

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02405

研究課題名(和文) Med26による新規のPol II液滴集積機構の細胞増殖分化における機能解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of a novel Pol II accumulation mechanism by Med26 in cell proliferation and differentiation

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現の新たな制御機構として、液滴による制御機構が注目されている。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つの異なる転写複合体Super elongation complex (SEC)やLittle elongation complex (LEC)と共役して、それぞれ異なる遺伝子群の転写を制御することを明らかにしてきた。本研究によって、細胞外からの刺激時にSECとLECのそれぞれの転写の場に、Med26を含むメディエーター複合体がRNAポリメラーゼIIを引き寄せることで、特定の遺伝子群の発現を統合的に活性化する機構が明らかとなっていった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メディエーター複合体の他のサブユニットMed23やMed12の遺伝子の変異がヒトの知的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が国際的にも注目されている。また、SECも小児の難治性リンパ性白血病の発症を引き起こす因子として国際的に非常に活発に研究されている。これまでの研究から、Med26も、がんや白血病などの腫瘍性疾患の発症に関わっている可能性が強く考えられる。本研究は、遺伝子発現制御の分野のみならず、腫瘍発症メカニズムの解明においても重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Droplet-mediated regulatory mechanisms are focused as a new regulatory mechanism of gene expression. I have previously shown that the Med26 subunit of the Mediator complex interacts with two different transcription complexes, the Super elongation complex (SEC) and the Little elongation complex (LEC), to regulate the transcription of different genes. This study reveals a mechanism by which Med26-containing Mediator complexes recruit RNA polymerase II to the regulatory sites of SEC and LEC upon extracellular stimulation, thereby integrally activating the expression of the genes.

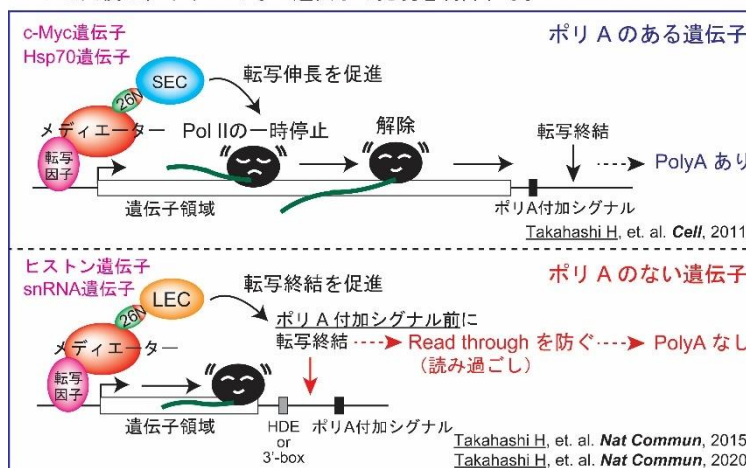
研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現 転写 液-液相分離

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムワイドな ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンスなどの解析により、遺伝子によっては、転写開始後に RNA ポリメラーゼ II (以下 Pol II) がプロモーター近傍 (転写開始点から 20~50 塩基下流) や転写終結領域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や転写終結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。Pol II のプロモーター近傍における一時停止の解除には、P-TEFb や ELL/EAF などの転写伸長因子の働きが必要である。

図1: Med26 は SEC と共役し、ポリ A のある遺伝子の発現を制御する一方で、LEC と共役し、ポリ A のない遺伝子の発現を制御する。



さらに、私はこれまでにメディエーター転写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、転写伸長因子を P-TEFb や ELL/EAF を含む複合体“Super elongation complex” (SEC) と結合し、*c-Myc* や *Hsp70* などのがん関連遺伝子において、転写伸長を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. *Cell*, 146(1), 92-104, 2011】(図 1 参照)。SEC は 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し、混合型急性白血病の発症に深く関与している【Lin C, Takahashi H, et al. *Mol Cell*, 37(3), 429-437, 2010】。

さらに、私は Med26 の NTD と結合するもう一つの新規複合体“Little elongation complex” (LEC) を同定した。LEC は転写伸長因子の ELL/EAF に加えて、ICE1、ICE2 をサブユニットとして有する。解析を行ったところ、Med26 を含むメディエーター複合体は LEC と結合することによって、small nuclear RNA (snRNA) や複製依存性ヒストン遺伝子などの mRNA にポリ A を含まない遺伝子において、Pol II の転写終結を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. *Nat Commun* 6, 5941, 2015】(図 1 参照)。最近、私は Med26 が LEC と共役することによって、ポリ A 付加シグナルの前に Pol II を停止させ、転写を終結させることで、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【Takahashi H, et al. *Nat Commun*, 11(1), 1063, 2020】(図 1 参照)。このように、MED26 が SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれポリ A のある mRNA とポリ A のない mRNA の転写を促進することが明らかとなった。

