

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 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：24590357  
研究課題名(和文) 転写伸長/ユビキチンリガーゼ(E3)因子Elonginの生体内生理機能の解明  
  
研究課題名(英文) In vivo role of transcriptional elongation/ubiquitin ligase factor Elongin  
  
研究代表者  
麻生 悌二郎(ASO, Teijiro)  
  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
  
研究者番号：20291289  
  
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 (EloA) はRNAポリメラーゼIIに対する伸長促進機能とユビキチンリガーゼ(E3)機能とを併せ持つが、両機能の生体内における重要性は不明であった。本研究では、EloAホモ欠失型のマウス胎仔およびES細胞では複数の脳神経節と後根神経節を含む感覚神経系の形成ならびにニューロンへの分化が著明に損なわれていることを見出した。さらに、EloAの2つの機能を選択的に欠損させた変異体を用いた同欠失ES細胞への救済実験により、E3機能ではなく伸長促進機能がニューロンへの分化ならびにNeurogenin1、2等の転写制御因子遺伝子のレチノイン酸による発現誘導に重要であ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 a cullin-RING ligase that can target stalled pol II for ubiquitylation and proteasome dependent degradation. It is not known whether these activities of Elongin A are functionally interdependent in vivo. Here, we demonstrate that Elongin A-deficient (Elongin A<sup>-/-</sup>) embryos exhibit abnormalities in the formation of both cranial and spinal nerves and that Elongin A<sup>-/-</sup> embryonic stem cells (ESCs) show a markedly decreased capacity to differentiate into neurons. Moreover, we identify Elongin A mutations that selectively inactivate one or the other of the above activities and show that mutants that retain the elongation stimulatory, but not pol II ubiquitylation, activity of Elongin A rescue neuronal differentiation and support retinoic acid-induced up-regulation of a subset of neurogenesis-related genes in Elongin A<sup>-/-</sup> ESCs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Elongin 転写伸長 ユビキチンリガーゼ RNAポリメラーゼII 神経分化 遺伝子発現 神経堤

### 1. 研究開始当初の背景

RNAポリメラーゼII (pol II)によるmRNAの転写反応は開始、伸長、終結、リサイクリングの4つの過程から成る。従来、転写開始が遺伝子発現の中で最も重要なステップと考えられてきたが、十数年前からはこれに続く伸長過程も、pol IIが一時停止を起し易いこと、巨大な遺伝子では全長の転写に一日近くを要すること等から、重要な制御の場であることが認識されてきた<sup>1)</sup>。さらに最近、技術革新により可能になったゲノムワイド解析の結果、ゲノム上の実に30%余の遺伝子においてその発現が伸長段階で制御されていることが判明した<sup>2)</sup>。これまで、この段階を制御する転写伸長因子が10種以上単離されているが、その内のいくつかはヒトの疾患病態と密接に関連することが明らかとなり(CSBの異常はCockayne syndromeの原因となり、p-TEFbとNELFは各々HIV、D型肝炎ウイルスの増殖と、また、相互転座によりMLLと融合タンパクを形成するELL、ENL、AF4等は急性白血発症と密接にリンクしている)転写伸長因子病という疾患概念が生まれている<sup>3), 4)</sup>。

申請者はこれまでにTFIIF(Aso T, et al. *Nature* 1992)、EloAとそのファミリー(Aso T, et al. *Science* 1995, Aso T, et al. *JBC* 2000, Yamazaki K, et al. *JBC* 2002)の4つの伸長因子を単離してきた。TFIIFが開始にも必須な基本因子であるのに対して、EloAは限定的な遺伝子転写に関与することが示唆されたが(Yamazaki K, et al. *JBC* 2003)、その生体内機能については全く不明のままであった。そこで、EloAを欠失したES細胞・マウスを作製して同因子の生物機能について解析し、以下の事象を明らかにしてきた。

(1) EloA<sup>-/-</sup>マウスが中枢神経系の低形成等の異常により胎生10.5日(E10.5)頃に致死となり、同胎仔由来のMEFがアポトーシス亢進、早期細胞老化の表現型を示す(Miyata K, Yasukawa T, et al. *Cell Death Differ.* 2007, Yasukawa T, et al. *BBRC* 2007)。

