

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590279

研究課題名(和文) E3活性を併せ持つ伸長因子Elongin Aの発生・神経形成における機能の解明

研究課題名(英文) Role of transcription factor Elongin A with E3 activity 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Elongin Aは、RNAポリメラーゼII(Pol II)の伸長促進活性とユビキチン化活性(E3)を併せ持つ転写伸長因子であるが生体内における機能は不明であった。最近我々は、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。本研究では、Elongin Aが神経堤細胞の分化を制御するSox10、Neurogenin1等の転写制御因子の発現を促進することにより、感覚神経系の形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Elongin A increases the rate of RNA polymerase II (pol II) transcript elongation by suppressing transient pausing by the enzyme. Elongin A also acts as a component of E3 ubiquitin ligase that can target stalled pol II for ubiquitylation and proteasome-dependent degradation. The functions of Elongin A in vivo remain largely unclear. Recently we found that Elongin A-deficient (Elongin A<sup>-/-</sup>) mouse embryos exhibit abnormalities in the formation of both cranial and spinal nerves and that Elongin A<sup>-/-</sup> embryonic stem cells show a markedly decreased capacity to differentiate into neurons. Here we demonstrated that Elongin A plays a critical role in the development of the sensory nervous system at least in part by regulating the differentiation processes of neural crest cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：Elongin A 転写伸長因子 ユビキチンリガーゼ 神経分化 発生

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物の転写は、開始、伸長、終結の3つのステップから成る。最近のゲノムワイドな遺伝子発現解析により、多くの遺伝子ではRNAポリメラーゼII(Pol II)が開始直後に停止して発現待機状態にあることが分かってきた。これを解除して伸長を再開するには、伸長因子という一群の転写因子の作用が必須である。同因子は、これまで20個程単離され、その内のいくつかはヒトの疾患病態(急性白血病、AIDS、Cockayne症候群等)と密接に関連することが知られている(Conaway et al. *Annu. Rev. Biochem.* 1999)。これら伸長因子の一つであるElonginは、伸長促進活性を有するA subunit、その活性を正に制御するBならびにC subunitの三量体から成る。申請者は、これまでに(1)Elongin Aホモ欠失(Elongin A<sup>-/-</sup>)マウスが、全身性の低形成のために胎生10.5日頃に致死となること(Miyata, Yasukawa et al. *Cell Death Differ.* 2007, Yasukawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007)、(2)Elongin AがUV等のDNA傷害刺激によりユビキチンリガーゼ(E3)の基質認識サブユニットとして機能し、Pol IIを認識、ユビキチン化してプロテアソームによる分解へと導くこと(Yasukawa et al. *EMBO J.* 2008)等を明らかにしてきた。最近、研究代表者は、Elongin A<sup>-/-</sup>マウス胎仔およびES細胞において、前者では動眼、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、後者ではニューロンへの分化能が顕著に損なわれていること、さらに同因子が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見いだした。しかし、(1)Elongin Aの標的遺伝子、(2)同因子欠失マウス胚に見られる神経系形成不全の原因、(3)同因子の神経の細胞分化系譜(神経幹細胞、ニューロン、グリア細胞等への分化経路)における作用点、(4)神経分化における同因子の伸長機能とE3機能の使い分け、などまだ解明すべき点も多く残っている。

### 2. 研究の目的

転写伸長因子Elongin Aの発生・神経形成における機能の解明を目指して、本研究では、Elongin A欠失による神経系の形成不全の原因の解明ならびに同因子の神経分化における標的遺伝子の網羅的解析に取り組む。

### 3. 研究の方法

#### Elongin A欠失による神経系の形成不全の原因の解明

マウス胎仔ならびに胚様体の神経系形成について免疫組織学的解析を行う。胎生9~10.5日マウス胎仔のパラフィン包埋切片を作製し、Nestin(神経幹細胞マーカー)、III-チューブリン(成熟神経細胞マーカー)、

