

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 転写伸長反応の制御を介した細胞機能発現機構の解明

2 研究者氏名: 山口 雄輝

3 研究の狙い:

RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) は遺伝情報発現を担う中心酵素である。RNAPII による転写は様々なステップを経て進む。RNAPII はまず遺伝子のプロモーターに結合し (転写開始前 / 開始)、DNA 上を滑りながら mRNA 前駆体を合成していく (転写伸長)。私がこの研究を開始した頃は前者の研究が盛んで、後者はほとんど無視されていた。しかし私達はいくつかの理由から、転写伸長に注目した。理由の一つは単純で、転写伸長には思いのほか長い時間 (遺伝子の長さによって数分から数時間程度) がかかるという事実である。遺伝子発現は細胞内外の刺激に応じて迅速に制御される必要があり、このような長い時間、何の制御もないとは考えられない。

私達は試験管内のアッセイ系を用いて、転写伸長反応を制御する全く新しいタイプの転写因子、すなわち転写伸長因子を同定した (*Genes Dev.* 1998; *EMBO J.* 1998; *Cell* 1999; *J. Biol. Chem.* 1999; *Mol. Cell* 2000, *Science* 2002)。DSIF は Spt5 と Spt4 という 2 つのサブユニットからなり、転写伸長を抑制も促進もする。NELF は 4 つのサブユニットからなり、転写伸長を抑制する。P-TEFb は Cdk9 と Cyclin T という 2 つのサブユニットからなり、そのキナーゼ活性により転写伸長を促進する。私が提唱しているモデル (図1) によれば、DSIF と NELF は協調的に働いて転写伸長を抑制する。そしてタンパク質キナーゼ P-TEFb は RNAPII の C 末端ドメイン (CTD) をリン酸化することで、この抑制を解除する。さらに DSIF は、NELF とは無関係に転写伸長を促進する。