(2) UV照射によりEloAがElongin BCを介してCuI5/Rbx2と会合してE3複合体を形成し、pol IIをユビキチン化して分解へと導く(Yasukawa T, et al. *EMBO J.* 2008)。

(3) 各種ストレス刺激によりEloAがATF3、HSP70等のストレス応答遺伝子の転写領域にリクルートされ、pol IIと協働してこれら遺伝子の発現誘導を制御する。

さらに最近、EloA<sup>-/-</sup>型のマウス胎仔およびES細胞の神経系発生・分化能について解析した結果、(1) EloA<sup>-/-</sup>型胎仔では脳・脊髄神経の形成が顕著に損なわれている、(2) EloA<sup>-/-</sup>型ES細胞ではレチノイン酸(RA)によるニューロン分化ならびにNeurogenin、NeuroD4

等、ニューロン誘導活性をもつ一群の転写制御因子の発現が著明に低下している、等が判明し、EloAが伸長促機能を介して神経系の発生・分化に重要な役割を果たしているという可能性が浮上してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、EloAの神経系発生・分化における役割の解明を目指して以下の課題に取り組む。

(1) EloA<sup>-/-</sup>型のマウス胚様体および胎仔が示す神経系分化異常を病理・病態学的に解析して、その本体を明らかにする。

(2) マウスの胚様体および胎仔を用いたChIPならびにChIP-seq解析によりEloAの標的遺伝子を探査し、同定した遺伝子の神経系発生・分化への関与について明らかにする。

(3) 内在性のEloAを欠失し、[伸長+, E3-]型あるいは[伸長-, E3+]型のEloAを発現するES細胞ならびにトランスジェニック(Tg)マウスを作製して、EloA<sup>-/-</sup>型のES細胞あるいはマウスの救済実験を行い、神経分化制御におけるEloAの伸長、E3各機能の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) EloA<sup>-/-</sup> ES細胞由来胚様体の神経系分化異常の病理・病態学的解析

野生型ならびにEloA<sup>-/-</sup>型のES細胞をレチノイン酸(RA)添加あるいは非添加の条件下で培養(4-/4+ protocol, 図1A)して胚様体を形成させ、各々についてパラフィン切片を作製する。次いで、EloA欠失が神経系分化に及ぼす影響を確認するため、神経幹細胞、成熟神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのマーカーであるNestin、βIII-tubulin、GFAP、CNPaseに対する抗体を用いた免疫染色を実施する。さらには、抗Ki67抗体を用いた免疫染色とTUNELアッセイを実施して、細胞の増殖性ならびにアポトーシスへの影響を調べる。

#### (2) EloA<sup>-/-</sup>マウス胎仔の神経系発生・分化異常の病理・病態学的解析

E9.5~E10.5胎仔のパラフィン切片を用いて抗Ki67抗体による免疫染色とTUNELアッセイを実施して、細胞増殖性低下とアポトーシス亢進の有無を明らかにする。また、各種分化マーカーに対する抗体を用いた免疫染色により、ニューロン、グリア細胞への分化状況を把握する。同時に、*Neurogenin 1/2*、*Sox10*、*Eya2*等をプローブとして用いたホルマウント *in situ*ハイブリダイゼーションを実施して、EloA<sup>-/-</sup>胎仔では神経堤、プラコ

ードのどちらの前駆細胞の分化が主に阻害されているかを明らかにする。

### (3) *EloA*<sup>-/-</sup> ES 細胞由来胚様体を用いた *EloA* の標的遺伝子の解析

野生型と *EloA*<sup>-/-</sup> 型の胚様体間でマイクロアレイ解析を実施し、*EloA* 欠失により有意な発現低下を認める遺伝子として *Neurogenin 1*, *Neurogenin 2*, *Hoxa7* 等を同定した。そこで、上記(1)の要領で作製した胚様体からクロマチンを調製、クロスリンク処理、Bioruptor による断片化の後、抗 pol II 抗体 (非リン酸化型とリン酸化型の両方を認識、Ser5 リン酸化型を認識、Ser2 リン酸化型を認識、の3種の抗体を使用) を用いて DNA-pol II 複合体を免疫沈降させる。脱クロスリンク処理の後、DNA を精製、これを鋳型として用いて定量的 PCR を実施し、RA 処理による pol II の上記遺伝子上での局在性変化について解析する。

