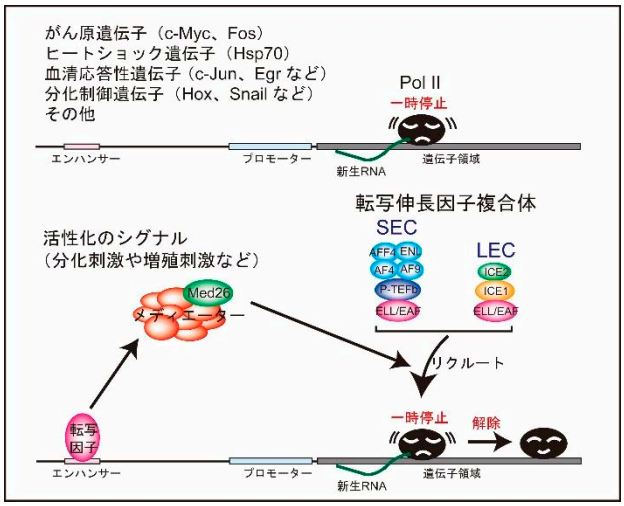
103　Med26による細胞増殖から分化への制御機構の解明	高橋　秀尚

【目的】近年のゲノムワイドな解析により、非常に多くのヒトの遺伝子（約 30%と示唆される）で、転写開始直後に RNA ポリメラーゼⅡ（PolⅡ）がプロモーター近傍（転写開始点の 20～50 塩基下流）で一時停止していることが明らかとなった。PolⅡの一時停止が解除され PolⅡが新生 RNA 鎖の合成を再開するためには転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子が、どのようにして特定の遺伝子領域に時期特異的にリクルートされるのかについて未知であった。私はこれまでに、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、二つの異なる転写伸長因子複合体 Super elongation complex（SEC）と Little elongation complex（LEC）を、それぞれ異なる種類の遺伝子領域へとリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした。さらに、最近の解析によって、Med26 と LEC は、snRNA（small nuclear RNA）遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子などの発現を制御することがわかった。snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子の転写産物（メッセンジャーRNA：mRNA）はポリアデニル化（ポリ A 付加）されない。興味深いことに、Med26 と SEC は mRNA にポリ A がある腫瘍関連遺伝子（*c-Myc*、*Hox*）の転写を制御する一方で、Med26 と LEC はポリ A のない複製依存性ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写を制御することがわかってきた。本研究では、Med26 が SEC や LEC と共役することによって PolⅡの一時停止を解除し、さまざまな細胞や組織の増殖維持や分化への移行においてどのような役割を果たすのかについて解明する（図参照）。さらに Med26 が LEC と共役して、ポリ A のない遺伝子の転写を制御する機構に関して解明する。

【方法】1. SEC がポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するのかについて解明する。2. LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するメカニズムを明らかにする 3. Med2 が、さまざまな組織（血液、肝臓、脳など）においてどのような生理的役割を果たすのかについて解明する。

【結果】本研究において、MED26 は LEC をリクルートすることで、mRNA にポリ A のない遺伝子群（snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子など）の転写終結を制御し、mRNA にポリ A が付加されないように制御することを明らかにした。このように、MED26 は SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれ mRNA にポリ A のある遺伝子とポリ A のない遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。Med26 は SEC と共役し細胞増殖関連遺伝子の発現を促進する一方で、LEC と共役して細胞周期の S 期にヒストン遺伝子の発現を促進することで細胞増殖を促進する。今後、細胞分化の際に Med26 の機能が抑制され、細胞が増殖から分化へとスイッチするのかについての解明が重要となる。