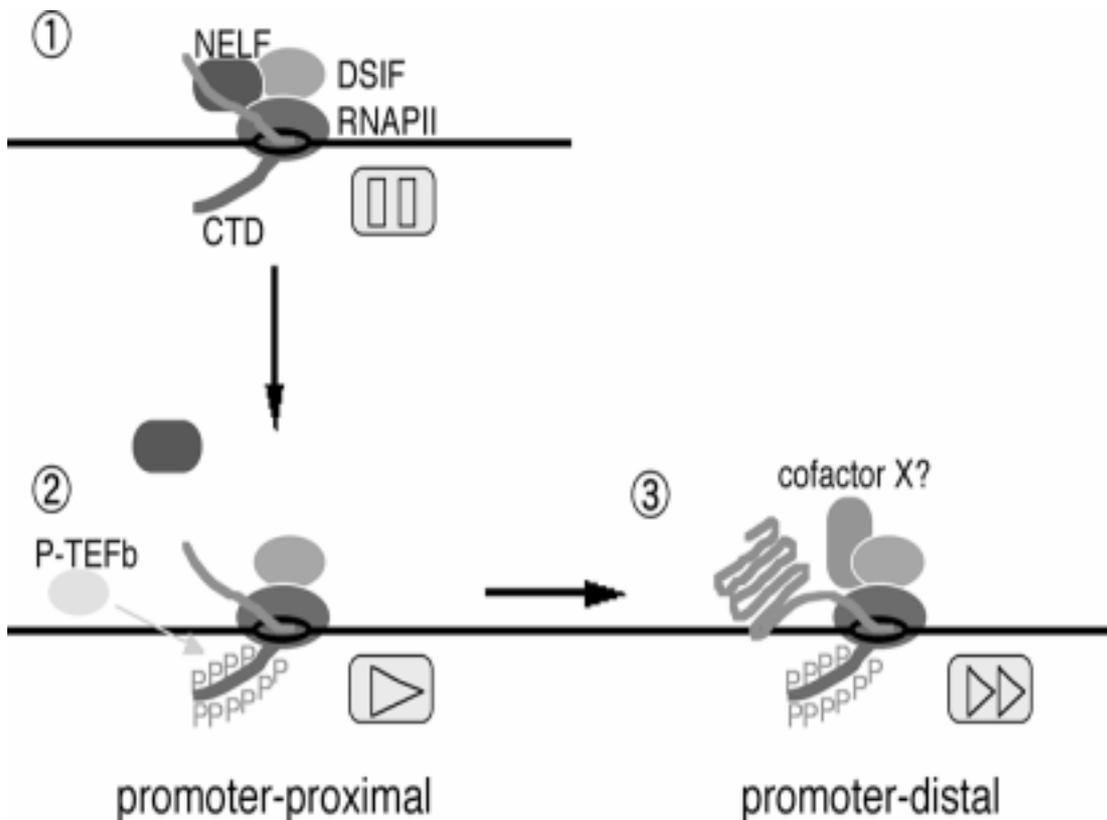


図1. DSIF, NELF, P-TEFbによる転写伸長制御のモデル

試験管内の実験結果から、これら転写伸長因子は基本的な転写装置の一部であり、極めて重要な因子群であると考えられた。しかし、これらは純粹に生化学的手法により同定されたので、細胞内でどんな遺伝子を制御し、どんな役割を果たしているのか、そもそも本当に「転写伸長因子」として働いているのか、ということすら分からなかった。そこで、さきがけ研究において私は、これら転写伸長因子の細胞機能を解明することを目指した。

研究のアプローチとして、第一に、細胞内のタンパク質-DNA 間の相互作用を可視化することで、遺伝子上での RNAPII の「動き」を明らかにすることを目指した。その方法として、ショウジョウバエの唾液染色体の免疫染色とクロマチン免疫沈降の 2 つを用いた。唾液染色体の免疫染色は、空間分解能は低いがゲノムワイドの解析は容易、クロマチン免疫沈降は空間分解能は高いがゲノムワイドの解析は困難、という特徴がある。第二に、転写伸長因子の過剰発現や発現抑制を行なって表現型を解析することで、転写伸長因子の細胞機能を明らかにすることを目指した。表現型としては、細胞増殖、トランスクリプトーム、RNAPII の動態の 3 つに注目した。

#### 4 研究成果:

成果 1: NELF の生化学的解析 (*Mol. Cell. Biol.* 2002; *Mol. Cell. Biol.* 2003)

精製した NELF は 5 種類のポリペプチド A, B, C, D, E から構成される。さきがけ研究を開始した時点で、NELF-A と NELF-E 以外のポリペプチドは未同定だった。そこで、質量分析によりそれらの部分アミノ酸配列を決定し、全長の遺伝子を単離した。驚いたことに、NELF-C と NELF-D はほとんど同一のポリペプチドだった (図 2)。解析の結果、NELF-C は NELF-D の N 末端に 9 アミノ酸が付加したものであり、翻訳開始位置の使い分けによって同一の mRNA から生じることが明らかとなった。また、NELF は A, B, C または D, E という 4 種類のサブユニットを 1 分子ずつ含む複合体であることが明らかとなった。NELF-B は最近、バージニア大学の Rong Li 博士のグループによって、乳癌抑制遺伝子 BRCA1 産物の相互作用因子として同定された COBRA1 と同一だった。NELF-C/D は機能不明の TH1 というタンパク質と同一だった (図 2)。

バキュロウイルスベクターを用いて 4 種類の NELF サブユニットを昆虫細胞で共発現させ、活性のある組換え NELF 複合体を再構成することに成功した。この系を用い、NELF の各サブユニットの機能について解析した。その結果、NELF-E の RNA 結合ドメインが NELF の機能に重要であること、NELF-A の中に RNAPII との結合に重要な短い領域が存在すること、NELF-B と NELF-C/D が NELF 複合体の構造維持に不可欠であることなどが明らかとなった。言い換えれば、すべての NELF サブユニットが NELF の機能に何らかの不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上をまとめると、NELF の全てのサブユニットのクローン化し、NELF 複合体を再構成し、個々のサブユニットの役割をある程度まで明らかにした。今後の研究に不可欠な基盤情報や基盤材料を得ることができた。