### (4) 神経分化制御における *EloA* の伸長、E3 各機能の役割の解析

*EloA*<sup>-/-</sup> 型 ES 細胞に [伸長+, E3-] 型の *EloA*-VP mut の vector、 [伸長-, E3+] 型の *EloA*(1-674) の vector あるいは [伸長-, E3-] 型の *EloA* (546-565) の vector を導入して各々の安定発現細胞株を作製する。4-/4+ protocol により胚様体を形成させた後、トリプシン処理を加えて細胞をさらに 72 時間培養する。ニューロンへの分化の救済を抗  $\beta$ III-tubulin 抗体を用いた免疫プロット法により、また、*Neurogenin1*, *2* 等の神経分化関連転写制御因子遺伝子の発現の回復を RT-PCR 法により、各々野生型 *EloA* を導入した ES 細胞株を対照にして解析する。

## 4. 研究成果

### (1) *EloA*<sup>-/-</sup> マウス胚様体の神経系分化異常の病理・病態学的解析

野生型 ES 細胞由来の胚様体では RA 刺激により Nestin ならびに  $\beta$ III-tubulin の発現の増加がみられたのに対し、*EloA*<sup>-/-</sup> 型 ES 細胞由来の胚様体では RA による増強が認められなかった (図 1B)。また、野生型の胚様体からは  $\beta$ III-tubulin と MAP2 の両マーカーが陽性のニューロンが形成されたのに対し、*EloA*<sup>-/-</sup> 型の胚様体からはニューロンの形成がほとんど認められなかった (図 1C)。一方、アポトーシスの程度は野生型と *EloA*<sup>-/-</sup> 型の胚様体間でほとんど差がなかった (図 1D)。

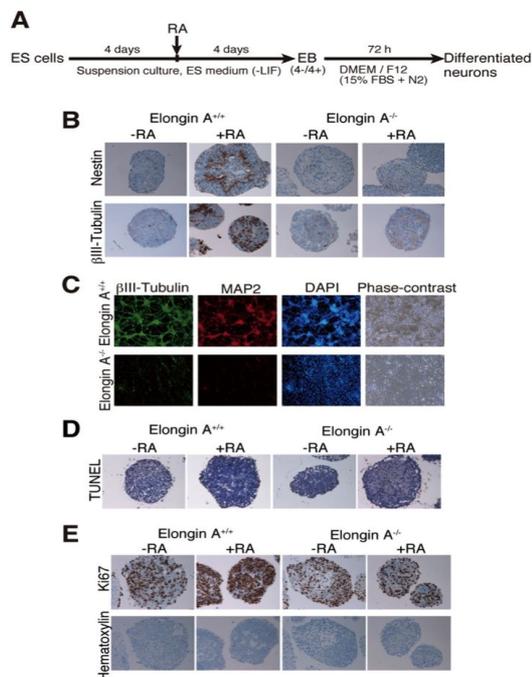


図 1. *EloA*<sup>-/-</sup> マウス胚様体の神経系分化異常

### (2) *EloA*<sup>-/-</sup> マウス胎仔の神経系発生・分化異常の病理・病態学的解析

体節数を揃えた E10.5 胎仔の抗 Neurofilament 抗体によるホールマウント免疫染色の結果、*Elongin A*<sup>-/-</sup> 型胎仔では野生型と比べて第 III、V、VII、VIII、IX、X、XI 脳神経節の形成が顕著に損なわれていることが判明した (図 2A)。次に、これら神経系形成不全の原因を探るため、先ず細胞増殖性とアポトーシスについて比較検討したが、第 V、VII、VIII、IX、X の何れの脳神経節においても *EloA*<sup>-/-</sup> 型胎仔における有意な増殖性の低下ならびにアポトーシス亢進は認められなかった。続いて、E9.5~E10.5 の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脳・脊髄における神経系分化に重要な各種転写制御因子の発現について検討した。その結果、神経堤細胞のマーカーである *Sox10* の発現が *EloA*<sup>-/-</sup> 胎仔の脳神経節と後根神経節において、また、感覚神経系の分化に必要な *Neurogenin1* ならびに *NeuroD1* 等の発現が第 V 神経節等で著明に低下していることが判明した (図 2C)。一方、プラコード細胞のマーカーである *Pax8* や交感神経系の分化に必要な *Mash1* の発現には有意な変化が認められなかった (図 2C)。以上より、*EloA* は神経堤細胞からの感覚神経への分化の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

