

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570162

研究課題名（和文）新規 RNA ポリメラーゼ II 結合因子による遺伝情報発現の協調的制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism by which novel phosphorylated RNA polymerase II-interacting factors coordinate processes required for gene expression

研究代表者

広瀬 豊 (HIROSE YUTAKA)

富山大学大学院・医学薬学研究部（薬学）・准教授

研究者番号：00218851

研究成果の概要（和文）：RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は、DNA 遺伝情報を RNA に転写する酵素である。Pol II の C-末端領域 (CTD) は転写中にリン酸化され、遺伝子発現調節に重要な役割を果たしている。近年私は、リン酸化 CTD に特異的に結合する新規ヒト因子 PCIF1 を同定した。本研究では、PCIF1 の遺伝子発現調節における機能を解析した。その結果 PCIF1 は、転写初期段階の Pol II に遺伝子プロモーター近傍で結合し、Pol II のリン酸化状態を制御していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：RNA polymerase II (Pol II) copies genetic information from DNA to RNA. The carboxy-terminal domain (CTD) of Pol II is subjected to reversible phosphorylation during transcription cycle and plays an important role in gene expression. Recently, I identified a novel human protein PCIF1 as a phosphorylated CTD-interacting protein. In this study, I investigated PCIF1's function in gene expression. My data suggests that PCIF1 binds Pol II at promoter region during early phase of transcription cycle and modulates phosphorylation level of the CTD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子発現調節、転写、RNA ポリメラーゼ II、リン酸化、WW ドメイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞生物において、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は、細胞周期、細胞外シグナル、発生・分化のプログラムに応じて全てのタンパク質遺伝子の DNA 情報を RNA に転写している。RNA に転写された遺伝情報は、転写後 mRNA プロセッシング、核外輸送、翻訳といった段階を経て発現する。近年の研究から Pol II は転写調節因子と相互するだけでなく、様々な転写後過程の調節因子と直接相

互作用しながら転写を行っており、転写と転写後過程は Pol II を介して密接に連携していることが明らかとなった。このような遺伝子発現の協調的制御における Pol II の機能は、Pol II 最大サブユニットのカルボキシル末端領域 (CTD) のリン酸化および構造変換によって調節されている。CTD は進化的に良く保存された 7 アミノ酸配列 (Y-S-P-T-S-P-S) の繰り返しから成る特徴的なドメインで、主に 2 番目 (Ser2) および

5 番目 (Ser5) のセリンが転写中にリン酸化を受ける。転写サイクルに応じた Ser2 および Ser5 のダイナミックなリン酸化パターンの変化は、転写の各段階で必要とされるヒストン修飾因子や RNA プロセッシング因子など様々な因子の転写伸長装置への結合を制御している。したがって CTD のリン酸化や構造変化を制御している因子を同定し、それらの作用機序を解析することは、遺伝子発現過程を協調的に制御している核内分子機構を解明するために非常に重要であると考えられる。

(2) 私は近年、新規因子 PCIF1 (Fan. et al., BBRC, 301, 378-385, 2003)、プロリルイソメラーゼ Pin1、酸化還元酵素様がん抑制遺伝子候補産物 WWOX といったヒト WW ドメイン蛋白質が、WW ドメインを介してリン酸化 CTD に直接結合出来ることを見いだした。PCIF1 は高等真核生物に特異的なタンパク質で、マウスではほとんどすべての組織で発現がみられる。これまでの解析から PCIF1 はリン酸化 Ser5 に特異的に結合することを見出しているが、PCIF1 の遺伝子発現調節における機能の詳細は明らかになっていない。またプロリルイソメラーゼ Pin1 は、細胞周期調節因子として同定された因子で、標的蛋白質の pS/T-P のプロリン異性化促進を介して標的因子の活性を調節している。近年 Pin1 は、がん発症や神経疾患との関わりで注目され、がん治療の標的遺伝子としても期待されている。私はこれまでに、Pin1 が細胞周期 M 期において Pol II の活性を抑制的に制御していることを米国のグループとの共同で報告した (Xu. et al., Genes & Dev., 17, 2765-2776, 2003)。しかしリン酸化 CTD を介した遺伝子発現調節における Pin1 の役割についてはいまだ不明な点が多い。また WWOX は、16 番染色体上の様々ながん高頻度に欠失のみられる不安定な領域に存在するがん抑制遺伝子で、様々ながん細胞で WWOX 発現の減少・消失が観察されている。WWOX は細胞質に存在すると考えられているが、性ホルモン刺激などに応答して核内に移行することが報告されている。これまでの予備的な解析結果から、WWOX が Pol II に特異的に結合しうることを示唆する結果を得ている。さらにこれら 3 種類の CTD 結合蛋白質が、mRNA 3' 末端生成因子を含む様々な mRNA プロセッシング因子とも相互作用出来ることを示す予備的な解析結果を得ている。これらの知見は、同定した CTD 結合因子が、転写と mRNA プロセッシングのカップリングに関与している可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は CTD を介した遺伝子発現過程

