

39. メディエーター複合体の液滴による細胞の増殖から分化への制御機構の解明

横浜市立大学大学院医学研究科分子生物学分野 教授 高橋 秀尚

概要

生体における外界からの刺激やストレスは様々な伝播様式によって、最終的に細胞に伝達される。刺激やストレスを受容した細胞は、それに対応するために必要な遺伝子発現を活性化する。我々はこれまでに Med26 を含むメディエーター複合体が2つの異なる転写伸長複合体 Super elongation complex (SEC)、Little elongation complex (LEC) と共役して、異なる遺伝子群の転写を統合的に活性化することを明らかとしてきた。本研究によって、MED26 を含むメディエーター複合体は液-液相分離によって核内で”場” (液滴) を形成し、そこで腫瘍関連遺伝子やストレス応答性遺伝子の転写を統合的に促進することが明らかとなった (論文投稿準備中)。また、我々はヒトパピローマウイルス感染によって引き起こされる子宮頸がん細胞において、MED26 と SEC が *c-Myc* 遺伝子の上流においてスーパーエンハンサーと呼ばれる液滴を形成し、子宮頸がん細胞の増殖を促進することを明らかとした。このような液滴による転写制御機構の解明のために、液滴や核内構造体の構成因子を網羅的に同定する新規の手法として、*in situ* ビオチン化法の開発を行った。MED26 による転写制御機構は、ストレス応答や幹細胞の分化など、迅速な RNA 合成が必要となる時期に非常に重要な役割を果たすことが明らかとなっており、現在、論文投稿準備中である。

背景および目的

遺伝子発現の新たな制御機構として、液滴による制御機構が注目されている。我々はこれまでにメディエーター複合体のサブユニット MED26 が2つの異なる転写複合体 Super elongation complex (SEC) や Little elongation complex (LEC) と共役して、それぞれ異なる遺伝子群の転写を制御することを明らかとしてきた^{1,2,3,4}。最近の我々の解析によって、SEC と LEC が、MED26 を含むメディエーター複合体を介して RNA ポリメラーゼ II (Pol II) をそれぞれの液滴にリクルートし、特定の遺伝子群の発現を活性化することが明らかとなってきた。すなわち、(i) *c-Fos*、*c-Jun* や *EGR* などの血清応答性遺伝子や分化制御遺伝子は、刺激時に SEC の液滴が形成され発現が誘導されること、一方で、(ii) 複製依存性のヒストン遺伝子領域では、細胞周期の S 期に Cajal bodies (CBs) と Histone locus bodies (HLBs) の隣接する領域において LEC をコアとする液滴が形成され、発現が誘導されることが明らかとなってきた。この時、SEC と LEC の液滴に、MED26 を含むメディエーター複合体が Pol II をリクルートすることによって遺伝子発現を活性化する機構が明らかとなってきた。そこで、本研究では、細胞外からの刺激にตอบสนองして SEC と LEC のそれぞれの液滴に、MED26 を含むメディエーター・Pol II 複合体を引き寄せることで、特定の遺伝子群の発現を活性化する新規の転写制御機構について解明する。さらに、この機構が様々な組織幹細胞の増殖から分化への移行 (スイッチ) において果たす役割を解明し、MED26 の組織・個体における役割の解明を目指す。

方法

(i) *in situ* ビオチン化法によって MED26 が構成する液滴の構成因子を網羅的に同定する。

● *in situ* ビオチン化法によって、MED26 の液滴構成因子を網羅的に同定する。本方法では、MED26 の抗体を用いて、周辺の（半径 20 nm 以内）タンパク質を *in situ* でビオチン化する。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する。さらに、ビオチン化タンパク質と共に精製される non-coding RNA やゲノム DNA も網羅的に解明する。

(ii) さまざまな刺激によって、MED26 を含むメディエーター複合体が、SEC と LEC の液滴に Pol II をリクルートする機構を解明する。

● 野生型 MED26 と MED26-NTD に変異を有する変異型細胞を用いて、血清刺激時や細胞周期 S 期に MED26 を含むメディエーター複合体が Pol II を SEC や LEC の液滴にリクルートするのかを解明する。

● MED26 は 70% 以上の天然変性領域（IDR: Intrinsic Disordered Region）を含んでおり、液滴形成に関与することが明らかとなった。そこで、MED26 に dTAG（degradation TAG）を融合させた細胞を用いて、MED26 の急速な分解によって、細胞の増殖や分化刺激時、あるいは細胞周期の S 期に、SEC や LEC の液滴形成能がそれぞれ減弱するのかを解明する。

(iii) さまざまな組織幹細胞の増殖から分化への移行において、MED26 が果たす役割とその分子機構について解明し、MED26 の組織・個体における機能を明らかにする。

