

氏 名	やまもと せいじ 山本 誠司
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	富医薬博乙第 66 号
学位授与年月日	平成 29 年 4 月 19 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当
学 位 論 文 題 目	転写開始複合体とメディアエーター複合体による協調的な転写制御機構の検討 (Studies on cooperative transcriptional regulations by preinitiation complex and mediator complex)
論 文 審 査 委 員	
(主査)	教 授 櫻井 宏明
(副査)	教 授 今中 常雄
(副査)	准教授 廣瀬 豊（紹介教員）

論文内容の要旨

真核生物では、タンパク質をコードする遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が担っている。この Pol II による転写の際は、遺伝子配列の上流にあるプロモーター上に 5 種類の基本転写因子 (TFIIB、-D、-E、-F、-H) が集まり、Pol II と共に転写開始複合体を形成することが必要である。最初に TFIID が、遺伝子プロモーター上の TATA ボックスに結合し、次に TFIIB がリクルートされる。さらに、TFIIF と Pol II が転写開始点周辺へリクルートされ、最後に TFIIE と TFIIH がリクルートされる。TFIIH は TFIIE の存在下、DNA ヘリカーゼ活性を介して転写開始点周辺のプロモーターを 1 本鎖 DNA に開裂させる。この時 TFIIH が Pol II をリン酸化し、転写が開始すると考えられている。一方、転写活性化因子に依存的な転写は、基本転写因子と Pol II のみでは再現できず、転写活性化因子と転写開始複合体を形成する基本転写因子、Pol II の間を橋渡しする転写メディエーター複合体 (メディエーター) が必要であることが明らかになっている。さらに最近、細胞の分化は細胞特異的転写因子と一緒に、メディエーターとコヒーシンによって決定されることが明らかになり、その重要性が世界に認識されている。また生体のホメオスタシスの維持にも重要な役割を果たしていることが明らかになっている。このメディエーターは、真核生物に広く保存され、20 個以上のサブユニットで構成された大きな複合体で、Head、Middle、Tail、CDK/Cyclin の 4 モジュールよりなる。中でも CDK8 とその脊椎動物オースログ CDK19 (以下、CDK8/19 と記す) は、キナーゼ活性を有し、CDK/Cyclin モジュールに属して、転写において活性化および抑制という相反する機能を持つことを当研究室では報告している。

そこで本研究では、遺伝子発現の際のメディエーターと転写開始複合体による協調的な機構について研究した。まず転写開始複合体に着目し、転写開始と、開始から伸長への移行段階における TFIIE の役割をヒト TFIIE の欠失変異体およびヒトと線虫 TFIIE の違いを利用して検証した。そして、ヒトと線虫の転写活性化補助因子 PC4 を用いて TFIIE と PC4 の転写開始から伸長への移行期の役割をみいだした。またもう一つの基本転写因子 TFIIF に着目し、転写開始複合体形成時の TFIIE と TFIIF の立体構造上の位置関係を明らかにした。次に細胞外シグナルからの遺伝子発現の際の転写活性化因子、メディエーター、転写開始複合体による転写制御モデルとして非メチル CpG 核酸を認識して自然免疫を活性化する受容体 TLR9 に着目し、炎症反応時のサイトカイン発現におけるメディエーターキナーゼ CDK8/19、転写活性化因子、転写開始複合体の協調的制御機構の解析を行った。

1. 転写開始複合体形成時の TFIIE を介する転写開始から伸長への移行の制御

基本転写因子 TFIIE は、 α と β の 2 つのサブユニットのヘテロ 2 量体として存在している。この TFIIE は、転写開始から伸長段階への移行に重要な役割を担っ

ているが、詳細な機能は未知であった。そこで TFIIIE の β サブユニットの欠失変異体を作製し、*in vitro* 転写アッセイを行なった。その結果、C 末端側の 227 アミノ酸が転写に必須であること、この領域が Pol II の CTD リン酸化に関与していることを明らかにした（参考 1）。

さらに線虫 cDNA ライブラリーから線虫 TFIIIE α (ceTFIIIE α)および β (ceTFIIIE β) をクローニングし、ヒト TFIIIE α (hTFIIIE α)、 β (hTFIIIE β)と機能的に相補するかを検討した。その結果、予期せぬことに、ceTFIIIE β は hTFIIIE β と転写機能的に相補するが、ceTFIIIE α は hTFIIIE α と相補しなかった。そこで *in vitro* 結合実験を行い、ceTFIIIE α および ceTFIIIE β とヒト基本転写因子や TFIIF のサブユニットとの結合特異性を hTFIIIE α と hTFIIIE β と比較したところ、ceTFIIIE β は hTFIIIE β と同等の結合特異性を示したが、ceTFIIIE α は hTFIIIE β との結合が非常に弱いことが明らかになった。また、Pol II の C 末領域(CTD)のリン酸化を 2 番目セリン(Ser2)および 5 番目セリン(Ser5)のリン酸化に特異的な抗体を用いて調べたところ、天然型 hTFIIIE β は Ser2 と Ser5 の両方をリン酸化することができたが、ceTFIIIE β は Ser2 のリン酸化は正常であったが、Ser5 のリン酸化が弱いことが分かった。この時、直鎖状の DNA 鋳型を用いて転写開始から伸長への移行を調べたところ、ceTFIIIE β は、伸長段階への移行活性が弱かった。これらのことから、TFIIIE を介した Pol II CTD の Ser5 リン酸化が転写開始から伸長への移行段階に重要であることが示された（参考 2）。