Phospho-Histone H3(細胞増殖マーカー)の抗体による免疫染色ならびにTUNEL assay、Caspase-3抗体による細胞死の解析を行った。さらに、Elongin Aの欠失による影響を受けている細胞が神経堤、プラコードのどちらを起源とする細胞なのかを明らかにするために、神経堤細胞マーカー、プラコードマーカーの各遺伝子をプローブとして*in situ*ハイブリダイゼーションによる解析を実施した。

#### Elongin Aの神経分化における標的遺伝子の解析

(1)Elongin A<sup>-/-</sup> ES細胞由来の胚様体で、レチノイン酸による神経細胞への分化誘導後に発現の見られなかった*Neurogenin1*、*Neurogenin2*等について、レチノイン酸添加前後での各遺伝子上におけるPol IIの分布をクロマチン免疫沈降(ChIP)により調べる。野生型とElongin A<sup>-/-</sup> ES細胞を4日間浮遊培養し胚様体を形成させた後、レチノイン酸存在下でさらに4日間培養し神経細胞へ分化誘導を行い、抗Pol II抗体を用いてChIPにより解析する。

(2)神経分化における遺伝子発現の経時的变化を調べるために、野生型ならびにElongin A<sup>-/-</sup> 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分化誘導前後の胚様体よりtotal RNAを精製してRNAシーケンズ解析を行った。

ChIP用抗Elongin A抗体の作製ならびに評価Elongin Aのアミノ酸配列の親水性ならびに二次構造予測データに基づいて新たに抗原部位を6カ所選定し、当該部位のペプチドを合成してウサギを用いて抗体作製を行う。血清より抗体を精製した後、免疫染色、免疫沈降ならびにクロマチン免疫沈降によりChIPに適した抗体の選別を行った。

### 4. 研究成果

#### Elongin A欠失による神経系の形成不全の原因の解明

野生型ならびにElongin A<sup>-/-</sup>マウス胎仔を用いてホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションにより各種転写因子の発現を調べたところ、placodeマーカーの*Pax8*、自律神経系の形成に必要な*Mash1*の発現に差は認められないが、神経堤細胞マーカーの*Sox10*が脳神経節と脊髄後根神経節において、また感覚神経系の形成に必要な*Neurogenin1*ならびに*NeuroD1*の発現が三叉神経節等で顕著に減少していることが判明した(図1)。細胞増殖、細胞死について検討したが両胎仔間で有意な差は認められなかった(図2)。

また、ES細胞を用いて胚様体を形成させ、免疫組織学的解析を行ったところ、レチノイン酸による分化誘導により、野性型細胞由来の胚様体では神経前駆細胞マーカーNestinや成熟神経細胞マーカーIII-tubulinの発

現誘導され神経細胞へ分化が認められたのに対し、ホモ欠失細胞由来の胚様体では分化が見られなかった。また両胚様体共にアストロサイトマーカーのGFAP、オリゴデンドロサイトのマーカーCNPaseの発現の差異は認められなかった(図3)。

