

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22401

研究課題名（和文）メディエーター複合体による液相形成とその転写制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of liquid phase separation by Mediator complex and its role in transcription regulation

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：最近の研究によって、RNAポリメラーゼII（Pol II）による転写が核内の区画化された液滴で行われることが明らかとなってきた。このLiquid-liquid phase separation機構においては、タンパク質やDNA、RNAなどの転写制御に関わる因子群が、複雑性の少ない領域（IDR: Intrinsically Disordered Region）で会合することによって液滴を形成すると考えられている。本研究ではメディエーター複合体による液滴形成機構とその遺伝子発現制御における役割を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究から、転写は核内に形成される“液滴”によって、制御されることが明らかとなってきた。本研究では、転写制御で重要な役割を果たすメディエーター複合体に着目し、その液滴形成機構と転写制御における役割を解明する。本研究によって、転写制御機構における液滴の役割を詳細に解明することで、DNA複製・修復、細胞内シグナル伝達などの他の細胞機能における液滴機構の解明にも貢献することが期待される。さらに、メディエーター複合体は様々な疾患の発症にも関与していることから、本研究は液滴形成の破綻による疾患発症メカニズムの解明にもつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent studies revealed that transcription by RNA polymerase II (Pol II) is regulated within compartmentalized liquid droplets. In this mechanism called liquid-liquid phase separation, factors involved in transcription regulation including proteins, DNA, and RNA are associated through intrinsically disordered Region (IDR) to form liquid droplets. In this study, we elucidate the mechanism of liquid droplets formation by Mediator complex and its role in transcription regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写 RNAポリメラーゼII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内には膜構造がないにも関わらず、ユークロマチン、ヘテロクロマチン、核小体、Cajal ボディ、speckles といった領域が区画化されている。最近、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写の各プロセスが区画化された液滴内で行われる液滴機構 (Liquid-liquid phase separation model) が提唱されている。液滴機構においては、タンパク質や DNA、RNA などの転写制御に関わる因子群が、複雑性の少ない領域 (IDR: Intrinsically Disordered Region) を介して会合することによって、液滴を形成すると考えられている。実際に、転写共役因子として機能するメディエーター複合体は液滴形成に関与することが示唆されている。

細胞外の刺激によってシグナル伝達が引き起こされると、核内では 転写開始前複合体の形成、転写開始、転写伸長、転写終結、さらに RNA プロセッシング (キャッピング、スプライシング、ポリ A 付加) のプロセスが進行し、RNA が合成される。最近、この転写プロセスに液滴機構が関与していることが示唆されている (図 1)。

われわれはこれまでの研究で、メディエーター複合体が、Super elongation complex (SEC) や Little elongation complex (LEC) の 2 つの異なる転写制御因子複合体をリクルートすることで、それぞれ異なる遺伝子の転写を促進することを解明した。また、最近のわれわれの解析で、メディエーター複合体は SEC を mRNA にポリ A があるような *c-Myc* や *Hsp70* などの遺伝子領域にリクルートし、LEC を mRNA にポリ A がない遺伝子領域 (small nuclear RNA や複製依存性ヒストン遺伝子など) にリクルートすることで、それらの遺伝子の転写伸長や終結を制御することがわかってきた。これらのことから、メディエーター複合体は液滴を形成し、Pol II の転写開始から伸長、終結まで統合的に制御する可能性が浮かび上がってきた。

2. 研究の目的

本研究では (i) メディエーター複合体の液滴構成因子の網羅的同定、(ii) メディエーター複合体による液滴形成機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(i) メディエーター複合体の液滴構成因子の網羅的同定

本研究では、液滴の遺伝子発現制御における役割を明らかにするために、Mediator と LEC が共役して転写を制御する場の Cajal ボディに着目し、その構成因子の網羅的同定法の確立を行う。

(ii) メディエーター複合体による液滴形成機構の解明

IDR を有する Mediator のサブユニットに GFP タグを付し、それらのリコンビナントタンパク質を作製し、試験管内で液滴を形成するののかについて解明する。さらに、それらを細胞内で発現させ、fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 解析を行い、液滴の分子拡散を計測する。

4. 研究成果

本研究では、液滴の遺伝子発現制御における役割を明らかにするために、Mediator と LEC が共役して転写を制御する場の Cajal ボディに着目し、その構成因子の網羅的同定法の確立を行った。本手法の確立において、プロテオミクス、イメージング、ゲノミクスの計測技術を組み合わせ、遺伝子発現制御機構の新たな観点からの解明を目指した。Cajal ボディ構成因子を網羅的に同定するために、Cajal ボディのマーカータンパク質である Coilin の抗体を用いて、Cajal ボディ近傍の (半径 20 nm 以内) タンパク質を in situ で