の協調制御システムを解明するために、私が近年同定した新規リン酸化 CTD 結合蛋白質 (PCIF1、Pin1、WWOX) が、Pol II の機能調節においてどのような役割を果たしているか、またそれらが転写と RNA プロセッシングのカップリングに関与しているかを生化学的、細胞生物学的、遺伝学的に解析することを目的としている。

(2) 具体的には以下のことを明らかにしたい。PCIF1、Pin1 および WWOX が、① Pol II による転写を調節する活性を持っているか？② 転写サイクルのどの段階または転写される遺伝子のどの領域で Pol II と結合するか？③ Pol II のリン酸化やユビキチン化といった翻訳後修飾または安定性を調節しているか？④ 細胞内で Pol II を含めどのような蛋白質と相互作用しているか？⑤ 恒常的な mRNA プロセッシングまたは選択的スプライシングや選択的ポリ (A) 付加に関与するか？⑥ 転写と RNA プロセッシングのカップリングに関与しているか？

## 3. 研究の方法

(1) 新規因子 PCIF1、Pin1 および WWOX が Pol II を含めどのような蛋白質と細胞内で相互作用しているかを検索した。

① ヒト PCIF1、Pin1、WWOX、YAP1 および PQBP1 の WW ドメインを GST 融合タンパク質として大腸菌で発現・精製した。精製した GST-WW タンパク質と HeLa 細胞の総抽出物をもちい GST プルダウン法により結合因子の検索を行った。

② PCIF1 含むヒト細胞内複合体の精製・同定を試みるため、IBA 社の One-STrEP™ アフィニティー精製タグをそれぞれの因子の C-末端側に付加した蛋白質を発現するヒト安定細胞株を樹立した。なお誘導性遺伝子発現をおこなえる安定細胞株を樹立するために、Invitrogen 社の Flp-In TRex システムを利用した。融合蛋白質の発現レベルを、添加するテトラサイクリンの量を調節することによって内在性の蛋白質と同等レベルに調節し、その細胞抽出物より One-STrEP™ タグアフィニティー精製によって PCIF1 を含む細胞内複合体の精製をおこなった。精製した分画を、SDS-PAGE により分離し、トランスジェーンを持たない細胞株との比較をおこない、特異的なバンドを切り出し質量分析による質量タグ法を用いた蛋白質同定を試みた。またウエスタンブロットによって候補タンパク質の共沈の確認を行った。

(2) 高頻度相同組換えをおこなうトリ B 細胞株 DT40 を使い、Pin1、PCIF1、および

WBOX の遺伝子ノックアウトをこころみた。PCIF1 に関しては、テトラサイクリン受容体蛋白質が高発現している DT40 細胞株である DT40 tet-off 細胞を親細胞株として、ホモノックアウト DT40 細胞株および遺伝子発現をオフに出来るコンディショナルノックアウト細胞株をすでに樹立しているが、今回 DT40 野生株を出発細胞株として新たにトリ PCIF1 遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立した。以下の点について遺伝子ノックアウトによる影響を検討した。(A) 細胞全体の Pol II のリン酸化状態および安定性。(B) 特定の内在性遺伝子の発現レベル。

(3) HeLa 細胞において PCIF1 特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)解析をおこない、恒常的に発現する遺伝子(GAPDH, PPIA)および誘導性の遺伝子(c-fos)における PCIF1 の分布をリン酸化 Pol II の分布と比較した。

(4) ヒト HeLa 細胞で、PCIF1 に対する siRNA 導入によって PCIF1 遺伝子ノックダウンを行い、(A) 様々な転写活性化ドメインによるレポーター遺伝子の転写活性化、(B) 特定の遺伝子上に存在する Pol II の分布およびリン酸化 Pol II の分布状態、および(C) 特定の内在性遺伝子の発現レベル、が影響を受けるかを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 相互作用因子の検索

① GST-WW ドメインタンパク質をもちいた GST プルダウン解析の結果、PCIF1、Pin1、WBOX の WW ドメインは HeLa 細胞抽出物からリン酸化 Pol II を特異的に沈降させた。PCIF1 と Pin1 の WW ドメインは、ノコダゾール処理した HeLa 細胞抽出物から転写伸長因子 DSIFp160 を沈降させた。さらに Pin1 や WBOX の WW ドメインによって転写制御に関わる複数の核内複合体の構成因子が沈降した。興味深いことに mRNA 前駆体ポリ(A)付加酵素複合体の構成因子が WBOX の WW ドメイン特異的に沈降した。新たに同定した WBOX および Pin1 の標的因子・複合体の候補は、遺伝子発現制御に関わる核内複合体であった。今回の結果は、これら癌関連因子による細胞癌化への関与のメカニズムを解明する上で新たな知見を与えるものと期待される。