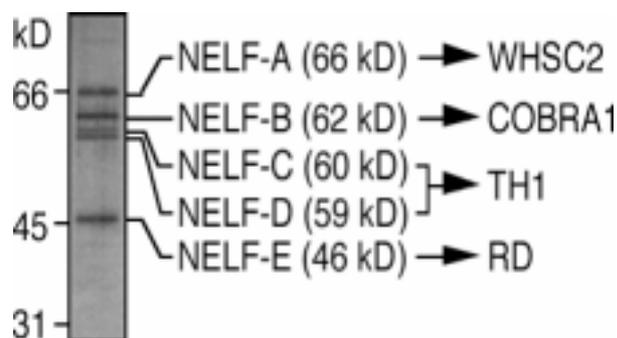


図 2. NELF のサブユニット構成

成果2:熱ショック応答における転写伸長因子の役割 (*Genes Dev.* 2003)

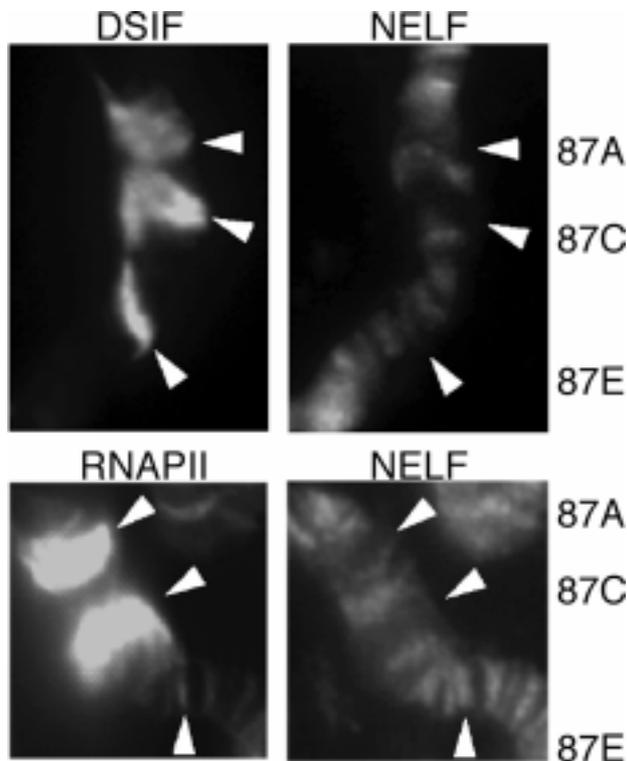


図3. NELFは熱ショック後に熱ショック遺伝子上から外れる。87A, 87C, 87Eは熱ショック遺伝子の場所を表す。

ショウジョウバエの熱ショック遺伝子群は転写因子 HSF によって制御され、熱ショックに反応して迅速に発現する。これらの遺伝子のプロモーター下流には RNAPII が結合していることが知られており、これらの遺伝子の発現が転写の伸長段階で制御されていることが予想された。そこで、熱ショック遺伝子の発現制御に転写伸長因子がどのような役割を果たしているのか調べた。ここでは唾液染色体の免疫染色を活用した。ショウジョウバエの唾液腺ではエンドレプリケーションによって染色体が数千本の束になっており、細胞周期の間期でも光学顕微鏡で見える太さになっている。DNA 色素の染色パターンから遺伝子の位置を特定することができる。

解析の結果、非誘導時に DSIF、NELF、RNAPII の3者が熱ショック遺伝子のプロモーター下流に結合しており、NELF が熱ショックに反応して遺伝子上から解離することが明らかとなった (図3)。さらにノックダウンの実験から、NELF がプロモーター下流における RNAPII の停止に関与していることが明らかとなった (図4)。

