

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15041

研究課題名（和文）新生RNA鎖によるMED26液滴形成を介した転写制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of transcription regulation mechanism through MED26 droplet formation mediated by nascent RNAs

研究代表者

鈴木 秀文（SUZUKI, Hidefumi）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00793770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、メディエーター複合体のサブユニットMED26が液滴を形成して転写を制御する機構を解明することを目的に研究を行なった。本研究の結果、MED26はさまざまなRNAと相互作用していること、新生鎖RNAがMED26の液滴の形成に必要であること、そしてMED26の液滴形成にはMED26の天然変性領域が必要であることなどが明らかとなった。本研究成果は、メディエーター複合体を中心とした新たな転写制御機構の解明につながると期待される。

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は遺伝子発現制御において中心的な働きをする巨大な転写制御複合体であり、近年、その液滴形成を介した転写制御機構が世界的に注目を集めている。本研究では、その機能的サブユニットであるMED26に着目し、MED26タンパク質の液滴形成能についての解析を行うことで、メディエーター複合体の転写制御機構を解明しようと試みた。本研究によってMED26の液滴形成についての新規の知見が得られたことで、メディエーター複合体を中心とした未知の転写制御機構の解明につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of transcription regulation by MED26, one of subunits of Mediator complex, through its nuclear droplet formation. The results of this study showed that MED26 interacts with various RNAs, that nascent RNAs are required for MED26 droplet formation, and that MED26 droplet formation is dependent on its intrinsically disordered region. These results of this research are expected to lead to the elucidation of a novel mechanism of transcription regulation by Mediator complex.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：遺伝子発現制御 メディエーター複合体 MED26 天然変性領域

1. 研究開始当初の背景

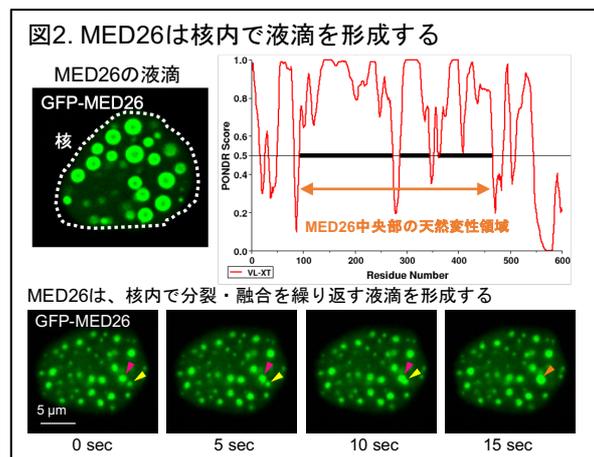
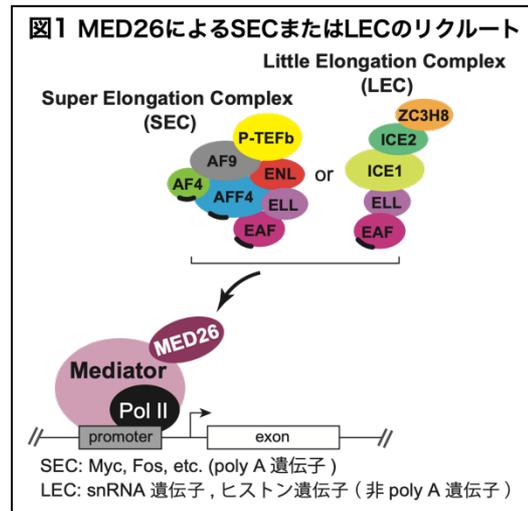
近年、転写はオンとオフを繰り返す不連続な反応であることがわかってきており、これは転写バーストと呼ばれている [Fukaya et al. *Cell* 2016, Ochiai et al. *Sci Adv* 2020]。転写バーストを制御する要素の1つとして、近年注目を集めている液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) が挙げられる [Palacio M. and Taatjes D.J., *J. Mol. Biol.*, in press]。LLPSは、タンパク質や核酸成分が凝集して膜をもたない集合体を形成する現象であり、分子内に天然変性領域を多く有するタンパク質が液相を形成することによって引き起こされる。近年、LLPSによって形成される液滴が、転写制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされ、LLPSと転写制御の研究は、現在、最もホットなトピックスの1つとなっている [Boija A. et al. *Cell* 2018, Heininger J.E. et al. *Cell* 2021]。核内液滴の内部では、転写反応に関わる様々な因子が濃縮され、多因子反応の場が形成されている。また、こうした液滴内部には、エンハンサーRNAなどの新生RNAが含まれていることが明らかにされつつあり、液滴形成におけるRNA鎖の関与が強く示唆されている。