② One-STrEP™ アフィニティータグを利用した PCIF1 結合因子検索の結果、Pol II の大半のサブユニットが質量分析によって同定された。またウエスタンブロットによって結合している Pol II はすべてリン酸化型であることが判明した。Pol II 以外のタンパク質は同定できなかった。

(2) ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いた細胞機能検索

① PCIF1 ノックアウトによる細胞全体の Pol II リン酸化状態および細胞増殖能の変化は観察されなかった。ホモノックアウト細胞株は野生株に比べ、ニワトリ Pin1 の発現が約 2 倍上昇していた。独立して樹立した 2 種類の PCIF1 ホモノックアウト DT40 細胞株において、いずれも Pin1 の発現上昇が観察された。しかし PCIF1 のレスキューによって Pin1 の発現レベルはもとに戻らなかった。

② コンディショナルノックアウト DT40 細胞株における PCIF1 の消失に伴い、4 種類の恒常発現遺伝子の発現亢進と、逆に Notch シグナルの標的遺伝子の発現低下が観察された。

(3) HeLa 細胞を用いたクロマチン免疫沈降解析の結果、恒常的に発現している Pol II 遺伝子においても、また誘導性の遺伝子においても同様に PCIF1 の分布は、プロモーター近傍に集中し、Pol II の分布と類似する傾向にあることが示された。

(4) HeLa 細胞における PCIF1 ノックダウンによって、(A) 様々な転写活性化ドメインによるレポーター遺伝子の転写活性化が大きく亢進した。(B) 恒常的に発現している Pol II 遺伝子のプロモーター近傍での Ser5 のリン酸化が低下した。(C) 恒常的に発現しているいくつかの Pol II 遺伝子の発現レベルが低下または増加した。

(5) 本研究結果より、PCIF1 がプロモーター近傍でリン酸化 Ser5-Pol II と結合し、転写の開始段階から伸長段階への移行に関与している可能性が示唆された。近年のゲノムワイドな遺伝子発現研究から、転写されていない(または転写が完了していない)多くのヒト遺伝子のプロモーター近傍にも Pol II が存在しており、それらの Pol II は Ser5 がリン酸化されていることが明らかとなった。このことは、これまで考えられていたよりも多くの遺伝子が、何らかの機構でプロモーター近傍に一時停止しており、転写活性化にはこの抑制状態の解除が必要であることを示唆している。こうしたプロモーター近傍における Pol II の全般的な一時停止に PCIF1 または Pin1 が関わっている可能性を示唆している。

#### 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 Mizuki F, Tanaka A, Hirose Y, and Ohkuma Y,

A HIRA Complex Subunit Hip3 Plays an Important Role for Silencing of Meiosis-specific Genes in *Schizosaccharomyces pombe*, *PLoS One*, Vol.6, No.4, e19442, (2011) 査読有

- ② Aihara Y, Fujiwara N, Yamazaki T, Kambe T, Nagao M, Hirose Y, and Masuda S, Enhancing recombinant protein production in human cell lines with a constitutive transport element and mRNA export proteins, *J Biotechnol.*, **153**, 3-4, 86-91, (2011) 査読有
- ③ 広瀬 豊, 「RNA ポリメラーゼ II-CTD リン酸化制御による遺伝子発現過程の協調機構」生化学, **82** 巻, 3号 221-231 (2010) 査読無
- ④ Yunokuchi I, Fan H, Iwamoto Y, Araki C, Yuda M, Umemura H, Harada F, Ohkuma Y, and Hirose Y, Prolyl isomerase Pin1 shares functional similarity with phosphorylated CTD interacting factor PCIF1 in vertebrate cells. *Genes Cells*, **14**, 1105-1118, (2009) 査読有
- ⑤ 広瀬 豊, 「RNA ポリメラーゼ II-CTD リン酸化制御による転写と mRNA プロセッシングの共役」蛋白質・核酸・酵素, **54** 巻, 2080-2085, (2009) 査読無
- ⑥ Tsutsui T, Umemura H, Tanaka A, Mizuki F, Hirose Y, and Ohkuma Y, Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcriptional regulation. *Genes Cells*, **13**, 817-826, (2008) 査読有
- ⑦ Hirose Y, Iwamoto Y, Sakuraba K, Yunokuchi I, Harada F, and Ohkuma Y, Human phosphorylated CTD-interacting protein, PCIF1, negatively modulates gene expression by RNA polymerase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 449-455, (2008) 査読有
- ⑧ Hirose Y. and Harada F, Mouse nucleolin binds to 4.5S RNAh, a small noncoding RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 62-68, (2008) 査読有