● 細胞の増殖から分化への移行時には、異なる遺伝子領域に SEC や LEC の液滴が形成され、MED26・メディエーター・Pol II 複合体が異なる遺伝子領域にリクルートされ、遺伝子発現を促進すると考えられる。そこで、iPS（induced Pluripotent Stem cell）細胞を用いた細胞分化システムを用いて、分化前と分化後に形成される SEC や LEC の液滴の遺伝子領域や MED26・メディエーター・Pol II 複合体がリクルートされる遺伝子領域を *in situ* ビオチン化法によって同定する。

● 作製済みの MED26 コンディショナルノックアウトマウスを各種 Cre マウスと交配させ、様々な組織由来（精巣、卵巣、造血、神経、肝臓など）の幹細胞で MED26 をコンディショナルにノックアウトする。幹細胞の増殖から分化への移行時に、MED26 が必須であるのかについて解明する。

結果および考察

本研究によって、MED26 を含むメディエーター複合体は液-液相分離によって核内で”場”（液滴）を形成し、そこで腫瘍関連遺伝子やストレス応答性遺伝子の転写を統合的に促進することが明らかとなった（論文投準備中）。また、ヒトパピローマウイルス感染によって引き起こされる子宮頸がん細胞においては、MED26 と SEC が *c-Myc* 遺伝子の上流においてスーパーエンハンサーと呼ばれる液滴を形成し、子宮頸がん細胞の増殖を促進する機構も明らかとなった¹⁾。今後、MED26 による転写制御機構の充進が腫瘍性疾患を引き起こすメカニズムを明らかにする。

また、液滴による転写制御機構の解明のために、液滴や凝集体の構成因子を網羅的に同定する新規の手法として、*in situ* ビオチン化法の開発を行った^{2,3)}。この手法を用いて核内構造体 Cajal body や核小体、 γ H2AX の構成因子の解析を行ったところ、既知の因子に加えて、多くの新規因子を同定することができた。現在、*in situ* ビオチン化法を駆使して、MED26 の液滴構成因子の網羅的同定を行っている（論文投稿準備中）。

受精卵の初期胚を用いた解析も行ったところ、MED26 は初期杯の発生にも重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。また、MED26 は精巣や卵巣で発現が高く、MED26 のコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析によって、MED26 は精巣幹細胞や卵巣幹細胞における分化にも重要な役割を果たす可能性がわかってきた。今後は不妊医療も見据えた研究も展開していく予定である。

(完)

発表論文

- 1) Furugori K, Suzuki H, Abe R, Horiuchi K, Akiyama T, Hirose T, Toyoda A, Takahashi H*: Chimera RNA transcribed from integrated HPV18 genome with adjacent host genomic region promotes oncogenic gene expression through condensate formation. *Genes to Cells*, 29(7):532-548. 2024
- 2) Noguchi K, Suzuki H, Abe R, Horiuchi K, Onoguchi-Mizutani R, Akimitsu N, Ogawa S, Akiyama T, Ike Y, Ino Y, Kimura Y, Ryo A, Doi H, Tanaka F, Suzuki Y, Toyoda A, Yamaguchi Y, and Takahashi H*: Multi-omics analysis using antibody-based in situ biotinylation technique suggests the mechanism of Cajal body formation. *Cell Reports*, 43(9) 114734-114734, 2024
- 3) Suzuki H, Li K, Ito S, Asano K, Noguchi K, Abe R, Takahashi H*: Protocol for identifying components of subcellular compartments by antibody-based in situ biotinylation. *STAR Protocols*, in press.

引用文献

- 1) Takahashi H, Parmely TJ, Sato S, Tomomori-Sato C, Banks CA, Kong SE, Szutorisz H, Swanson SK, Martin-Brown S, Washburn MP, Florens L, Seidel CW, Lin C, Smith ER, Shilatifard A, Conaway RC, Conaway JW*: Human Mediator Subunit MED26 Functions as a Docking Site for Transcription Elongation Factors. *Cell*, 146(1), 92-104, 2011
- 2) Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S*: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. *Nat Commun*, 6, 5941, 2015
- 3) Takahashi H*, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, 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*: The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination. *Nat Commun*. 11(1):1063. 2020
- 4) Suzuki H, Abe R, Shimada M, Hirose T, Hirose H, Noguchi K, Ike Y, Yasui N, Furugori K, Yamaguchi Y, Toyoda A, Suzuki Y, Yamamoto T, Saitoh N, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway R.C., Conaway W.J., Takahashi H*: The 3' Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies. *Nat Commun*. 13(1), 2905, 2022