

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04701

研究課題名(和文)新規転写伸長制御因子Med26の混合型急性白血病への関与についての解析

研究課題名(英文) Analysis on the involvement of the new transcriptional elongation regulator Med26 in mixed acute leukemia

研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI, Hidehisa)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではMed26とSECが共役して、Pol IIの一時停止を解除し、がんや白血病などの腫瘍の増殖を促進する機構を解明するために解析を行った。さらに、Med26が2つの異なる転写伸長因子複合体SECとLECを使い分けることによって、どのようにして異なる遺伝子の転写発現を制御するのかに関して解明を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we addressed the mechanisms how Med26 and SEC collaborate to release the paused Pol II and clarified the mechanism of promoting tumor growth. Furthermore, we clarified how Med26 regulates the transcriptional expression of the distinct genes by recruiting two distinct transcription elongation complexes SEC and LEC.

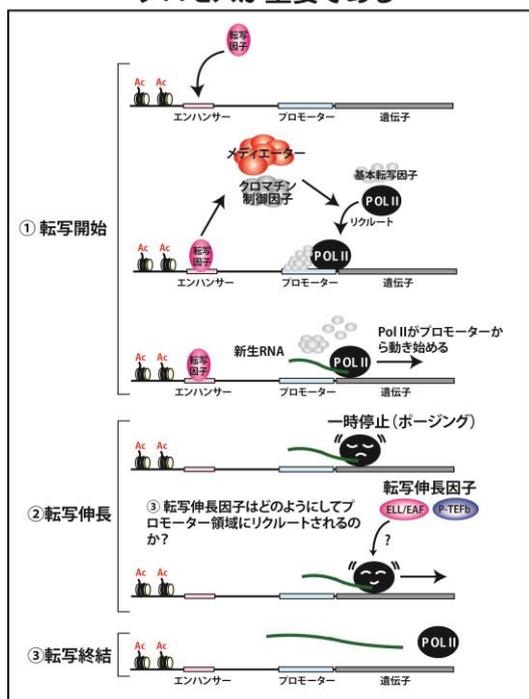
研究分野：生化学

キーワード：遺伝子発現制御 転写 転写伸長

1. 研究開始当初の背景

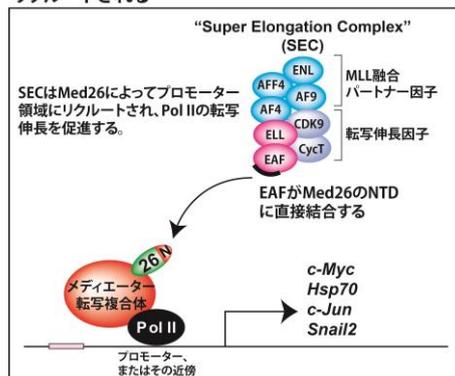
近年、ゲノムワイドな ChIP シークエンスなどの解析により、非常に多くのヒトの遺伝子 (約 30%) で、転写開始直後に Pol II がプロモーター近傍 (転写開始点から 20~50 塩基下流) で一時停止していることが明らかになり、遺伝子発現の制御において転写伸長のプロセスが非常に重要な役割を果たしていることがわかってきた。この現象はがん遺伝子 *c-Myc* や *Fos*、熱ショック遺伝子 *Hsp70* において最初に発見された。Pol II の一時停止が解除され Pol II が新生 RNA の合成を再開するためには P-TEFb や ELL/EAF などの転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子が、どのようにしてプロモーター近傍にリクルートされるのかについては、明らかとなっていない (図 1 参照)。

図1: 遺伝子発現において転写開始後のプロセスが重要である



われわれは、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、その N 末端ドメイン (NTD) によって、転写伸長因子複合体 Super elongation complex (SEC) を *c-Myc*

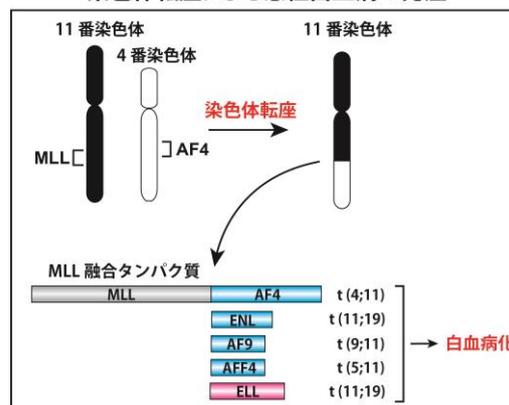
図2: Med26によってSECは腫瘍関連の遺伝子領域にリクルートされる



や *Hsp70* などの腫瘍に関連する遺伝子領域にリクルートし、転写伸長を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. *Cell* 2011】 (図 2 参照)。

