

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15718

研究課題名（和文）MED26-核内構造体相互作用によるヒストン遺伝子転写の時空間的制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of spatiotemporal regulatory mechanism of histone gene transcription through interaction of MED26 and nuclear bodies

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Histone Locus Bodies (HLBs) とCajal bodies (CBs) はヒストン遺伝子の転写に重要な核内構造体である。本研究では、MED26と核内構造体との相互作用に着目しながら、ヒストン遺伝子の転写が時空間的に制御されるメカニズムの解明を試みた。本研究によって、MED26を含むMediator複合体は2つの異なる液相（核内構造体）を融合させることによって、ヒストン遺伝子の転写終結を制御していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン遺伝子の発現制御は腫瘍性疾患の発症メカニズムにも深く関与していることが知られており、本研究は腫瘍性疾患の発症メカニズムの解明にも重要であると考えられる。本研究により、Mediator複合体と核内構造体の相互作用による遺伝子発現制御機構の一端が明らかとなった。さらに、ヒストン遺伝子の転写終結を制御すると考えられる新規のRNAポリメラーゼIIの一時停止機構が明らかになり、転写終結制御に関する研究に新たな展開をもたらす成果となった。

研究成果の概要（英文）：Histone Locus Bodies (HLBs) and Cajal bodies (CBs) are nuclear bodies which regulate transcription of replication-dependent histone genes. In this study, we attempted to elucidate the mechanism by which transcription of histone genes is spatiotemporally regulated by MED26 and nuclear bodies. In this study, we found that the interaction of MED26 with the Little Elongation Complex (LEC) promotes fusion of HLBs and CBs to regulate the transcription of histone genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：MED26 ヒストン遺伝子 転写制御 遺伝子発現制御 RNAポリメラーゼII 核内構造体

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内において、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ことが知られている。この現象は液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) と呼ばれ、分子内に天然変性領域を多く有するタンパク質が液滴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核内構造体が遺伝子発現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 による遺伝子発現制御研究は転写研究において、現在、最もホットなトピックスの1つである [Boija A. et al. *Cell* 2018, Sabari A.R. et al. *Science* 2018]。LLPS によって形成される核内構造体において制御される遺伝子の中に、細胞周期の S 期特異的に転写されるヒストン遺伝子群がある。ヒストン遺伝子は、ヒトの 1 番染色体と 6 番染色体に多数の遺伝子群を形成しており、この遺伝子群は S 期に転写される際に凝集し、Histone Locus Bodies (HLBs) と呼ばれる核内構造体を形成する [Duronio R.J. et al. *RNA Biol.* 2016]。また、この HLBs 領域の近傍に、Cajal bodies (CBs) と呼ばれるもう 1 つの核内構造体も形成されることがわかっている。しかしながら、2 つの核内構造体はどのようにしてヒストン遺伝子群領域に形成されるのか、そして 2 つの核内構造体がヒストン遺伝子の転写においてどのような役割を果たしているのかについては、解明するべき「問い」として残されたままである。

Mediator 複合体は 30 個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、転写制御において非常に重要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 Mediator 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、転写伸長因子の ELL と EAF、機能未知の因子 ICE1、ICE2、ZC3H8 から構成される転写伸長複合体 Little Elongation Complex (LEC) と共役し、CBs においてヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子などのポリ A のない遺伝子群の転写終結を制御することを明らかにした [Takahashi H. et al. *Nat. Commun.* 2015, Takahashi H., Suzuki H et al. *Nat. Commun.* 2020]。興味深いことに、MED26 が HLBs・CBs と共局在していることが明らかとなった。このことから、MED26 を含む Mediator 複合体は 2 つの異なる液相 (核内構造体) を S 期特異的に融合させることによって、ヒストン遺伝子の転写を制御している可能性が考えられる (図 1)。

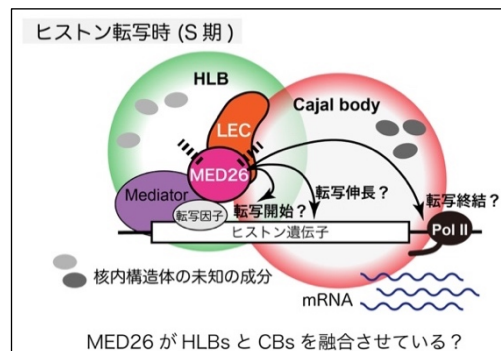


図 1: MED26 が HLB と CBs を融合させることでヒストン遺伝子の転写を制御している可能性

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、MED26 を含む Mediator 複合体と核内構造体との相互作用によってヒストン遺伝子の転写が時空間的に制御されるメカニズムを解明し、腫瘍性疾患発症メカニズムの一端を明らかにすることである。本研究の学術的独自性は、(i) Mediator 複合体と核内構造体との相互作用に着目しながらヒストン遺伝子発現制御メカニズムを解析すること、(ii) 新規の“*in situ* ビオチン標識法”を用いてこれまで技術的に解析困難だった核内構造体の構成因子を網羅的に同定すること、である。