メディエーター複合体は30以上のサブユニットから構成される巨大タンパク質複合体であり、転写制御において必須な役割を果たしている。われわれは、腫瘍性疾患と関連のあるメディエーター複合体のサブユニットMED26に着目して研究を行ってきた。これまでの研究で、MED26がELLとEAF、AF4、AFF4、ENLそしてP-TEFbから構成される転写伸長因子複合体Super Elongation Complex (SEC)や、ELL、EAF、ICE1、ICE2、ZC3H8から構成されるLittle Elongation Complex (LEC)と共役し、それぞれ異なるがん関連遺伝子群の転写を制御していることを明らかにした (図1) [Takahashi H., Suzuki H et al. *Nat. Commun.* 2020, 鈴木&高橋 生化学ミニレビュー 2021年12月刊]。最近の研究から、MED26が、SECまたはLECとともに核内で液滴を形成して遺伝子発現を調節していることがわかってきた (図2)。また、われわれの最新の研究結果から、MED26がクロマチン高次構造の形成に関与していることが示唆された。エンハンサーが集約されて形成されるクロマチンドメインが転写バーストを調節していることが報告されており、MED26の液滴でクロマチンドメインが形成されて転写バーストが制御されている可能性が考えられる。

こうした事実から、MED26の液滴“Mediator Bodies (MBs)”が、さまざまな核内分子と相互作用しながら遺伝子発現を制御する、新規の制御モデルが考えられた。

2. 研究の目的

MED26を中心とする液滴“Mediator Bodies (MBs)”が転写活性化を制御する新規の制御



モデルを提唱し、このモデルを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

- 刺激によって SEC/LEC 標的遺伝子を転写活性化した際に形成される MBs について、ChIP-seq、高解像度イメージング手法を用いて解析した。
- CRISPR-Cas9 を用いて MED26 の天然変性領域（IDR）を欠失させた変異型 MED26 を発現する細胞を作製し、MED26 の IDR が MBs 形成に果たす機能を解析した。
- 転写阻害剤によって新生 RNA 鎖合成を阻害したときの MED26 の挙動について、ライブセルイメージング手法で解析した。
- MED26 をノックダウンした細胞、または MED26 IDR 変異細胞を用いて 4sU-RNA-seq 解析を行い、転写活性化の解析を行なった。
- MBs の形成を誘導した後、独自手法“*in situ* ビオチン標識法”と質量分析法、次世代シーケンサー解析を用いて MBs の構成因子を網羅的に解析した。

4. 研究成果

まず MED26 をノックダウンした細胞において RNA-seq 解析を行った結果、MED26 のノックダウンにより多くの遺伝子の転写活性が減弱することがわかり、MED26 を中心としたメディエーター複合体が転写活性化に必要であることが示唆された。メディエーター複合体が液滴を形成するかどうかについて、MBs 形成のイメージング解析を行った結果、さまざまな刺激依存的に MBs が形成されることが明らかとなった。このとき、転写阻害剤処理によって MBs の形成に影響が見られたことから、MBs の形成には新生 RNA 鎖が関与していることが示唆された。MED26 の変異体を作製して液滴形成を評価したところ、液滴形成に必要な MED26 の機能部位を明らかとすることができた。さらに、独自手法を用いて MED26 の相互作用因子を網羅的に解析したところ、MED26 の新規の相互作用因子を同定することができた。また、MED26 の機能部位に点変異を導入した変異体を発現する細胞を作製し、ゲノムワイドな遺伝子発現への影響を調べたところ、野生型 MED26 発現細胞に比べて発現が変動する遺伝子群が見つかった。これらの結果は、メディエーター複合体がさまざまな因子群と相互作用しながら液滴を形成することで転写制御に機能している可能性を示唆している。近年メディエーター複合体の液滴形成が着目されているが、MED26 はメディエーター複合体の液滴形成において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。現在、MED26 の液滴形成と転写制御についてさらに詳細な解析を実施しており、その分子メカニズムを明らかにしていく予定である。

