obtained proteins, we performed RNAseq analysis for seven conditions in their combination. The results are currently being analyzed, but it has been confirmed that the transcriptome changes depending on the factors. We are now focusing on factor-dependent transcription termination points, antisense transcription, and continue the analysis.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
岡村奏知、齋藤圭祐、松井ゆきの、土居信英、藤原慶	精製因子で創るトランスクリプトーム	「細胞を創る」研究会 15.0	2022年10月17,18日			
齋藤圭祐、岡村奏知、松井ゆきの、土居信英、藤原慶	無細胞ゲノム転写系における転写終結再構成への挑戦	第17回無細胞生命科学研究会	2022年11月17日			