2. 研究の目的

Med26 を含むメディエーター複合体は細胞内で Pol II と強く結合することが知られている。最近の解析によって、SEC と LEC が、Med26 を含むメディエーター複合体を介して Pol II をそれぞれの場にリクルートし、特定の遺伝子群の発現を活性化することが明らかとなってきた。本研究では、Med26 が細胞外からの様々な刺激に応答して、Pol II を SEC や LEC の場へと集積させ、異なる遺伝子群の発現を促進する機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

- (1) さまざまな刺激によって、核内で SEC や LEC が場を形成する機構を解明する。
- (2) さまざまな刺激によって、Med26 を含むメディエーター複合体が、SEC と LEC の場に Pol II をリクルートする機構を解明する。
- (3) さまざまな組織幹細胞の増殖から分化への移行において、Med26 が果たす役割とその分子機構について解明する。

4. 研究成果

近年、ゲノムワイドな ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンスなどの解析により、遺伝子によっては、転写開始後に RNA ポリメラーゼ II (以下 Pol II) がプロモーター近傍 (転写開始点から 20~50 塩基下流) や転写終結領域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や転写終結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。Pol II のプロモーター近傍における一時停止の解除には、P-TEFb や ELL/EAF などの転写伸長因子の働きが必要である。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、その N 末端ドメイン (NTD) によって、転写伸長因子を P-TEFb や ELL/EAF を含む複合体“Super elongation complex” (SEC) と結合し、*c-Myc* や *Hsp70* などのがん関連遺

伝子において、転写伸長を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. *Cell*, 146(1), 92-104, 2011】。SECは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し、混合型急性白血物の発症に深く関与している【Lin C, Takahashi H, et al. *Mol Cell*, 37(3), 429-437, 2010】。さらに、私はMED26のNTDと結合するもう一つの新規複合体“Little elongation complex” (LEC)を同定した。LECは転写伸長因子のELL/EAFに加えて、ICE1、ICE2をサブユニットとして有する。解析を行ったところ、MED26を含むメディエーター複合体はLECと結合することで、small nuclear RNA (snRNA)や複製依存性ヒストン遺伝子などのmRNAにポリAを含まない遺伝子において、Pol IIの転写終結を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. *Nat Commun*, 6, 5941, 2015】。この時、MED26はLECと共役することによって、ポリA付加シグナルの前にPol IIを一時停止させ、転写を終結させることで、mRNAにポリAが付加されないように制御することが明らかとなった【Takahashi H, et al. *Nat Commun*, 11(1), 1063, 2020】。

また、ヒストン遺伝子とsnRNA遺伝子は、それぞれ細胞の核内の“場”である核内構造体Histone locus body (HLB)とCajal body (CB)において転写される。しかも、CBにはヒストン遺伝子の転写終結因子(U7 snRNPやNELFなど)が集積しており、CBとHLBは隣接会合して局在することがわかってきた。このことから、ヒストン遺伝子を含むHLBにCBが引き寄せられることによって、ヒストン遺伝子の転写終結が制御される可能性が予想された。本研究によって、MED26を含むメディエーター複合体とLECが、ヒストン遺伝子を含むHLBにCBを引き寄せることで、ヒストン遺伝子の転写終結領域でPol IIを一時停止させることが明らかとなった【Suzuki H, Takahashi H (責任著者), et al. *Nat Commun*, 13(1):2905, 2022】。MED26とLECの相互作用を欠失させ、その協働機能を喪失させた変異型細胞を作製し解析を行ったところ、HLBとCBの会合が著しく低下すると共に、ポリA鎖の付加された異常なヒストンRNAが蓄積することがわかった。さらに、ヒストン遺伝子の転写終結領域近傍において、Pol IIが一時停止していることが明らかとなり、この新規の一時停止を“TPP”(TES proximal pausing)と名付けた。このTPPには、メディエーター複合体とLECとの協働が必要であり、CBとHLBの会合によってTPPが引き起こされることも明らかとなった。このようにTPPは転写終結領域でポリA鎖の付加を指令する配列直前にPol IIにブレーキをかけることで、RNAにポリA鎖が付加されないように調節する「ピットイン」の役割を果たしていることが明らかとなった(図2参照)。

