

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689016

研究課題名(和文)新規転写伸長制御因子MED26の標的遺伝子解明と急性白血病への関与についての解析

研究課題名(英文)Functional analysis of transcription elongation regulatory factor Med26

研究代表者

高橋 秀尚(Takahashi, Hidehisa)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNAからなる遺伝子の情報はRNAポリメラーゼII(Pol II)によってRNAに転写されます。Pol IIがRNAを転写伸長するプロセスにおいて、さまざまな要因で一時停止することがわかっています。一時停止したPol IIがRNA合成を再開するためには、転写伸長因子の働きが必要です。本研究によって、メディエーターと呼ばれる転写複合体が、その構成因子のMed26によって、転写伸長因子複合体をさまざまな遺伝子領域に引き寄せ、それらの遺伝子の発現を促進することが明らかとなりました。また、本研究によってMed26は、がんや急性白血病の原因となっていることも予想されます。

研究成果の概要(英文)：Regulation of transcription elongation by RNA polymerase II (Pol II) is a key regulatory step in gene transcription. We showed that the human Mediator subunit MED26 plays a role in the recruitment of transcription elongation complexes, SEC and LEC to the different types of genes. It has been reported that the expression of many genes is strictly controlled and that the dysregulation of the gene expression often causes cancers or leukemias. Since MED26 also regulates the expression of cancer-related genes, it is possible that MED26 is one of the important molecules to regulate carcinogenesis and leukemogenesis.

研究分野：生化学

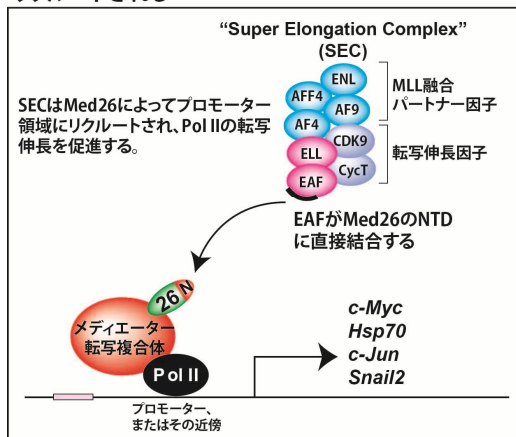
キーワード：生化学 転写 RNAポリメラーゼII 転写伸長

1. 研究開始当初の背景

Pol II による遺伝子の発現制御は、転写の開始、伸長、そして終結の主に3つのプロセスからなる。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)で一時的に停止(ポーズ)していることが明らかになり、遺伝子発現の制御で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。この現象は原がん遺伝子 *c-Myc* や *Fos*、熱ショック遺伝子 *Hsp70* において発見された。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領域にリクルートされるのかについて、明らかとなっていなかった。

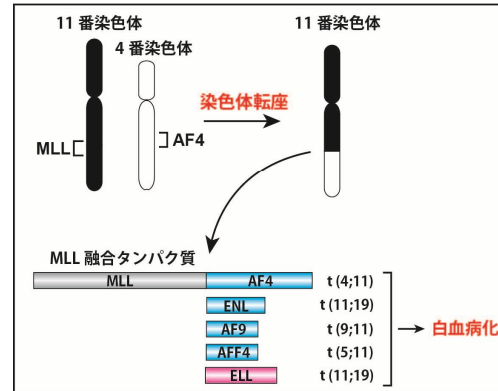
このような背景で、私はメディエーター転写複合体が、そのサブユニット Med26 の N 末端ドメイン(NTD)によって、転写伸長因子を含むタンパク質複合体 Super elongation complex (SEC) を *c-Myc* や *Hsp70* 遺伝子のプロモーター領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを発見した【Takahashi H, et al. *Cell* 2011】(図1参照)。