### 3. 研究の方法

(1) MED26 によるヒストン遺伝子の転写メカニズムの解明

ChIP-seq、RNA-seq、PRO-seq により、ヒストン遺伝子の転写開始・転写伸長・転写終結のどのステップに MED26 が機能するのかを明らかにする。

(2) イメージング手法による核内構造体の解析

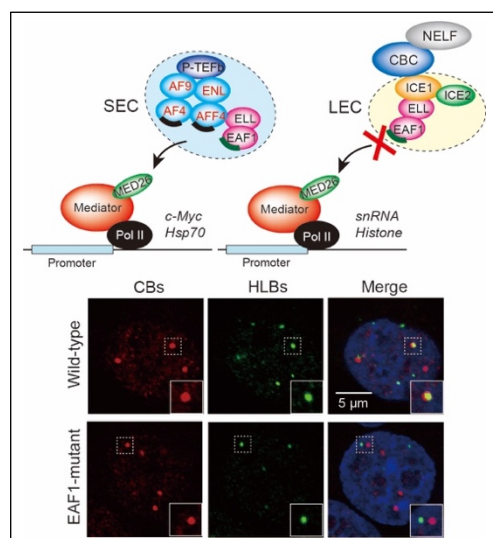


図 2: MED26 と LEC の結合は HLB と CB を融合させる

LEC のサブユニット EAF1 に変異を導入することで、MED26 と LEC が結合できない変異型細胞を作製した (上図)。この EAF1 変異型細胞では、HLB と CB の共局在が減少していた (下図)。

免疫蛍光染色法、FISH 法、ライブセルイメージング解析により、HLBs と CBs の局在を解析する。

(3) ヒストン遺伝子の転写を制御する核内構造体の構成成分の解明

東京工業大学の山口雄輝教授との研究で確立した *in situ* 近傍ビオチン標識法を用いて、HLBs および CBs の構成因子を網羅的に同定する。

(4) MED26 によるヒストン遺伝子制御と腫瘍性疾患の関係性についての解析

MED26 機能欠損細胞において、細胞増殖能や細胞運動能、ストレスに対する感受性に変化が現れるかどうかを解析する。

#### 4. 研究成果

LEC の標的遺伝子であるヒストン遺伝子は、RNA の 3' 末端にポリ A 鎖が付加される他の遺伝子とは異なり、ヒストン遺伝子に特異的な転写終結因子が働くことで、ポリアデニル化されないヒストン mRNA が産生される。本研究では、Mediator 複合体と LEC が、HLB と CB の融合を促進することでヒストン遺伝子の転写終結を制御していることが明らかになった。MED26 と LEC の結合能を欠失させた変異型細胞を作製し解析を行ったところ、HLB と CB の共局在が著しく低下するとともに、プロセシングされていない未成熟なヒストン遺伝子 RNA が蓄積することがわかった (図 2)。このことから、MED26 と LEC が結合することで CB がヒストン遺伝子領域に呼び寄せられ、CB の存在下でヒストン遺伝子の転写終結が適切に制御されることが考えられた。

さらに、RNA ポリメラーゼによる新生 RNA の合成を 1 塩基レベルの解像度で解析することができる PRO-seq 解析の結果から、ヒストン遺伝子の転写終結点近傍では Pol II が一時停止することを新たに発見し、これを TPP (TES proximal pausing) と名付けた (図 3)。また、ヒストン遺伝子における TPP には、Mediator 複合体と LEC の結合が必要であることも明らかとなった。TPP は転写終結に関与していると考えられ、TPP は、ヒストン遺伝子において Pol II が適切に転写終結するためのチェックポイントの役割を果たしている可能性がある。

これらの結果より、Mediator 複合体と LEC の結合が 2 つの核内構造体を融合させることでヒストン遺伝子の転写終結を制御することがわかり、Mediator 複合体の新たな機能が明らかになった (図 4)。

遺伝子の転写終結の分子機構には未解明な部分が多く残されており、今回の研究で転写終結に関与する Pol II の新たな一時停止機構が明らかとなったことで、転写終結の制御機構のさらなる解明につながることを期待される。また、MED26 と LEC が標的とするヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子は、腫瘍性疾患や神経変性疾患などのさまざまな疾患と深く関係しているため、本研究が疾患の発症メカニズムの解明につながることも期待される。