また最近、MED26はSECやLECの標的遺伝子領域で液滴を形成し、それらの標的遺伝子群の発現を統合的に活性化することが明らかとなってきた【Suzuki H, Takahashi H (責任著者), et al. *BioEssays*, 45(4):e2200178, 2023】。このような液-液相分離によって形成される液滴の機能を解明するために、私は抗体を用いた*in situ* ビオチン化による液滴構成因子の網羅的同定法を確立した。この手法を用いて、核内構造体のCBや核小体、 γ H2AX fociの構成因子の同定を行ったところ、既知の因子に加えて多くの新規因子が同定された【*Cell Reports*, in revision】。

図2：MED26が液滴形成を介して、複数の転写ステップを統合的に制御する (BioEssays誌の表紙より)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Suzuki H, Furugori K, Abe R, Ogawa S, Ito S, Akiyama T, Horiuchi K, Takahashi H	4. 巻 45(4)
2. 論文標題 MED26-containing Mediator may orchestrate multiple transcription processes through organization of nuclear bodies.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e2200178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.202200178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakai Y, Miyakawa K, Yamaoka Y, Hatayama Y, Nishi M, Suzuki H, Kimura H, Takahashi H, Kimura Y, Ryo A.	4. 巻 10(12)
2. 論文標題 Generation and Utilization of a Monoclonal Antibody against Hepatitis B Virus Core Protein for a Comprehensive Interactome Analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10122381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe E, Yamashita A, Hirota K, Yamaji T, Azushima K, Urate S, Suzuki T, Tanaka S, Taguchi S, Tsukamoto S, Uehara T, Wakui H, Tamura K, Takahashi H	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22343-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirose T, Sugitani Y, Kurihara H, Kazama H, Kusaka C, Noda T, Takahashi H, Shigeo Ohno	4. 巻 149(21)
2. 論文標題 PAR3 Restricts the Expansion of Neural Precursor Cells by Regulating Hedgehog Signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev199931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura K, Suzuki H, Abe R, Inohara H, Kaneda Y, Takahashi H, Nimura K*	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Dual function of SF3B2 on chromatin and RNA to regulate transcription in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biosci	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13578-022-00812-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki H, Abe R, Shimada M, Hirose T, Hirose H, Noguchi K, Ike Y, Yasui N, Furugori K, Yamaguchi Y, Toyoda A, Suzuki Y, Yamamoto T, Saitoh N, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW, Takahashi H*.	4. 巻 13(1), 2905
2. 論文標題 The 3' Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-30632-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 高橋秀尚	4. 巻 40(12)
2. 論文標題 Pol 動態の新常識 ポージングによる新たな転写制御機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 1910-1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cheng D, Semmens K, McManus E, Chen Q, Meerzaman D, Wang X, Hafner M, Lewis A.B, Takahashi H, Devaiah N.B, Gekonno A, Singer S.D.	4. 巻 7(50)
2. 論文標題 The nuclear transcription factor, TAF7, is a cytoplasmic regulator of protein synthesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci adv.	6. 最初と最後の頁 eabi5751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abi5751.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakamoto M, Sasaki K, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Cinletti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N, Matsumoto N.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 De novo ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet	6. 最初と最後の頁 69-81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab224.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyatake S, Kato M, Kumamoto T, Hirose T, Takahashi H, Tanaka F, Ogata K, Ohtaka-Maruyama C, Matsumoto N.	4. 巻 7(13)
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci adv.	6. 最初と最後の頁 eabd2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2368.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 鈴木秀文, 高橋秀尚	4. 巻 93(6)
2. 論文標題 メディエーター複合体のコンポーネントMED26による新たな転写制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 810-814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鈴木秀文, 阿部竜太, 嶋田美穂, 廣瀬智威, 廣瀬博子, 野口慶介, 池 陽子, 安井七海, 古郡華月, 山口雄輝, 豊田 敦, 鈴木 穰, 山本達郎, 斉藤典子, Shigeo Sato, Chieri Tomomori-Sato, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, 高橋秀尚
2. 発表標題 Poll の一時停止および核体凝集体の制御におけるメディエーター複合体の役割.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室のホームページ
<https://ycu-molecularbiology.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------