図1: 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



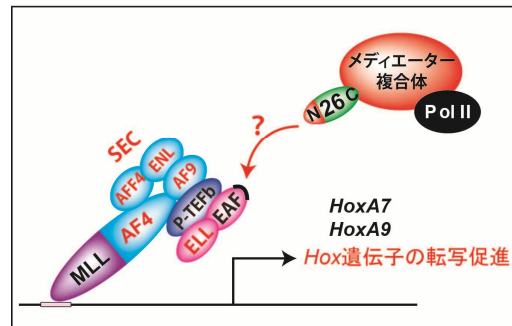
さらに、私はこれまでに、SEC が転写伸長因子の ELL/EAF、P-TEFb に加え MLL 融合パートナー因子と呼ばれる AF4、AFF4、AF9 や ENL をサブユニットとして有することを明らかとした【Lin C, Takahashi H, et al. *Mol Cell* 2010】。非常に興味深いことに、SEC のサブユニットの ELL、AF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子と混合型急性白血病で高頻度に染色体転座がみられる(図2参照)。さらに、最近の研究で、転座の結果生じた MLL 融合タンパク質によって SEC が *Hox* 遺伝子などの白血病関連遺伝子領域に異常にリクルートされ、その遺伝子の発現を亢進させることが混合型急性白血病的発症メカニズムの1つであることがわかった。このこ

図2: 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



とから、混合型急性白血病においては、メディエーター複合体が Pol II と共に (Med26 と SEC との結合を介して) *Hox* 遺伝子などの白血病関連遺伝子領域にリクルートされ、それらの発現を亢進させている可能性が考えられる(図3参照)。

図3: Med26が混合型急性白血病(MLL)の発症メカニズムに関与している可能性



さらにマイクロアレイを用いた解析によって、Med26 は *c-Myc* や *Hsp70* だけではなく *c-Jun* などのがん関連遺伝子、上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) やがん転移に関連する *Snail2* の発現にも必要であることがわかってきた【Takahashi H, et al. *Cell* 2011】。

2. 研究の目的

本研究では、Med26 がどのような遺伝子領域に SEC をリクルートし、Pol II のポーズを解除するのかを網羅的に解明することを目的とする。さらに、Med26 の生理的役割を明らかにし、がんや白血病などの腫瘍性疾患にどのように関わっているのかを明らかにする。また、Med26 によってリクルートされるもう一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) の機能解明を目指す。

(1) Med26 がどのような遺伝子群に SEC をリクルートし、Pol II ポーズの解除の役割を果たすのかを ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンス解析によって網羅的に明らかにする。

(2) Med26 のノックアウトマウスを作製し、Med26 の生理的役割を明らかにする。

(3) Med26 が混合型急性白血病の発症メカニズムに関与しているのかを明らかにする。

(4) Med26 によってリクルートされるもう一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) の標的遺伝子と、その転写における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Med26 がどのような遺伝子領域に SEC や LEC をリクルートし、Pol II ポージングの解除の役割を果たすのかを明らかにするため、ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンス解析を行う。

Med26 がどのような遺伝子領域に存在するのかを Med26 の ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンス解析を行い明らかにする。

Med26 の発現をノックダウン (RNAi) あるいはノックアウト (gene targeting) した細胞とコントロールの細胞を用いて、SEC や LEC のサブユニット (AFF4 や KIAA0947) の ChIP シークエンス解析を行い、Med26 がどのような遺伝子領域に SEC や LEC をリクルートするのかを網羅的に明らかにする。

(2) Med26 のノックアウトマウスを作製し、Med26 の生理的役割を明らかにする。

Med26 のノックアウトマウスを作製し、その表現型の解析を行い、Med26 の生理的役割を明らかにする。

Med26 のホモのノックアウトマウスを作製後に、Med26 を欠失したマウス胎児由来の線維芽細胞 (MEF) を樹立し、その細胞を用いてマイクロアレイなどの遺伝子発現解析や ChIP シークエンス解析 (SEC や Pol II) をを行い、Med26 の細胞内での役割をより明確に解明する。

(3) Med26 が混合型急性白血病の発症メカニズムに関与するのかを明らかにする。

野生型の MLL を発現する細胞 (REH 細胞) と MLL-SEC サブユニットの融合タンパク質を発現する混合型の急性白血病細胞 (RS4-11 細胞: MLL-AF4 を発現) を用いて ChIP 解析を行い、Med26 を含むメディエーター転写複合体が Pol II と共に *HoxA7* や *HoxA9* の遺伝子領域に異常にリクルートされているのかどうかを明らかにする。