[学会発表] (計 29 件)

- ① 和仁 翔太郎, 脊椎動物 CTD フォスファターゼ Ssu72 の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
- ② 石黒 尋保, リン酸 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
- ③ 熊野御堂 悠, WWOX と mRNA 前駆体ポリ(A)付加因子の相互作用, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
- ④ 大熊 芳明, メディエーター複合体の 2

種のキナーゼサブユニットによる転写活性化と抑制という正反対の機能, 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会合同年会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸

- ⑤ 広瀬 豊, 脊椎動物リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合因子 PCIF1 の機能解析, 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2010 年 11 月 29-30 日, 富山大学
- ⑥ 西谷 紗織, メディエーター複合体サブユニットの転写制御における機能解析, 日本薬学会北陸支部 第 122 回例会, 2010 年 10 月 22 日, 金沢
- ⑦ 熊野御堂 悠, ヒト癌細胞における選択的ポリ(A)付加制御の分子機構, 第 12 回日本 RNA 学会年会, 2010 年 7 月 27-29 日, 東京
- ⑧ 和仁 翔太郎, 脊椎動物 CTD フォスファターゼ Ssu72 の機能解析, 第 12 回日本 RNA 学会年会, 2010 年 7 月 27-29 日, 東京
- ⑨ 熊野御堂 悠, ヒト Pin1 および WWOX の新規核内標的因子の探索, 第 3 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9-12 日, 横浜
- ⑩ 長田 愛乃, ニワトリ DT40 細胞株を用いたリン酸化 CTD 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 第 3 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9-12 日, 横浜
- ⑪ 岩本 悠, リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 第 3 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9-12 日, 横浜
- ⑫ 広瀬 豊, 脊椎動物 CTD フォスファターゼ Ssu72 の遺伝子発現制御における機能, 第 3 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9-12 日, 横浜
- ⑬ 和仁 翔太郎, 脊椎動物 CTD フォスファターゼ Ssu72 の遺伝子発現制御における機能, 第 8 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日, 神戸
- ⑭ 長田 愛乃, ニワトリ DT40 細胞株を用いたリン酸化 CTD 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 第 1 回日本 RNA 学会年会, 2009 年 7 月 27-29 日, 新潟
- ⑮ 岩本 悠, リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 第 1 回日本 RNA 学会年会, 2009 年 7 月 27-29 日, 新潟
- ⑯ 広瀬 豊, CTD フォスファターゼ Ssu72 の遺伝子発現制御における機能, 第 1 回日本 RNA 学会年会, 2009 年 7 月 27-29 日, 新潟
- ⑰ 岩本 悠, リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析, 遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ, 2009 年 1 月 19-21 日, 越後湯沢
- ⑱ 広瀬 豊, 脊椎動物リン酸化 RNA ポリメ

ラーゼ II 制御因子の機能解析、遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ、2009年1月19-21日、越後湯沢

- ⑲ Hirose Y, Functional characterization of the vertebrate phosphorylated CTD-interacting protein PCIF1, 11th Cold Spring Harbor Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2009年8月25-29日、Cold Spring Harbor (NY)
- ⑳ 岩本 悠、リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉑ 長田 愛乃、ニワトリ DT40 細胞株を用いたリン酸化CTD結合蛋白質PCIF1の機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉒ 山本真也、脊椎動物 CTD 脱リン酸化酵素 Ssu72 の遺伝子発現制御における機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉓ Ohkuma Y, Opposite functions in transcriptional activation by two kinase subunits of Mediator complexes, 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉔ 梅村 啓靖、メディエーター複合体サブユニット hMed18 の機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉕ 中坪 拓也、転写制御におけるメディエーター複合体サブユニット MED15 の機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉖ 大湊 愛、ヒト転写抑制型コファクター・Gdown1 の機能解析、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9-12日、神戸
- ㉗ Tsutsui T, Functional study of novel Mediator kinase subunit CDK11 in transcriptional regulation, The 21st Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA, 2008年6月、長野
- ㉘ 岩本 悠、リン酸化 RNA ポリメラーゼ II 結合蛋白質 PCIF1 の機能解析、第10回日本 RNA 学会年会、2008年7月23-25日、札幌
- ㉙ 山本真也、脊椎動物 CTD 脱リン酸化酵素 Ssu72 の遺伝子発現制御における機能、第10回日本 RNA 学会年会、2008年7月23-25日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

広瀬 豊 (HIROSE YUTAKA)

富山大学大学院・医学薬学研究部 (薬学)・  
准教授

研究者番号 : 00218851