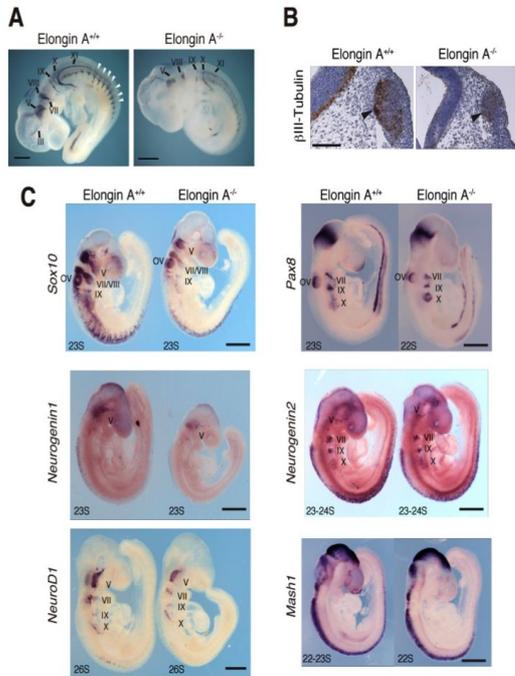


図2. EloA<sup>+/-</sup>マウス胎仔の神経系発生・分化異常

### (3) EloA<sup>-/-</sup> ES 細胞由来胚様体を用いた EloA の標的遺伝子の同定

RT-PCR 解析の結果、*Neurogenin1*、*Neurogenin2*、*NeuroD4*、*Hoxa7* 等の遺伝子では胚様体における RA 刺激による mRNA の発現増加に EloA の存在を必要とすることが判明した(図 3A)。そこで、*Neurogenin1*、*Neurogenin2*、*Hoxa7* の3種の遺伝子について、RA 添加、非添加の状況下での遺伝子上各部位における pol II の分布をクロマチン免疫沈降 (ChIP) により解析した。その結果、EloA<sup>-/-</sup>型の胚様体では RA 添加の有無に関わらず何れの遺伝子上にも pol II がほとんど検出されなかったが、EloA<sup>+/-</sup>型の胚様体においては、RA 添加によりこれら遺伝子のプロモーター領域ならびにコーディング領域に結合した pol II (total ならびに Ser5リン酸化型) の量が著増することが判明した(図 3B)。以上から、EloA はいくつかの遺伝子においては伸長段階の制御のみ体の安定性維持にも寄与していることが示唆された。