われわれはこれまでに、SEC が転写伸長因子の ELL/EAF、P-TEFb に加え MLL 融合パートナー因子の AF4、AFF4、AF9 や ENL をサブユニットとして有することを明らかにしている【Lin C, Takahashi H, et al. *Mol Cell* 2010】。非常に興味深いことに、SEC のサブユニットの ELL、AF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子と混合型急性白血病で高頻度に染色体転座がみられる (図 3 参照)。

図3: SECサブユニットの遺伝子とMLL遺伝子の染色体転座による急性白血病的発症



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* などの白血病関連遺伝子領域にリクルートし、さらに Pol II のリクルートも促進することで、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の一つであることがわかった。この時、SEC がどのようなメカニズムによって、Pol II を遺伝子領域へとリクルートするのかに関して未知であった。

また、われわれは Med26 の NTD に結合するもう一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) を同定した。興味深いことに、Med26 は LEC を *small nuclear RNA (snRNA)* などの遺伝子領域にリクルートする機能を果たすことを明らかにした【Takahashi H, et al. *Nat Commun* 2015】。

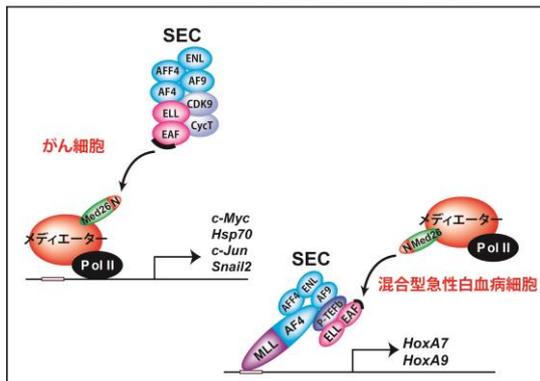
2. 研究の目的

Med26 は N 末端ドメインで SEC と結合し、C 末端ドメインでメディエーター-Pol II 複合体と結合することから、混合型急性白血病では MLL と融合した SEC が Med26 との結合を介してメディエーター-Pol II 複合体を白血病関連遺伝子領域にリクルートする可能性が考えられる (図 4 参照)。このように、がん細胞や急性白血病細胞では、メディエーターが Med26 を介して SEC をリクルートするが、混合型急性白血病においては、SEC がメディエーター

- Pol II 複合体を (Med26 と SEC との結合を介して) 白血病関連遺伝子領域にリクルートし、腫瘍細胞の増殖を亢進させている可能性が考えられる (図 4 参照)。

本研究では Med26 と SEC が共役して、Pol II の一時停止を解除し、がんや白血病などの腫瘍の増殖を促進する機構を明らかにする。さらに、Med26 が 2 つの異なる転写伸長因子複合体 SEC と LEC を使い分けることによって、どのようにして異なる遺伝子の転写発現を制御するのかに関して解明する。

図4: Med26による腫瘍発症メカニズム



3. 研究の方法

本研究では ChIP-seq 解析や RNA-seq 解析、Precise Run On-seq 解析などのゲノムワイド解析を行い、Med26 と SEC による遺伝子発現制御と腫瘍細胞の増殖促進機構、Med26 と LEC による遺伝子の発現制御機構を明らかにするために解析を行った。

4. 研究成果

(i) Med26 と SEC による遺伝子発現制御機構と、その機構による腫瘍細胞の増殖促進機構の解明

Med26 の標的遺伝子を明らかにするため、RNA-seq や ChIP-seq 解析を行ったところ、Med26 は SEC と共役して、がん原遺伝子 *c-Myc* や *c-Jun*、ヒートショック遺伝子 *Hsp70*、がん転移に関連する *Snail2*、がん細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与する *xCT* などの遺伝子の発現を促進することがわかった。

また、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインを Med26 の NTD と融合させた GAL4-Med26-NTD は、細胞内において強い内因性転写活性を有することがわかった。そこで、Med26-NTD の転写活性を指標にして、Med26-NTD と SEC の結合を阻害する化合物の探索を行っている。