まとめると、非誘導時には NELF が DSIF とともに転写伸長を抑制することで、熱ショック遺伝子の発現を抑制しているが、その抑制は熱ショックによって解除されると考えられる。熱ショック依存的な伸長抑制の解除は P-TEFb が担っていると考えられる。これは、試験管内の解析結果から導かれたモデルが細胞内にそのまま適用可能であることの最初の直接的証拠となった。

成果3:性ホルモン応答における転写伸長因子の役割 (*Genes Dev.* 2004)

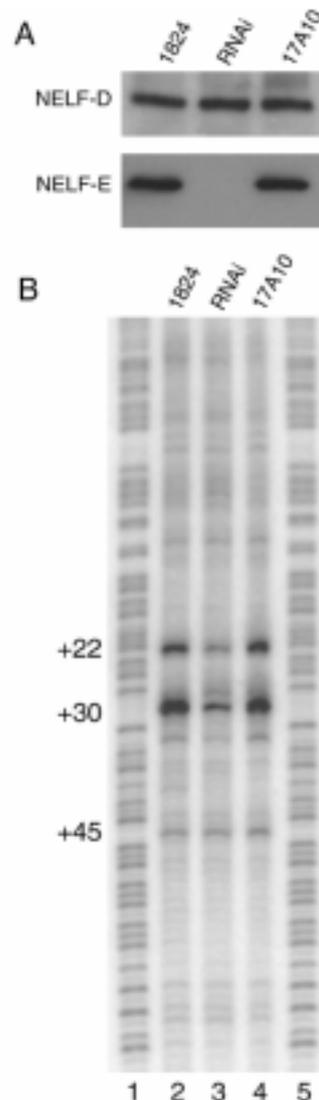


図4. NELFはプロモーター下流でのRNAPIIの停止に関与する

NELF のサブユニットの一つである NELF-B が、乳癌抑制遺伝子 BRCA1 産物の相互作用因子 COBRA1 であったことから、NELF と BRCA1 の間の機能的関係について調べた。BRCA1 は転写因子 ER と結合し、エストロゲン応答性の遺伝子発現を負に制御することが知られている。NELF がこの過程に関与しているのではないかと考え、解析を行なったところ、およそ予想通りの結果が得られた。ただ興味深いことに、NELF はエストロゲン応答性の遺伝子をすべて抑制する訳でなく、C3 遺伝子や pS2 遺伝子は抑制するが、カテプシン D 遺伝子や c-Myc 遺伝子は抑制しないことが分かった。また熱ショック遺伝子の場合とは異なり、非誘導時には NELF や RNAPII が C3 遺伝子や pS2 遺伝子上に存在していないことが分かった。NELF はエストロゲン刺激後にこれらの遺伝子上にリクルートされ、転写伸長を負に制御していた。

以上のことから、NELF はエストロゲン応答性の遺伝子の一部に対して働き、転写活性化のレベルまたは期間を負に調節していると考えられる。標的遺伝子の選択性が何によって規定されているのかは不明である。

#### 成果4:炎症応答における転写伸長因子の役割 (*Mol. Cell. Biol.* 2004)

ヒト培養細胞において、DSIF のサブユニットの一つである Spt5 の発現を siRNA を用いてノックダウンし、それが細胞の表現型に及ぼす影響を検討した。予備的な結果から、炎症性サイトカインの一つである TNF に応答した遺伝子発現が異常をきたしていることが分かった。そこで、TNF の標的遺伝子の一つであり、転写因子 NF- $\kappa$ B によって制御される A20 遺伝子をモデル系として、DSIF の働きについて詳しく調べた。その結果、DSIF が A20 遺伝子の転写伸長を直接制御しており、その働きが NF- $\kappa$ B によって制御されていることが明らかとなった。また意外なことに、A20 遺伝子のプロモーター上に、NF- $\kappa$ B 結合配列とは別の、DSIF の機能を仲介する DNA 配列が存在することが示唆された。