Med26 と転写伸長因子複合体による PoⅡの一時停止解除



103. Med26 による細胞増殖から分化への制御機構の解明

高橋　秀尚

横浜市立大学 大学院医学研究科 分子生物学分野

Key words：遺伝子発現制御，転写，RNA ポリメラーゼⅡ

緒　言

近年のゲノムワイドな解析により、非常に多くのヒトの遺伝子（約 30%と示唆される）で、転写開始直後に RNA ポリメラーゼⅡ（PolⅡ）がプロモーター近傍（転写開始点の 20～50 塩基下流）で一時停止していることが明らかとなった。PolⅡの一時停止は、発現の迅速あるいは同調した誘導が必要な分化制御遺伝子やがん遺伝子を始め、血清応答性遺伝子など、非常に多くのヒト遺伝子においてみられる。この PolⅡの一時停止とその解除の機構は、細胞の増殖維持から分化への移行（スイッチ）において重要な役割を果たしていることが分かってきている。PolⅡの一時停止が解除され PolⅡが新生 RNA 鎖の合成を再開するためには転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子が、どのようにして特定の遺伝子領域に時期特異的にリクルートされるのかについて未知であった。私はこれまでに、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、2 つの異なる転写伸長因子複合体 Super elongation complex（SEC）と Little elongation complex（LEC）を、それぞれ異なる種類の遺伝子領域へとリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした [1～4]。さらに、最近の解析によって、Med26 と LEC は、snRNA (small nuclear RNA）遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子などの発現を制御することがわかった。snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子の転写産物（メッセンジャーRNA：mRNA）はポリアデニル化（ポリ A 付加）されない。興味深いことに、Med26 と SEC は mRNA にポリ A がある腫瘍関連遺伝子の転写を制御する一方で、Med26 と LEC はポリ A のない複製依存性ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写を制御することがわかってきた。本研究では、Med26 が SEC や LEC と共役することによって PolⅡの一時停止を解除し、さまざまな細胞や組織の増殖維持や分化への移行においてどのような役割を果たすのかについて解明する（図 1）。さらに Med26 が LEC と共役して、ポリ A のない遺伝子の転写を制御する機構に関して解明する。

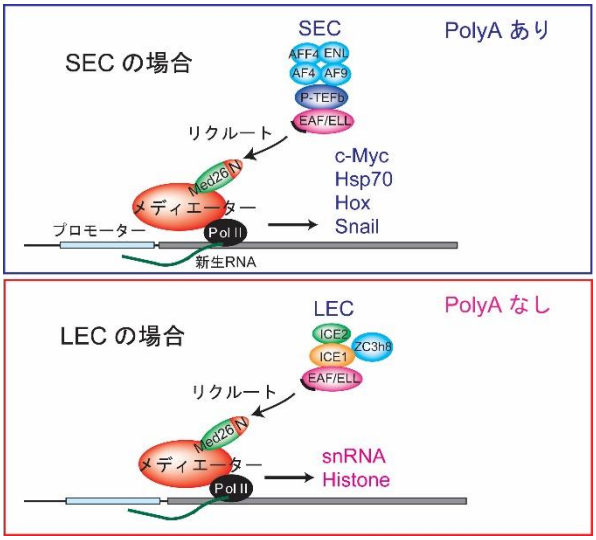


図 1：Med26 による SEC と LEC の使い分け機構
Med26 は SEC を PolyA のある遺伝子領域にリクルートし、LEC を PolyA のない遺伝子領域にリクルートする。

方　法

1. SEC がポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するのかについて解明する

SEC や LEC によって制御される遺伝子を、ChIP-seq 解析や RNA-seq 解析によって網羅的に明らかにする。

2. LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するメカニズムを明らかにする

Med26 や LEC の機能を阻害することによって、転写が正常に終結されず、Pol Ⅱによる Read through（読み過ごし）が起こる遺伝子を Precision Run On sequence 解析（PRO-seq）によって網羅的に解明する。これまでの解析から、LEC は snRNA 遺伝子や複製依存的ヒストン遺伝子の転写終結点において、ポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させ、さらに、RNA の 3’末端プロセシングを促進する可能性が考えられた。そこで、本研究では LEC の機能は抑制した細胞を用いて Precise Run On-seq 解析を行い、LEC がポリ Aの無い遺伝子においてポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させ、ポリ A 付加を抑制するのかを解明する。さらに、LEC と結合する転写関連タンパク質を網羅的に同定する。

3. Med26 が細胞増殖から分化への移行において果たす役割を解明する

Med26 は SEC や LEC を、細胞分化を制御するような遺伝子領域にリクルートすることによって、Pol Ⅱの一時停止を解除し、幹細胞の増殖維持から分化への移行（スイッチ）を制御している可能性が考えられる。本研究では、Med26 コンディショナルノックアウトマウスと薬剤誘導型の Cre 発現マウスを用いて、各組織由来の幹細胞を単離後、薬剤誘導性に Med26 をノックアウトし、Med26 が各組織（造血組織や肝臓、脳、腸管）における幹細胞維持やその分化への移行にどのような役割を果たすのかについて解析する。