図 1: 細胞外からの刺激にตอบสนองして、転写の各プロセスが液滴内で行われ進行する

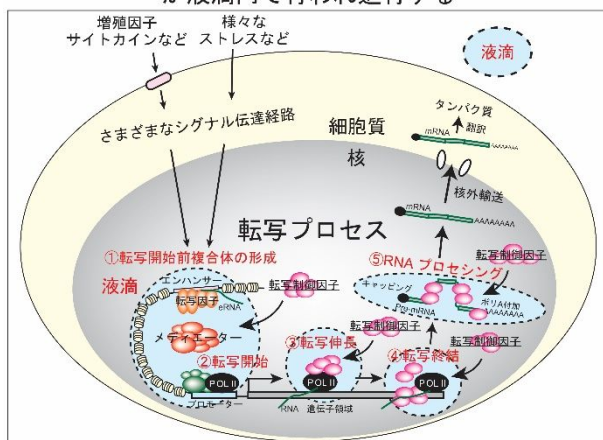
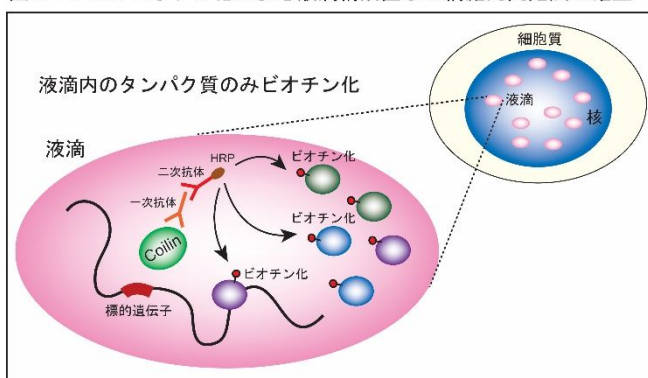


図 2: in situ ビオチン化による液滴構成因子の網羅的同定法の確立



ビオチン化した。ビオチン化されたタンパク質を、アビジンビーズを用いて精製し、質量分析計を用いて網羅的に同定した。さらに、Cajal ボディに含まれるゲノム DNA 領域や non-coding RNA も同定するために、ビオチン化タンパク質と共精製される DNA と RNA 成分も次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した（図 2 参照）。本研究によって、Cajal ボディの構成タンパク質が網羅的に同定された。さらに、Cajal ボディに含まれるゲノム DNA 領域も同定された。Cajal ボディに含まれる non-coding RNA も網羅的に同定され、Cajal ボディ形成機構の一端が明らかとなってきた。興味深いことに、Cajal ボディ構成タンパク質として神経変性疾患に関与するタンパク質群が多く同定された。これらの研究成果に関して、現在、論文投稿の準備を行っている。今後、Cajal ボディの機能破綻と神経変性疾患の発症メカニズムとの関連を解明することが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki K*, Kojitani N, Hirose H, Yoshihama Y, Suzuki H, Shimada M, Takayanagi A, Yamashita A, Nakaya M, Hirano H, Takahashi H*, Ohno S*.	4. 巻 31(1)
2. 論文標題 Shank2 binds to aPKC and controls tight junction formation with Rap1 signaling during establishment of epithelial cell polarity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 107407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.02.088	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 Takahashi H*, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama I. K, Washburn P. M, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway C.R, Conaway W.J*, Hatakeyama S*.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14849-1	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 Miyake N, Takahashi H, Nakamura K, Isidor B, Hiraki Y, Koshimizu E, Shiina M, Sasaki K, Suzuki H, Abe R, Kimura Y, Akiyama T, Tomizawa SI, Hirose T, Hamanaka K, Miyatake S, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Obo K, Kato M, Ogata K, Matsumoto N.	4. 巻 106(1)
2. 論文標題 Gain-of-Function MN1 Truncation Variants Cause a Recognizable Syndrome with Craniofacial and Brain Abnormalities.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 13-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajhg.2019.11.011	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 秀尚, Amol Ranjan, 鈴木 秀文, 阿部 竜太, 廣瀬 智威, 佐々木 和教, 山口 雄輝, 中山 敬一, Joan Conaway, Ronald Conaway, 畠山 鎮次
2. 発表標題 メディエーター複合体による転写終結制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 秀文, 阿部 竜太, 安井 七海, 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーターは2つの異なる核内凝集体を結びつけることによって転写終結を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 美穂, 中太 智義, 高橋 秀尚, Robert G.Roeder
2. 発表標題 クロマチン構造変換を伴った遺伝子発現制御機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 秀尚
2. 発表標題 メディエーター複合体による転写制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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