以上のことから、A20 をはじめとする TNF/NF- $\kappa$ B 経路の遺伝子群は DSIF の標的遺伝子であることが分かった。また、DSIF の遺伝子特異的な作用メカニズムを理解する上での手がかりが得られた。

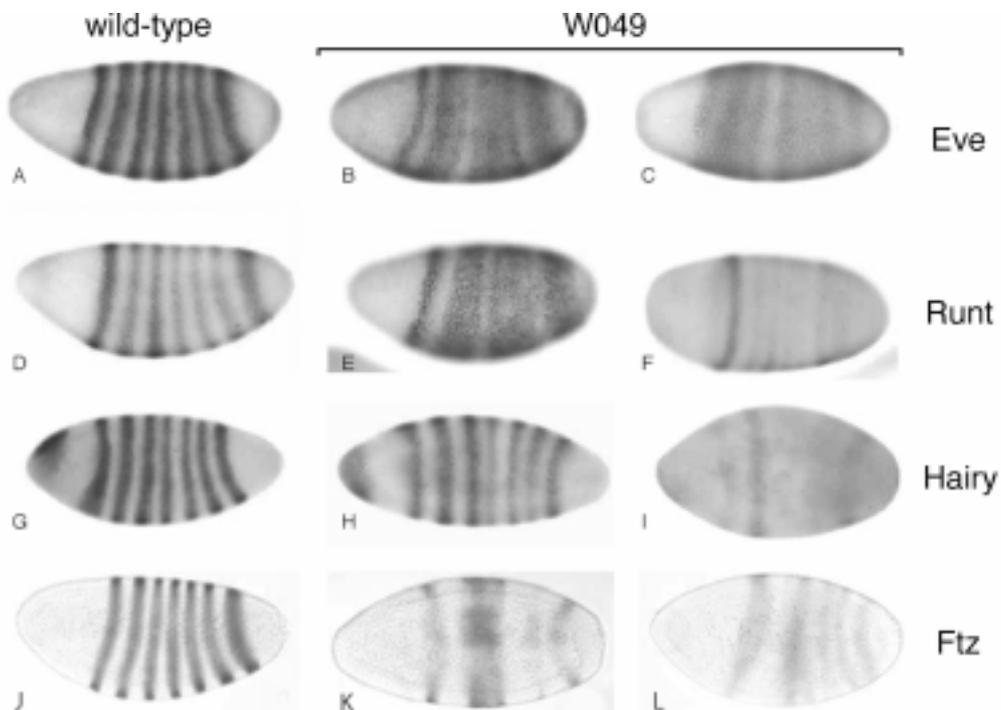


図5. Spt5に点変異を持つショウジョウバエ (W049) は pair-rule 遺伝子群の発現に異常をきたしている

#### 成果5: ショウジョウバエの体節形成における転写伸長因子の役割 (*Curr. Biol.* 2004)

英国癌研究所の David Ish-Horowicz 博士のグループは、Spt5 にミスセンス変異を持つショウジョウバエの変異体を同定した。この Spt5 の 994 番目の Gly を Asp に置換する変異は、初期発生過程における体節形成に異常を引き起こす。

私は Ish-Horowicz 博士のグループと共同で、この変異が遺伝子発現におよぼす影響について解析を行なった。その結果、この変異体では *pair-rule* 遺伝子群の発現に異常をきたしていることが明らかになった (図5)。また興味深いことに、この変異が試験管内で、DSIF の伸長促進活性にはほとんど影響しないが、伸長抑制活性を著しく損なうことが明らかとなった。

以上の結果から、DSIF の持つ伸長抑制活性が、初期発生過程における *pair-rule* 遺伝子群の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。