結　果

1. SEC はポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御する

MED26 による SEC と LEC の使い分けの細胞機能における意義を追求すべく、最初に SEC によって制御される遺伝子を網羅的に解明することを試みた。Med26 と SEC のサブユニット AFF4 をノックダウンした細胞を用いて RNA シークエンス解析を行った。すると、Pol Ⅱがプロモーター近傍で一時停止しているような遺伝子の *c-Myc*、*Snail2*、*Hsp70* などの遺伝子の発現が特異的に低下することがわかった。このことから、Med26 と SEC は共役して、Pol Ⅱが一時停止しているような遺伝子の発現を制御することがわかった。次に Med26 と LEC のサブユニット ICE1 をノックダウンした細胞を用いて RNA シークエンス解析を行った。すると、非常に興味深いことに、mRNA にポリ A が付加されないような複製依存的ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子において、転写が正常に終結されずに Pol Ⅱがポリ A 付加シグナル領域を Read through（読み過ごし）し、mRNA にポリ A が付加されてしまうことが明らかとなった（図 2）[5]。

2. LEC によるポリ A のない遺伝子の転写制御機構

私は LEC 結合因子のプロテオミクス解析から、LEC には転写終結機能を有する DSIF/NELF/Cap-binding 複合体（CBCA）、3’末端プロセシングの機能を有する Integrator 複合体（snRNA の 3’末端プロセシング因子）や Heat labile factor 複合体（HLF : 複製依存性ヒストンの mRNA の 3’末端プロセシング因子）が結合することを明らかにした。このことから、LEC は snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子領域の転写終結点において DSIF/NELF/Cap-binding 複合体をリクルートし、ポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させる。さらに LEC は、Integrator 複合体や HLF 複合体をリクルートすることによって、snRNA やヒストン mRNA の 3’末端プロセシングをそれぞれ促進することが明らかとなった（図 3 参照）。このように、Med26 は SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれ mRNA にポリ A のある遺伝子とポリ A のない遺伝子の発現を制御することが明らかとなった［5］。

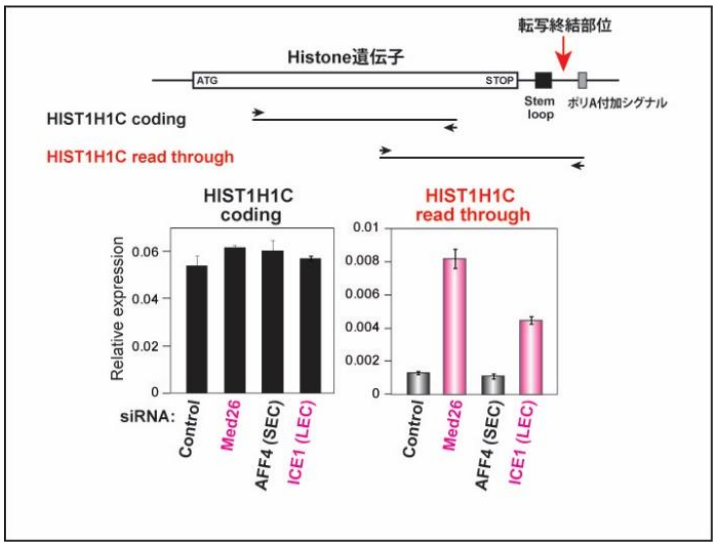


図 2. Med26 と LEC は複製依存性ヒストン遺伝子の転写終結を制御する
LEC のコンポーネントの ICE1 をノックダウンするとヒストン遺伝子領域 Pol II の読み過ごしが生じるが、SEC のコンポーネントの AFF4 をノックダウンしても読み過ごしは生じない（誤差は 3 サンプルの標準偏差）。