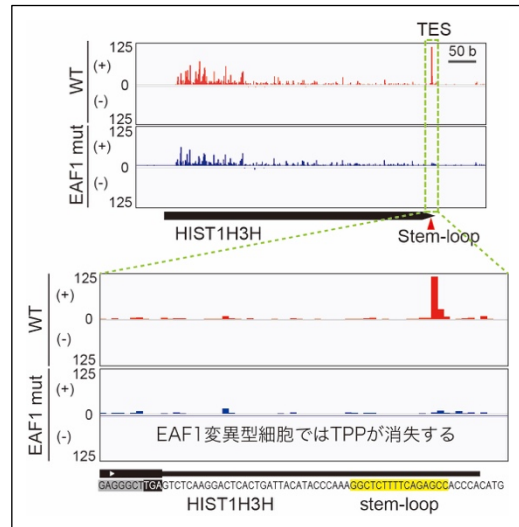


図 3: ヒストン遺伝子の転写終結点近傍における Pol II の一時停止

ヒストン遺伝子の転写終結点近傍では、新規の Pol II の一時停止 "TPP" が認められた。MED26 と LEC が結合できない変異型細胞では TPP が消失していたことから、Mediator 複合体と LEC によって TPP が制御されていることが示唆された。

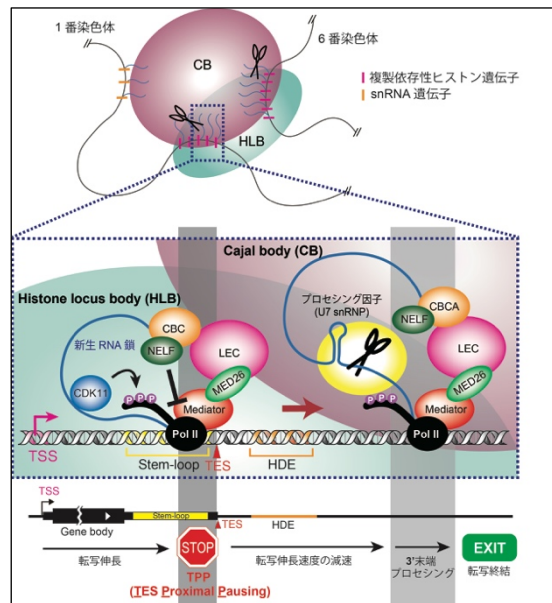


図 4: Mediator 複合体と核内構造体による転写終結制御のモデル図

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 鈴木 秀文、高橋 秀尚	4. 巻 93
2. 論文標題 メディエーター複合体のコンポーネントMED26による新たな転写制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 810～814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930810	査読の有無 無
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 Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Shimada Miho, Hirose Tomonori, Hirose Hiroko, Noguchi Keisuke, Ike Yoko, Yasui Nanami, Furugori Kazuki, Yamaguchi Yuki, Toyoda Atsushi, Suzuki Yutaka, Yamamoto Tatsuro, Saitoh Noriko, Sato Shigeo, Tomomori-Sato Chieri, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., Takahashi Hidehisa	4. 巻 13
2. 論文標題 The 3 Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30632-w	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 Okuda Masahiko, Suwa Tetsufumi, Suzuki Hidefumi, Yamaguchi Yuki, Nishimura Yoshifumi	4. 巻 50
2. 論文標題 Three human RNA polymerases interact with TFIIH via a common RPB6 subunit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 1～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab612	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

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, 山口 雄輝, 高橋 秀尚
2. 発表標題 新規のピオチン標識手法による核内構造体カハールボディ構成因子の網羅的解析
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020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, 古郡 華月, 池 陽子, 安井 七海, 山口 雄輝, 豊田 敦, 鈴木 稔, 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3' Pol II ポージング制御機構の解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古郡 華月, 鈴木 秀文, 松村 健, 阿部 竜太, 高橋 秀尚
2. 発表標題 TFIIDのサブユニットTAF7によるPol IIの一時停止-転写バースト機構の解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021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 新規ヒオチン標識法を用いたマルチオミックス解析によるCajal body形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澁谷 智花, 古郡 華月, 阿部 竜太, 堀内 恵子, 鈴木 秀文, 高橋 秀尚
2. 発表標題 CDK11は2つの核内凝集体において複製依存性ヒストン遺伝子の転写終結を制御する
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021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		
米国	Stowers Institute for Medical Research		