#### 5 自己評価:

転写伸長因子が細胞内で確かに「転写伸長因子」として働いていることが分かった。具体的には、熱ショック応答、TNF NF- $\kappa$ B 経路、エストロゲン ER 経路、ショウジョウバエの体節形成など様々な場面において、転写伸長因子は重要な役割を果たしている。言い換えれば、環境ストレスや生体リガンドに応答するいわゆる前初期遺伝子や、分化によって制御される遺伝子など、様々な遺伝子が実は転写伸長段階で制御されていることが明らかとなった。転写反応は大部分、転写の開始段階で制御されているというこれまでのアイディアは見直しを迫られている。

その一方で、本研究はまだケーススタディを積み重ねていく段階にとどまり、当初の計画にあった、転写伸長制御の細胞内での役割を統一的に理解するまでには至らなかった。例えば、転写伸長因子の働きには明らかに遺伝子特異性があることが分かったが、その特異性が決定されるメカニズムを十分に理解することはできなかった。また、転写伸長因子が転写以外のプロセスにも関与するという予備的な証拠を得たが、十分に踏み込んだ解析を行なうことはできなかった。これらを今後の課題としたい。

#### 6 研究総括の見解:

細胞機能を作り出す蛋白質の産生ならびにその量を調節する遺伝子の発現に関しては、転写開始段階での制御が重要であることは当然であるが、いったん開始してしまった mRNA 合成の制御の重要性を明らかにしたことは、その制御に関与する転写伸長因子ならびにその役割を様々な機能に関して明らかにしたことは、本領域の目指す大きな成果と評価する。さらに実験の場を哺乳動物に移して転写伸長反応の制御の持つ重要性を明らかにし、独自の領域を深めてゆくことを期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., and Handa, H.: Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2918-2927. (2002)
2. Yamaguchi, Y., Delehouzee, S., and Handa, H.: HIV and HDV: evolution takes different paths to relieve blocks in transcriptional elongation. *Microbes Infect.* 4, 1169-1175. (2002)
3. Kuraoka, I., Endou, M., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Tanaka, K.: Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II: Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 7294-7299. (2003)
4. Narita, T.\*, Yamaguchi, Y.\*, Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T., and Handa, H.: Human transcription elongation factor NELF: Identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1863-1873. (2003) (\*筆頭著者).

5. Wu, C.-H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinski, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., and Gilmour, D.S.: NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila. *Genes Dev.* 17, 1402-1414. (2003)
6. Inukai, N., Yamaguchi, Y., Kuraoka, I., Yamada, T., Kamijo, S., Kato, J., Tanaka, K., and Handa, H.: A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 8190-8195. (2004)
7. Ainbinder, E., Amir-Zilberstein, L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Dikstein, R.: Elongation inhibition by DRB sensitivity-inducing factor is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2444-2454. (2004)
8. Aiyar, S.E., Sun, J.-L., Blair, A.L., Moskaluk, C.A., Lv, Y., Ye, Q.-N., Yamaguchi, Y., Mukherjee, A., Ren, D.-M., Handa, H., and Li, R.: Attenuation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated transcription through estrogen-stimulated recruitment of a negative elongation factor. *Genes Dev.* 18, 2134-2146. (2004)
9. Jennings, B.H., Shah, S., Yamaguchi, Y., Seki, M., Phillips, R.G., Handa, H., and Ish-Horowicz, D.: Locus-specific requirements for Spt5 in transcriptional activation and repression in Drosophila. *Curr. Biol.* 14, 1680-1684. (2004)

特許出願 該当なし

その他の成果(口頭発表)

1. Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H.: The 5th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 24-28, 2002.
2. Yamaguchi, Y. and Handa, H.: Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2003, Cold Spring Harbor, NY, USA, Aug. 27-31, 2003.
3. Yamaguchi, Y., Mura, T. and Handa, H.: The 6th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 28-Sep. 1, 2004.
4. Yamaguchi, Y., Yamada, T., Kamijo, S. and Handa, H.: Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II, Lake Tahoe, CA, USA, Oct. 29-Nov. 1, 2004.