混合型急性白血病細胞で Med26 をノックダウンした場合に、その白血病化能や *Hox* 遺伝子の発現が減少するかどうか、さらに *Hox* 遺伝子領域にリクルートされるメディエーター転写複合体や Pol II の量が減少するかどうかを、骨髄系前駆細胞トランスフォーメーション解析や ChIP 解析を行い明らかにする。

(4) Med26 によってリクルートされるもう

一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) の機能を明らかにする。

私はプロテオミクス解析によって、Med26 の N 末端ドメイン (NTD) と相互作用する転写伸長因子複合体として SEC に加え、Little elongation complex (LEC) も同定した。LEC は転写伸長因子の ELL/EAF に加えて KIAA0947 と NARG2 (NMDA receptor-regulated 2) の 4 つのサブユニットからなる機能未知の複合体である。本研究では LEC の機能や、LEC が Med26 によってどのような遺伝子群にリクルートされるのかを明らかにする。

LEC をバキュロウイルス発現系によって再構成し、LEC が Pol II の転写伸長活性を増強するかどうか、機能未知のサブユニット KIAA0947 や NARG2 がどのようなメカニズムで Pol II の転写伸長活性に作用するのかを、*in vitro* で Pol II の転写伸長反応を行い明らかにする。

Med26 によって LEC はどのような遺伝子領域にリクルートされるのかを、LEC のサブユニット KIAA0947 の ChIP シークエンス解析を行い明らかにする。

4. 研究成果

(1) Med26 の ChIP (クロマチン免疫沈降) シークエンス解析を行い、Med26 が存在する遺伝子領域を網羅的に明らかにした。

さらに、Med26 の発現をノックダウン (RNAi) した細胞とコントロールの細胞を用いて、SEC のサブユニット AFF4 と LEC のサブユニット KIAA0947 の ChIP シークエンス解析を行い、Med26 がどのような遺伝子領域に SEC や LEC をリクルートするのに関して、解析を行った。すると、Med26 は LEC を核内低分子 RNA (*small nuclear RNA*, *snRNA*) 遺伝子領域にリクルートし、*snRNA* 遺伝子の発現を制御することが明らかとなった【Takahashi H, et al. *Nature communications* 2015】。

(2) Med26 の生理的役割を明らかにするために、Med26 のノックアウトマウスを作製したところ、ノックアウトマウスは胎生早期に致死であることが判明した。さらに、Med26 の転写における役割を解明するために、Med26 を欠失したマウス胎児由来の線維芽細胞 (MEF) を樹立した。現在、Med26 ノックアウト線維芽細胞を用いて RNA シークエンス解析を行っており、Med26 の遺伝子発現制御における役割の解明を目指す。

(3) Med26 が混合型の急性白血病の発症メカニズムに関与しているのかを明らかにするために、野生型の MLL を発現する細胞 (REH 細胞) と MLL-SEC サブユニットの融合タンパク質を発現する混合型の急性白血病細胞 (RS4-11 細胞: MLL-AF4 を発現) を用いて Med26 の ChIP 解析を行った。現

在、Med26 を含むメディエーター複合体が Pol II と共にどのような白血病関連遺伝子領域にリクルートされるのかに関して、網羅的な解析を行っている。

(4) Med26 によってリクルートされるもう一つの転写伸長因子複合体 Little elongation complex (LEC) の機能を明らかにするために、Med26 の発現をノックダウン (RNAi) した細胞とコントロールの細胞を用いて、LEC のサブユニット KIAA0947 の ChIP シークエンス解析を行った。すると、Med26 は LEC を核内低分子 RNA (*small nuclear RNA*, *snRNA*) 遺伝子領域にリクルートし、*snRNA* 遺伝子の発現を制御することが判明した【Takahashi H, et al. *Nature communications* 2015】。

さらに、LEC をバキュロウイルス発現系によって再構成し、LEC が Pol II の転写伸長活性を増強するかどうかを解析したところ、LEC は *in vitro* で Pol II の転写伸長活性を増強することがわかった。

