

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590233

研究課題名（和文）転写伸長因子 Elongin A の発生・神経分化における役割の解明

研究課題名（英文）Role of mammalian transcription elongation factor Elongin A in mouse neural development

研究代表者

安川 孝史（YASUKAWA TAKASHI）

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：60291936

研究成果の概要（和文）：Elongin A は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による mRNA 合成の伸長段階において Pol II の一時停止を抑制することにより転写伸長速度を増加させる転写伸長因子の 1 つである。今回我々は、Elongin A ホモ欠失マウス胎仔が脳ならびに脊髄神経の形成異常を示し、同因子ホモ欠失 ES 細胞がニューロンへの分化能を著しく欠いていることを見出した。また、Elongin A の伸長促進ならびに E3 の 2 つの活性を選択的に欠損した変異体を同定し、Elongin A の伸長促進機能が ES 細胞の神経分化ならびにレチノイン酸により誘導されるニューロン新生関連の一群の遺伝子の発現上昇に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Elongin A is an RNA polymerase II (Pol II) transcription elongation factor that increases the rate of Pol II transcript elongation by suppressing transient pausing by the enzyme. Elongin A also acts as the substrate recognition subunit of a cullin 5 (Cul5)-containing cullin-RING ligase (CRL) that can target stalled Pol II for ubiquitination and degradation by the proteasome. It is not known whether these activities of Elongin A are functionally interdependent in vivo. Here, we demonstrate that Elongin A-deficient (Elongin A^{-/-}) mouse embryos exhibit abnormalities in the formation of both cranial and spinal nerves and that Elongin A^{-/-} embryonic stem cells show a markedly decreased capacity to differentiate into neurons. We identify Elongin A mutations that selectively interfere with its the ability to stimulate pol II elongation or to assemble with Cul5 into a functional ubiquitin ligase, and we show that the elongation stimulatory, but not Rpb1 ubiquitylation, activity of Elongin A is required to rescue neuronal differentiation and support retinoic acid-induced up-regulation of a subset of neurogenesis-related and other genes in Elongin A^{-/-} ES cells. These findings identify an important role for Elongin A and its transcription elongation activity in timely expression of genes critical for neurogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：遺伝・受精・発生・分化

1. 研究開始当初の背景

Elongin は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による mRNA 合成を伸長段階において調節する機能を担う転写伸長因子の 1 つであり、伸長促進活性を有する A サブユニットと、その活性を正に制御する作用を示す B ならびに C の 2 つのサブユニットから成る三量体として単離された。我々は、これまでに、1) Elongin A ホモ欠失マウスが、全身性の低形成のために胎生致死となり、その胚では、神経層が薄く中枢神経系の低形成が見られること (*Cell Death Differ.* 2007)、2) 同因子がユビキチンリガーゼ (E3) として機能し Pol II のユビキチン化・分解に働くこと (*EMBO J.* 2008)、などを報告していた。また、Elongin A ホモ欠失 ES 細胞が、野生型 ES 細胞に比して分化傾向にあるという知見を得ていた。これらのことから、Elongin A が発生に必須であり神経分化においても重要な機能を担っているものと考えられ、それは転写の伸長促進だけでなく、蛋白質レベルの制御においても何らかの重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

転写伸長因子 Elongin A が発生及び神経分化において果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胚の免疫組織学的解析

野生型と Elongin A ホモ欠失マウスの胎生 9.5 日～10.5 日胚を用いて、ホルマウント及びパラフィン包埋により切片を作製しニューロフィラメント等神経細胞に特異的なマーカーの抗体により免疫染色を行い、より詳細に神経系の形成の差異について解析を行った。

(2) ES 細胞を用いた解析

- ① 野生型と Elongin A ホモ欠失 ES 細胞を用いて胚様体を形成させ、レチノイン酸による神経への分化誘導後、その神経分化能の差異について神経細胞のマーカーの抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。
- ② 野生型・Elongin A ホモ欠失 ES 細胞由来の胚様体よりレチノイン酸による分化誘導前後で RNA を回収し、DNA Micro Array により Elongin A の欠失により変動する遺伝子の発現解析を行った。
- ③ 野生型 Elongin A を Elongin A ホモ欠失 ES 細胞に戻すレスキュー実験を行い、その神経分化能が回復するか調べた。また、Elongin A ホモ欠失 ES 細胞において②の Micro Array で、発現低下の見られた遺伝