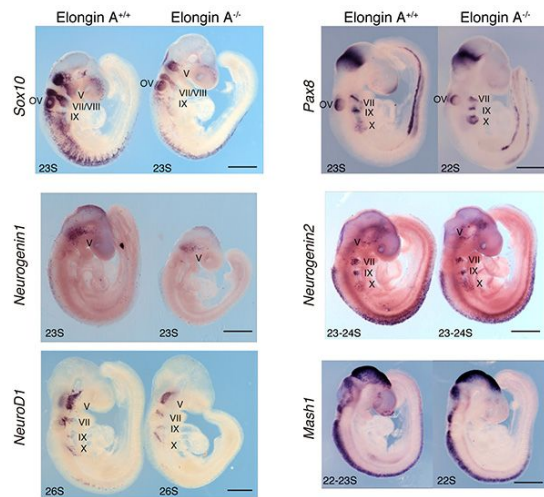


図 1

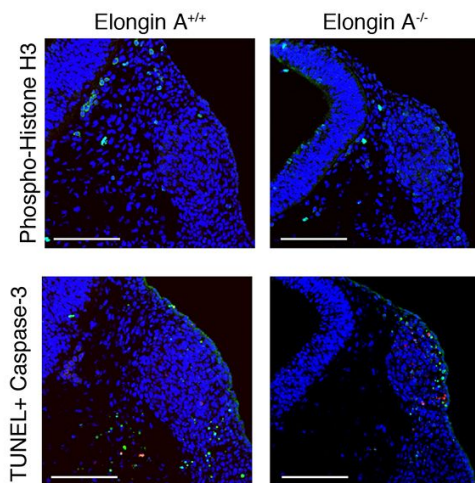


図 2

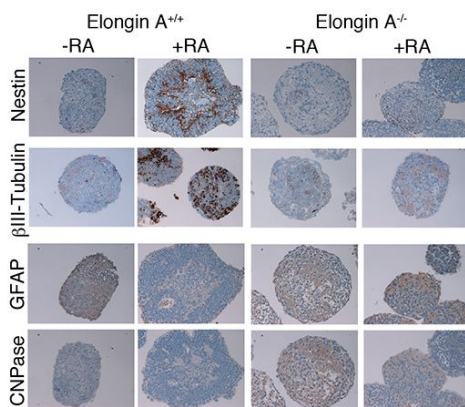


図 3

### Elongin A の神経分化における標的遺伝子の解析

(1) Elongin A<sup>-/-</sup> ES 細胞由来の胚様体で、レチノイン酸による神経細胞への分化誘導後に発現の見られなかった *Neurogenin1*、*Neurogenin2*、*Hoxa7* 遺伝子の各遺伝子上における Pol II の分布を調べたところ、野生型細胞ではレチノイン酸による分化誘導によりプロモーターならびにコーディング領域に結合した Pol II (トータルならびに Ser5リン酸化型) の顕著な増加が検出されたのに対し、ホモ欠失細胞ではレチノイン酸添加の有無にかかわらず結合はほとんど認められなかった(図4)。

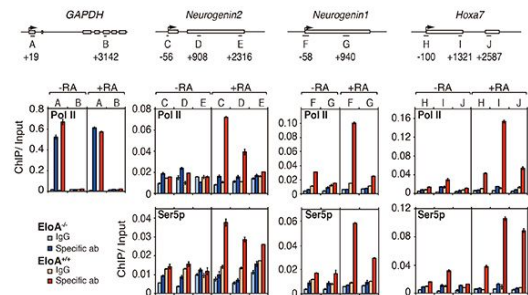


図 4

(2) non-coding RNA も含めた Elongin A の神経分化に関わる遺伝子を網羅的に調べるために、野生型ならびに Elongin A<sup>-/-</sup> ES 細胞を用いて胚様体の形成・神経分化誘導を行い、経時的に回収した胚様体より RNA を調製し RNA シークエンスを行った。その結果、Elongin A<sup>-/-</sup> ES 細胞由来の胚様体で *Neurogenin1*、*Neurogenin2* 遺伝子等の発現低下が認められるなど、先に報告したマイクロアレイの結果の再現性が得られると共に、いくつかの神経分化に関わる long non-coding RNA が Elongin A 依存的な発現を示していることが判明した。

以上のことから、Elongin A が神経堤細胞の分化を指令する *Neurogenin1* 等の転写制御因子の発現を促進することにより、感覚神経系の形成に関与していることが示唆された (*Cell Reports* 2: 1129-1136, 2012)。

### 神経系形成における ElonginA 標的遺伝子の解析のための ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンス用抗体の作製

これまで ChIP に適した抗 Elongin A 抗体がなかったので、Elongin A のアミノ酸配列の親水性ならびに二次構造予測データに基づいて新たに抗原部位を 6 カ所選定(図5)し、

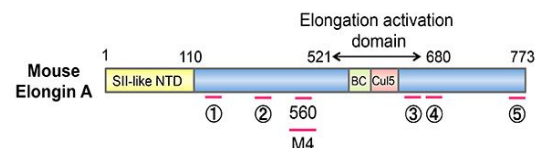


図 5

当該部位のペプチドを合成してウサギを用いて抗体作製を行った。血清より抗体を精製した後、免疫染色、免疫沈降により ChIP 用抗体の選別を行い、候補として 4 種類の抗体を得た(図 6)。