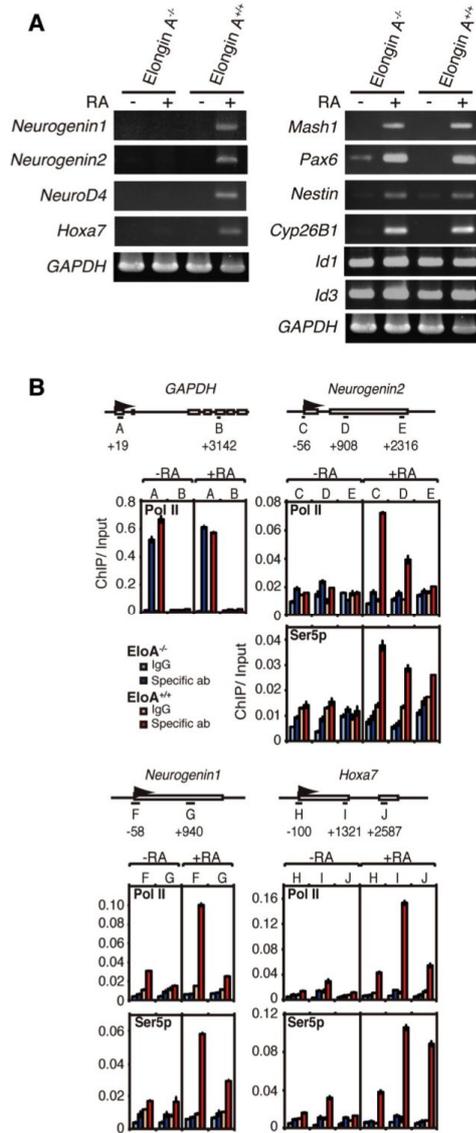


図3. EloA は RA 刺激による神経分化関連転写制御因子遺伝子の転写促進に重要である

### (4) 神経分化制御における EloA の伸長、E3 各機能の役割の解析

野生型 EloA あるいは[伸長+, E3-]型 EloA である EloA-VP mut の導入により EloA<sup>-/-</sup>型 ES 細胞での RA 刺激によるβIII-tubulin の発現増加が救済されたのに対し、[伸長-, E3+]型 EloA である EloA(1-674) の導入では救済が認められなかった(図 4A)。同様に、神経分化関連転写制御因子 *Neurogenin1*、*Neurogenin2*、*NeuroD4* および *Hoxa7* の mRNA の RA 刺激による発現誘導も[伸長+, E3-]型の EloA-VP mut の導入により救済されたのに対し、[伸長-, E3+]型の EloA(1-674) の導入では救済が認められなかった(図 4B)。

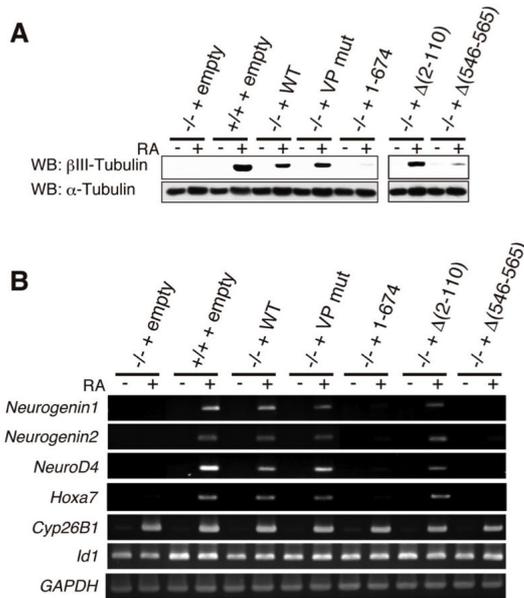


図4. EloA<sup>-/-</sup>ES細胞の神経分化の救済にはEloAの伸長機能が重要である

#### <引用文献>

- 1) Saunders A, et al. Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 557-567, 2006.
- 2) Core LJ, et al. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845-1848, 2008.
- 3) Aso T, et al. Transcription syndromes and the role of RNA polymerase II general transcription factors in human disease. *J. Clin. Invest.* 97, 1561-1569, 1996.
- 4) Conaway JW, and Conaway RC. Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 301-319, 1999.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計2件)

Kawauchi, J., Inoue, M., Fukuda, M., Uchida, Y., Yasukawa, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Aso, T., and Kitajima, S. Transcriptional properties of mammalian Elongin A and its role in stress response. *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 288, No. 34, 2013, pp. 24302-24315. doi: 10.1074/jbc.M113.496703.

Yasukawa, T., Bhatt, S., Takeuchi, T., Kawauchi, J., Takahashi, H., Tsutsui,

A., Muraoka, T., Inoue, M., Tsuda, M., Kitajima, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Trainor, P.A., and Aso, T. Transcriptional elongation factor Elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation. *Cell Rep.* 査読有, Vol. 2, No. 2, 2012, pp. 1129-1136. doi: 10.1016/J.celrep.2012.09.031

##### [学会発表](計5件)

安川 孝史, 他、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年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県)

安川 孝史, 他、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年10月16日、国立京都国際会館(京都府)

井上 允, 他、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年10月16日、国立京都国際会館(京都府)

Yasukawa T, 他、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年12月12日、福岡国際会議場&マリンメッセ福岡(福岡県)

Inoue M, 他、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年12月14日、福岡国際会議場&マリンメッセ福岡(福岡県)

##### [その他]

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fg\\_chmst/research/earchi.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fg_chmst/research/earchi.htm)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

麻生 悌二郎 (ASO, Teijiro)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 20291289

##### (2)連携研究者

北嶋 繁孝 (KITAJIMA, Shigetaka)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号: 30186241