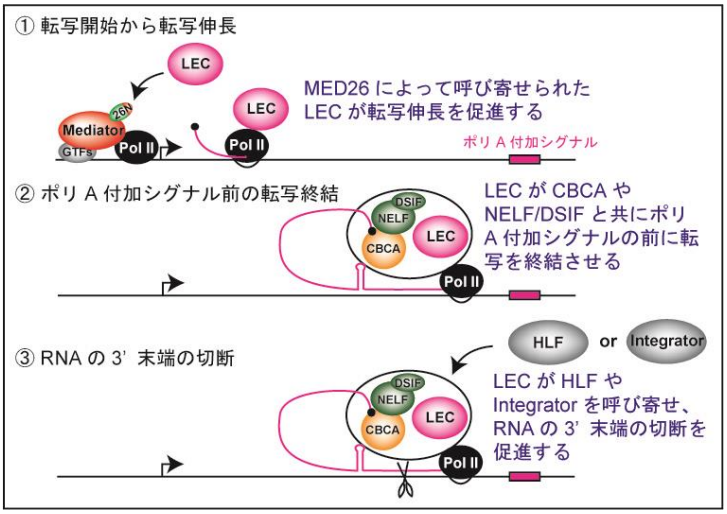


図 3. Med26 と LEC による複製依存性ヒストンや snRNA 遺伝子の転写終結制御
Mediator のサブユニット Med26 によってプロモーターにリクルートされた LEC は、Pol II による遺伝子の転写伸長を促進する。転写終結点近傍において、LEC は CBC-NELF と共に転写終結を促進する。この時、LEC によってヒストン遺伝子領域では HLF がリクルートされ、snRNA 遺伝子領域では Integrator がリクルートされて、3’ プロセシングが促進される。

3. Med26 の細胞増殖から分化への移行において果たす役割の解明

Med26 は SEC を *c-Myc*、*Snail2*、*Hox* 遺伝子などの細胞分化を制御する遺伝子領域にリクルートすることによって、Pol II の一時停止を解除し、幹細胞から分化細胞への移行を制御している可能性が考えられた。本研究においては、Med26 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。現在、各種 Cre マウスと交配し、Med26 の造血組織や他の組織の幹細胞を単離し、Med26 が幹細胞の増殖から分化への移行に果たす役割の解明を目指す。

考　察

SEC のサブユニットの ELL、AF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL（Mixed Lineage Leukemia）遺伝子と高頻度に染色体転座を引き起こし、混合型急性白血病を発症させる［1］。最近の研究で、混合型急性白血病では、転座の結果生じる MLL 融合タンパク質が SEC を *Hox* 遺伝子などの白血病関連遺伝子領域に異常にリクルートすることで、それらの遺伝子の転写伸長を亢進させることが発症メカニズムであることが報告された。このように、SEC は小児の難治性リンパ性白血病の発症を引き起こす因子であり、国際的にも非常に活発に研究されている。また、メディエーターの他のサブユニット Med23 や Med12 の遺伝子変異がヒトの知能障害や子宮筋腫の原因となっていることが報告され、メディエーター複合体と疾患との関連も国際的に注目されている。

複製依存性ヒストン遺伝子の mRNA にポリ A が付加されると、細胞周期の DNA 複製期以降も mRNA が安定してしまい、ヒストンタンパク質が過剰に産生され、染色体の不安定性や腫瘍性疾患発症の引き金となることが明らかとなってきている［4, 5］。このようなことから、Med26 と LEC によるポリ A 付加の抑制機構の解明は、腫瘍性疾患の発症メカニズムに関与している可能性が考えられる。このように、Med26 による SEC や LEC のリクルート機構は、がんや白血病などの腫瘍性疾患の発症メカニズムに関わっている可能性が強く考えられ、この機構の解明は遺伝子発現制御機構の解明のみならず腫瘍発症のメカニズムを解明する上でも非常に重要である。

謝　辞

この度は、上原記念生命科学財団からの研究助成を賜り、心より感謝申し上げます。

文　献

1） Lin C, Smith ER, Takahashi H, Lai KC, Martin-Brown S, Florens L, Washburn MP, Conaway JW, Conaway RC, *Shilatifard A.: AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. Mol Cell, 37(3), 429-437, 2010. doi: 10.1016/j.molcel.2010.01.026. PMID: 20159561

2） Takahashi H, Parmely TJ, Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CA, Kong SE, Szutorisz H, Swanson SK, Martin-Brown S, Washburn MP, Florens L, Seidel CW, Lin C, Smith ER, Shilatifard A, Conaway RC, *Conaway JW.: Human Mediator Subunit MED26 Functions as a Docking Site for Transcription Elongation Factors. Cell, 146(1), 92-104, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.005. PMID: 21729782

3） Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, *Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Nat Commun, 6, 5941, 2015. doi: 10.1038/ncomms6941. PMID: 25575120

4） Anwar D, Takahashi H, Watanabe M, Suzuki M, Fukuda S, *Hatakeyama S.: p53 represses the transcription of snRNA genes by preventing the formation of little elongation complex. BBA Gene Regulatory Mechanisms, 1859, 975-982, 2016. doi: 10.1016/j.bbagrm.2016.06.001. Epub 2016 Jun 3. PMID: 27268141

5） Takahashi H*, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama I. K, Washburn P. M, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C.R, Conaway W.J*, Hatakeyama S*.: The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination. Nat Commun. 11(1):1063. 2020. doi: 10.1038/s41467-020-14849-1. PMID: 32102997