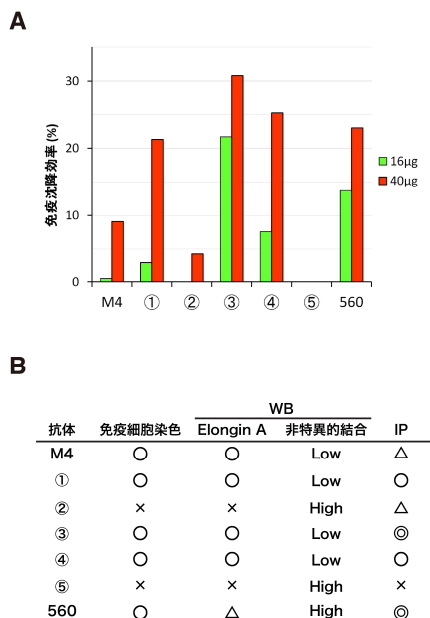


図 6

さらに、FLAG-Elongin A をトランスフェクションした細胞を用いて UV 照射前後の細胞よりクロマチンを調製し ChIP を行い、Elongin A と Pol II の共沈が増強することを指標により ChIP に適した抗体の絞り込みを行った。その結果 2 種類の抗体が、効率よく Pol II を共沈出来ることが判明した(図 7)。

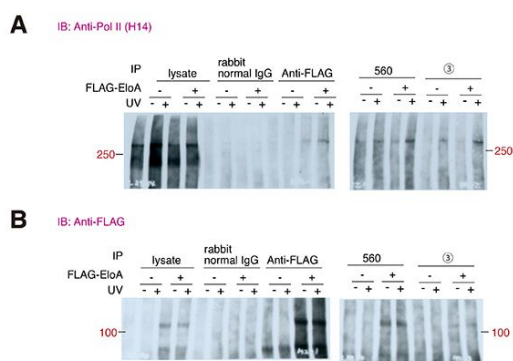


図 7

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Transcriptional properties of mammalian Elongin A and its role in stress response

Kawauchi J, Inoue M, Fukuda M, Uchida Y, Yasukawa T, Conaway RC, Conaway JW, Aso T, and Kitajima S

*J Biol Chem.* 288 (34): 24302-24315, 2013  
査読有 DOI:10.1074/3bc.M113.496703

Transcriptional elongation factor Elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation

Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, and Aso T

*Cell Reports* 2 (5): 1129-1136, 2012 査読有 DOI:10.1016/j.celrep.2012.09.031

〔学会発表〕(計 5 件)

安川 孝史, 筒井 文, 村岡 拓也, 佐藤 チエリ, 佐藤 滋生, Ronald C Conaway, Joan W Conaway, 北嶋 繁孝, 麻生 悌二郎 転写伸長因子 Elongin A の標的遺伝子の網羅的探索 第 37 回日本分子生物学会年会 2014.11.25 - 2014.11.27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

安川 孝史, 村岡 拓也, 筒井 文, 佐藤 チエリ, 佐藤 滋生, 川内 潤也, 井上 允, 北嶋 繁孝, Ronald C Conaway, Joan W Conaway, 麻生 悌二郎 感覚神経系の発生・分化における Elongin A の標的遺伝子の同定 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15 - 2014.10.18 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

井上 允, 川内 潤也, 安川 孝史, Ronald C Conaway, Joan W Conaway, 麻生 悌二郎, 北嶋 繁孝 ストレス応答における mammalian Elongin A の特徴と役割 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15 - 2014.10.18 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T Role of transcription elongation factor Elongin A in the sensory nervous system development 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11 - 2012.12.14 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

Inoue M, Kawauchi J, Yasukawa T, Aso T, Kitajima S Transcriptional properties of mammalian Elongin a and its role in stress response 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11 - 2012.12.14 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

## 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