子の発現が回復するか解析を行った。

- ④ Elongin A の変異体を Elongin A ホモ欠失 ES 細胞に導入し、神経分化に必要な機能ドメインの同定を行った。

4. 研究成果

Elongin A ホモ欠失マウスの胎仔の免疫組織学的解析を行ったところ動眼神経の欠失、三叉、顔面、内耳、舌咽神経等の脳神経ならびに脊髄神経の形成が顕著に損なわれていることが判明した(図 1)。

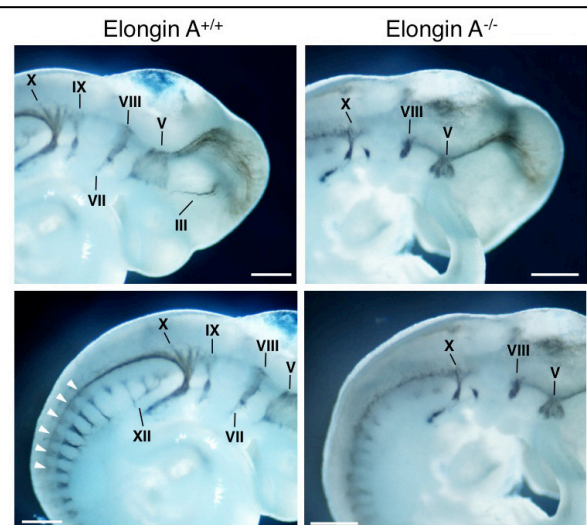


図 1：野生型と Elongin A ホモ欠失マウス胚の神経系形成

胎生 10.5 日胚を抗ニューロフィラメント抗体で染色。III：動眼神経、V：三叉神経、VII：顔面神経、VIII：内耳神経、IX：舌咽神経、X：迷走神経、XII：舌下神経、白三角：脊髄神経節

また、同分子ホモ欠失 ES 細胞は、ニューロンへの分化能が著しく損なわれていることが判明した(図 2)。

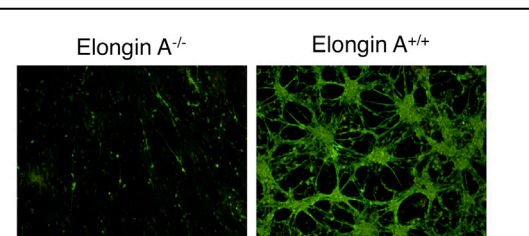


図 2 レチノイン酸による神経細胞への分化 (神経細胞のマーカー β III-チューブリンの抗体で染色)

そして、その損なわれた神経分化能は、野生型 Elongin A を戻すことで回復が見られた(図 3)。

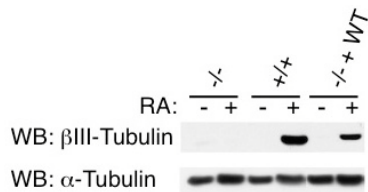


図 3: Elongin A 導入による神経分化能の回復
Elongin A^{+/+}(+/+)、Elongin A^{-/-}(-/-) ES 細胞
ならびに野生型 Elongin A を導入した
Elongin A^{-/-} ES 細胞(-/- + WT)を用いて、レ
チノイン酸(RA)によるニューロンへの分化誘
導を行いβ III-チューブリン(神経細胞のマ
ーカー)の発現を調べた。

DNA Micro Array 発現解析から Elongin A ホモ欠失 ES 細胞由来の胚様体では神経分化誘導後に、レチノイン酸により誘導されるニューロン新生関連の一群の遺伝子の発現低下が認められ、Elongin A がこれら遺伝子の発現上昇に重要であることが示唆された。実際に Elongin A ホモ欠失 ES 細胞に同因子を戻すことにより同遺伝子群のうちの幾つかについては、発現が回復することが確認できた(図 4)。