(ii) Med26 と LEC による遺伝子の発現制御機構の解明

本研究において、Med26 と SEC が *c-Myc* などの mRNA にポリ A のある遺伝子の発現を制御する一方で、Med26 と LEC は *snRNA* 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝

子などの mRNA にポリ A のない遺伝子の発現を制御することがわかった。興味深いことに、がん抑制因子 p53 は LEC のリクルートを阻害することによって、*snRNA* 遺伝子の発現を抑制することが判明し、p53 のがん抑制因子としての機能が Med26 と LEC の機能阻害によって発揮されることも判明した【Anwar D, Takahashi H, et al. *BBA-GRM* 2016】。

また、LEC に結合する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因子や 3' プロセシングの機能を有する因子が結合することがわかった。

このことから、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転写終結因子や 3' 末端のプロセシング因子をリクルートし、転写終結を促進することがわかった。現在、本機構解明に関する論文投稿の準備を行っている。

今後は LEC のコンポーネントの ICE1 変異型を発現する細胞を作製し、ChIP-seq 解析や Precise Run On-seq 解析を行い、LEC がポリ A 付加シグナルの前に転写を終結させ、ポリ A 付加を抑制する機構について詳細に解明したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. *Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Watanabe M, Hatakeyama S. *J Neurol.* 265(4):962-965, 2018. 査読有
2. *Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H.: Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. *Sci Rep.* 8(1):819, 2018. 査読有
3. *Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Matsumoto M, Nakayama KI, Watanabe M, *Hatakeyama S.: Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 494(1-2):234-241, 2017. 査読有
4. Mizushima W, Takahashi H, Watanabe M, Kinugawa S, Matsushima S, Takada S, Yokota T,

Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Chiba I, Nagashima S, Yanagi S, Matsumoto M, Nakayama K, Tsutsui H, *Hatakeyama S: The novel heart-specific RING finger protein 207 is involved in energy metabolism in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 100, 43-53, 2016. 査読有

5. 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. 査読有
6. Fujieda Y., Amengual O., Matsumoto M., Kuroki K., Takahashi H., Kono M., Kurita Y., Otomo K., Kato M., Oku K., Bohgaki T., Horita T., Yasuda S., Maenaka K., Hatakeyama S., Nakayama K.I. and *Atsumi T.: Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes. *Rheumatology*, 55, 1117-1126, 2016. 査読有
7. Suzuki M., Watanabe M., Nakamaru Y., Takagi D., Takahashi H., Fukuda S. and *Hatakeyama S.: TRIM39 negatively regulates the NFκB-mediated signaling pathway through stabilization of cactin. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1085-1101, 2016. 査読有
8. Hayashi M, Maehara K, Harada A, Semba Y, Kudo K, Takahashi H, Oki S, Meno C, Ichiyangi K, Akashi K, *Ohkawa Y. Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J Cell Biochem.*, 117(3), 780-792, 2016. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 高橋秀尚, 畠山鎮次, Med26 は Little elongation complex をリクルートすることで small nuclear RNA 遺伝子の発現を制御する, 日本 RNA 学会, 札幌, 2015 (口頭発表)
2. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe

M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, *Hatakeyama S.: Human Mediator subunit Med26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex, CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2015

3. 高橋秀尚, Conaway, J.W., Conaway, R.C., 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写伸長制御機構, 第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2015 (口頭発表)
4. 高橋秀尚, 畠山鎮次, Regulation of transcription termination by Human Mediator complex, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 (口頭発表)
5. 高橋秀尚, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写制御機構, 第 89 回日本生化学会年会, 仙台, 2016 (口頭発表)
6. Hidehisa Takahashi, Mio Shibata, Ichigaku Takigawa, Masashi Watanabe, Junichi Yamamoto, Yuki Yamaguchi, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama.: Human Mediator subunit MED26 plays a role in 3'-end processing of replication dependent Histone mRNA through recruitment of little elongation complex, CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2017
7. 高橋秀尚, 柴田美音, 瀧川一学, 渡部昌, 築山忠維, 藤井聡, 飯田緑, 山本淳一, 山口雄輝, Amol Ranjan, Shigeo Sato, Chieri-tomomori Sato, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山鎮次, (口頭発表) メディエーター複合体による転写終結制御機構, ConBio2017

[図書]
該当ありません。

[産業財産権]
該当ありません。

[その他]

<https://ycu-molecularbiology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI, Hidehisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：30423544