また、核内における転写制御性の液滴に関係した研究として、われわれは HeLa 細胞の HPV18 挿入部位において HPV18 由来の RNA が液滴を形成していることを明らかとした。この RNA 依存性の液滴は、Myc 遺伝子の上流領域に位置し、Myc 遺伝子のスーパーエンハンサーとして機能していることが明らかとなった。さらにこの RNA 液滴には、メディエーター複合体や RNA ポリメラーゼ II が集積していることを明らかとした。本研究成果は子宮頸がんの発症におけるがん原遺伝子の過剰活性化機構の解明につながる成果であり、国際学術誌 *Genes to Cells* に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Hidefumi, Furugori Kazuki, Abe Ryota, Ogawa Shintaro, Ito Sayaka, Akiyama Tomohiko, Horiuchi Keiko, Takahashi Hidehisa	4. 巻 45
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 -
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 Nakai Yusuke, Miyakawa Kei, Yamaoka Yutaro, Hatayama Yasuyoshi, Nishi Mayuko, Suzuki Hidefumi, Kimura Hirokazu, Takahashi Hidehisa, Kimura Yayoi, Ryo Akihida	4. 巻 10
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 ~ 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 Kitamura Koji, Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Inohara Hidenori, Kaneda Yasufumi, Takahashi Hidehisa, Nimura Keisuke	4. 巻 12
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 & Bioscience	6. 最初と最後の頁 -
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 Wada Taishi, Doi Hiroshi, Okubo Masaki, Tada Mikiko, Ueda Naohisa, Suzuki Hidefumi, Tanaka Fumiaki et al	4. 巻 95
2. 論文標題 RNA Foci in Two bi-Allelic RFC1 Expansion Carriers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 607 ~ 613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ana.26848	査読の有無 有
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19件（うち招待講演 3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, 古郡華月, 池 陽子, 安井七海, 山口雄輝, 豊田 敦, 鈴木 穰, 山本達郎, 斉藤典子, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による新規の転写スピード調節機構の解明
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

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

1. 発表者名 野口慶介, 鈴木秀文, 阿部竜太, 堀内恵子, 秋山智彦, 池 陽子, 井野陽子, 木村弥生, 梁 明秀, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 新規のin situピオチン標識法を用いたCajal body構成因子のマルチオミクス解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野口慶介, 鈴木秀文, 阿部竜太, 池 陽子, 井野洋子, 木村弥生, 梁 明秀, 土井 宏, 田中章景, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 新規ピオチン標識法を用いたマルチオミクス解析によるCajal body構成因子の網羅的解析とCajal body形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼澤理紗, 野口慶介, 仙石 徹, 緒方一博, 鈴木秀文, 高橋秀尚
2. 発表標題 LECのコンポーネントZC3H8による転写終結制御機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬目博志, 鈴木秀文, 高橋秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体の核内凝集体における転写制御機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川真太郎, 鈴木秀文, 高橋秀尚
2. 発表標題 7SK snRNAによるp-TEFb局在化阻害によるsnRNA遺伝子の転写終結制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古郡華月, 鈴木秀文, 阿部竜太, 高橋秀尚
2. 発表標題 転写バーストにおけるTFIIDのサブユニットTAF7の機能解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺内佑希, 仙石 徹, 緒方一博, 鈴木秀文, 小川真太郎, 高橋秀尚
2. 発表標題 LECのコンポーネントICE2による転写終結制御機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古郡華月, 鈴木秀文, 阿部竜太, 高橋秀尚
2. 発表標題 HPV-18産生RNAによるがん原遺伝子の転写活性化機構の解明
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古郡華月, 鈴木秀文, 阿部竜太, 高橋秀尚
2. 発表標題 HPV-18産生RNAをコアとした液滴形成によるがん原遺伝子の転写活性化機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木秀文, 阿部竜太, 池 陽子, 古郡華月, 小川真太郎, 豊田敦, 鈴木穰, 井野洋子, 木村弥生, 秋山智彦, 石川博子, 廣瀬智威, 山本達郎, 斉藤典子, 山口雄輝, 高橋秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体の液滴による転写ユニティ制御機構の解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野口慶介, 鬼澤理紗, 阿部竜太, 仙石 徹, 緒方一博, 池 陽子, 井野洋子, 木村弥生, 鈴木秀文, 高橋秀尚
2. 発表標題 LEC構成因ZC3H8によるsnRNA遺伝子の発現制御機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古郡華月, 鈴木秀文, 阿部竜太, 高橋秀尚
2. 発表標題 HPV-18産生RNAをコアとした液滴形成によるがん原遺伝子の転写活性化機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木秀文
2. 発表標題 メディアーター複合体による新規の転写スピード調節機構の解明
3. 学会等名 先進ゲノム支援2022年度拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺内佑希, 鈴木秀文, 小川真太郎, 仙石徹, 緒方一博, 高橋秀尚
2. 発表標題 LECコンポーネントICE2の機能解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤清香、鈴木秀文、高橋秀尚
2. 発表標題 DNA損傷応答におけるMED26の機能解明
3. 学会等名 第 41 回染色体ワークショップ・第 22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木秀文、阿部竜太、池陽子、古郡華月、小川真太郎、豊田敦、鈴木穰、井野 洋子、木村弥生、秋山智彦、石川博子、廣瀬智威、山本達郎、斉藤典子、山口雄輝、高橋秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体の液滴による遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第 41 回染色体ワークショップ・第 22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古郡華月、鈴木秀文、阿部竜太、高橋秀尚
2. 発表標題 HPV18産生RNAをコアとした液滴形成による がん原遺伝子の転写活性化機構
3. 学会等名 第 41 回染色体ワークショップ・第 22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------