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8件)

1. Watanabe M, Takahashi H, Saeki Y, Ozaki T, Itoh S, Suzuki M, Mizushima W, Tanaka K, Hatakeyama S.: The E3 ubiquitin ligase TRIM23 regulates adipocyte differentiation via stabilization of the adipogenic activator PPAR γ . *Elife*, 23:4. 2015, doi: 10.7554/eLife.05615. (査読有)
2. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Terry P, Yamaguchi, Ohba Y, and Hatakeyama S.: Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol*, 35(11):2007-2023, 2015, doi:10.1128/MCB.00159-15. (査読有)
3. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, *Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nat Commun*, 5:5941, 2015, doi: 10.1038/ncomms6941. (査読有)
4. Yabe I, Tanino M, Yaguchi H, Takiyama A, Cai H, Kanno H, Takahashi I, Hayashi Y, Watanabe M, Takahashi H, Hatakeyama S, Tanaka S, *Sasaki H.: Pathology of frontotemporal dementia with limb girdle muscular dystrophy caused by a DNAJB6 mutation. *Clin Neurol Neurosur*, 127:10-12, 2014, doi: 10.1016/j.clineuro. (査読有)
5. Sato T, Takahashi H, Hatakeyama S., Iguchi A. and Ariga T.: The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene*, 34(10):1280-1291, 2015, doi: 10.1038/onc.2014.68. (査読有)
6. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Okumura F, Takeuchi A, Horiuchi K, Kano T, Kanda A, Saito W, Matsumoto M, Nakayama KI, Hatakeyama S, *Sasaki H.: Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J Neurol*, 261(1):224-226, 2014, doi: 10.1007/s00415-013-7134-5. (査読有)
7. 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.: Transcriptional Elongation Factor Elongin A Regulates Retinoic Acid-Induced Gene Expression during Neuronal Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Rep*, 29:2(5):1129-1136, 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.031. (査読有)
8. Yaguchi H, Okumura F, Takahashi H, Kano T, Kameda H, Uchigashima M, Tanaka S, Watanabe M, Sasaki H, *Hatakeyama S.: TRIM67 protein negatively regulates Ras activity through degradation of 80K-H and induces neuritogenesis. *J Biol Chem*, 287(15):12050-12059, 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.307678. (査読有)

[学会発表](計7件)

1. 高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Delnur Anwar, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Amol Ranjan, Chris W. Seidel, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山鎮次, メディエーター複合体による転写伸長制御, 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川県・横浜市, 2014.

11.25-27

2. 高橋秀尚, 瀧川一学, 渡部昌, Anwar Delnur, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Seidel Chris, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Conaway Joan, Conaway Ronald, 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, 第 87 回日本生化学会, 国立京都国際会館, 京都府京都市, 2014. 10.15-18
3. 高橋秀尚, 瀧川一学, Delnur Anwar, 柴田美音, 佐藤チエリ, 佐藤滋生, Ranjan Amol, Chris W. Seidel, 築山忠維, 渡部昌, 林正康, 大川恭行, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 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, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸ポートピアホテル, 兵庫県・神戸市, 2013.12.3-5.
4. Hidehisa Takahashi, Chieri Tomomori-Sato, Shigeo Sato, Amol Ranjan, Masayasu Hayashi, Yasuyuki Ohkawa, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama.: Human Mediator subunit Med26 regulates the transcription of small nuclear RNA genes through the recruitment of little elongation complex. Mechanism of eukaryotic transcription, Cold spring harbor meeting, NY, USA, 2013.8.27-30
5. 高橋秀尚, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 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, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡県・福岡市, 2012. 12. 14-16.
6. 榎田安志, 高橋秀尚, 畠山鎮次, TRIM29 による TRRAP/Tip60 複合体の機能制御とがん化との関わり, 第 85 回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡県・福岡市, 2012. 12. 14-16.
7. 高橋秀尚, 佐藤智信, Conaway, J.W., Conaway, R.C., 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, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, マリンメッセ福岡, 福岡県・福岡市, 2012. 12. 11-14.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/d20505/takahashi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀尚 (TAKAHASHI HIDEHISA)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30423544