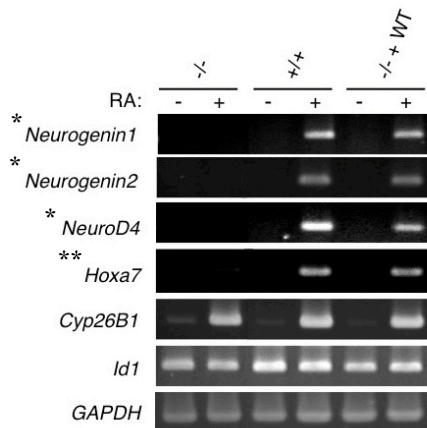


図 4: 神経分化誘導前後の遺伝子発現の比較
Elongin A^{+/+}(+/+)、Elongin A^{-/-}(-/-) ES 細胞
ならびに野生型 Elongin A を導入した
Elongin A^{-/-} ES 細胞(-/- + WT)を用いて、
RA によるニューロンへの分化誘導前後での
各遺伝子の発現を RT-PCR によりを比較し
た。

Elongin A は、ユビキチンリガーゼ (E3) 活性も持っている。そこで、[転写活性+, E3 活性-]ならびに[転写活性-, E3 活性+]変異体の同定を行い、それら変異体を Elongin A ホモ欠失 ES 細胞に導入し神経分化能に必要な Elongin A の活性の解析を行ったところ、ES 細胞の神経分化には E3 活性ではなく転写伸長活性が重要であることが判明した(図 5)。

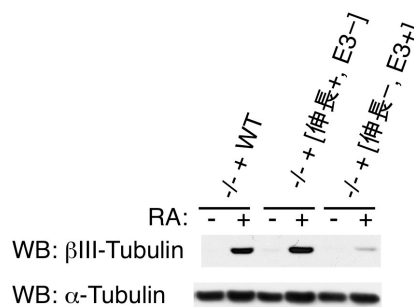


図 5: Elongin A 変異体導入による神経分化能の回復

野生型(WT)ならびにElongin A 変異体を導入した Elongin A^{-/-} ES 細胞(-/-)を用いて、レチノイン酸(RA)によるニューロンへの分化誘導を行いβ III-チューブリン(神経細胞のマーカー)の発現を調べた。

以上の結果より、Elongin A が ES 細胞の神経分化においてニューロン新生関連の一群の遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、マウス発生時の神経形成においても重要な役割を果たしていることが示唆された。これまでに 20 個以上の転写伸長因子が同定されているが、Elongin A ホモ欠失マウスが致死となることから、Elongin A は発生・分化に関わる重要な特定の遺伝子を標的に持つと考えられる。

今後は、同因子ホモ欠失 ES 細胞に野生型 Elongin A を戻した細胞を作製し、個体レベルで胎生致死性や正常な神経発生が回復するのかが確認する必要があると思われる。また、発生のステージごとの胚を用いて micro array 解析や ChIP-Seq を実施し、発生・神経分化における Elongin A の標的遺伝子の網羅的な解析を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada K, Tamamori-Adachi M, Goto I, Iizuka M, Yasukawa T, Aso T, Okazaki T, and Kitajima S, Degradation of p21^{Cip1} through APC/C^{Cdc20} mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin dependent kinase 2 in cardiomyocytes.、J. Biol. Chem.、査読有、Vol. 286, 2011, pp44057-44066

〔学会発表〕(計 3 件)

① Takashi Yasukawa

Transcriptional elongation factor Elongin A regulates retinoic

acid-induced gene expression during
neuronal differentiation of embryonic
stem cells
日本分子生物学 2011.12.15 横浜

② 井上充
ストレス反応における mammalian
Elongin A の特徴と役割
日本分子生物学 2011.12.15 横浜

③ 安川孝史
Elongin A 複合体による RNA polymerase
II ポリユビキチン化の制御
日本分子生物学会 神戸 2010/12/7～
2010/12/10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安川 孝史 (YASUKAWA TAKASHI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：60291936