次に、転写活性化補助因子である PC4 の線虫ホモログの解析を行ない、PC4 は転写活性化因子の転写開始複合体へのリクルートを助けるだけでなく、Pol II の転写そのものに対しても機能しており、その時期は TFIIIE β の C 末端領域の直接的な結合により転写開始から伸長への移行期であることを証明した（参考 3）。一方、TFIIF も TFIIIE と協調して転写開始と開始から伸長への移行期に機能しているが、その溶液での構造解析から転写開始複合体形成時には TFIIIE と TFIIF が Pol II を挟んで反対側に位置していることが転写開始時の転写開始複合体形成に重要であることを明らかにした（参考 4）。

2. TLR9 刺激時のメディエーター複合体 CDK/Cyclin モジュールと転写開始複合体による炎症関連遺伝子の協調的な転写制御

メディエーター複合体（メディエーター）は細胞外からの刺激に対し、クロマチンと転写装置を橋渡しすることで遺伝子発現を制御する。メディエーターの中でも CDK/Cyclin モジュールは、Pol II CTD の Ser5 リン酸化活性を有しており、転写において重要な役割を果たしている。そこでこの CDK/Cyclin モジュールに属し、その酵素活性を担う CDK8 とその脊椎動物オースログ CDK19 (CDK8/19)に着目し、TLR9 刺激による炎症応答に対する転写制御における CDK8/19 と TFIIIE を含めた転写開始複合体の役割を検証した。まず幾つかの細胞株で TLR9 を含めた TLR の発現を調べたところ、ミエローマ由来の RPMI8226 細胞で高い TLR9 発現が見られた。この RPMI8226 細胞を TLR9 アゴニストで刺激したところ、炎症関連遺伝子である *IL8*、*IL10*、*PTX3*、*CCL2* の高い発現が見られた。そこで siRNA で CDK8 および CDK19 をノックダウンしたところ、炎症関連遺伝子の発現の低下が見られた。また ChIP 解析により、炎症関連遺伝子のプロモーター上にメディエーター CDK8/19 と MED1、炎症関連の転写活性化因子 NF- κ B、C/EBP β 、基本転写因子 TFIIB、TFIIIE が共局在していた。以上のことから、細胞外刺激からの炎症応答

の際には CDK8/19 を含むメディエーターが転写活性化因子、基本転写因子と協調して転写を活性化する重要な機構が明らかになった（参考5）。

今回、上記 1 と 2 の研究から、遺伝子発現の際の転写活性化には、転写開始から伸長への移行期には転写開始複合体が形成された後、TFIIE を介した Pol II の CTD リン酸化が重要な役割を果たしていることや、PC4 と TFIIE が協調してこの移行段階に重要な役割を担っていること、転写開始複合体形成時には TFIIE と TFIIIF が Pol II をはさんで反対側に位置することが重要であることを明らかにすることができた。また細胞外からの様々な刺激に対しての特異的な遺伝子発現応答には、転写活性化因子と転写開始複合体のみでは不十分で、メディエーターのキナーゼ CDK8/19 がこれらを橋渡しして転写を制御していることを示すことができた。

【参考文献】

1. Okamoto, T., Yamamoto, S., Watanabe, Y., Ohta, T., Hanaoka, F., Roeder, R.G., and Ohkuma, Y. Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIE β subunit. *J. Biol. Chem.* 273(31): 19866-76 (1998)
2. Yamamoto, S., Watanabe, Y., van der Spek, P.J., Watanabe, T., Fujimoto, H., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. Studies of nematode TFIIE function reveal a link between Ser-5 phosphorylation of RNA polymerase II and the transition from transcription initiation to elongation. *Mol. Cell. Biol.* 21(1): 1-15 (2001)
3. Akimoto, Y., Yamamoto, S., Iida, S., Hirose, Y., Tanaka, A., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. Transcription cofactor PC4 plays essential roles in collaboration with the small subunit of general transcription factor TFIIE. *Genes Cells*, 19(12): 879-90 (2014)
4. Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Okuda, M., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. Structural characterization of human general transcription factor TFIIIF in solution. *Protein Sci.* 17(3): 389-400 (2008)
5. Yamamoto, S., Hagihara, T., Horiuchi, H., Okui, A., Wani, S., Yoshida, T., Inoue, T., Tanaka, A., Ito, T., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. Mediator Cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes Cells*, in press (2017)

学位論文審査の要旨

真核生物では、タンパク質をコードする遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が担っている。この Pol II による転写の際は、遺伝子プロモーター上に 5 種類の基本転写因子 (TFIIB, -D, -E, -F, -H) が集まり、Pol II と共に転写開始複合体を形成することが必要である。なかでも TFIIE は、TFIIH による DNA ヘリカーゼ活性と Pol II の C 末端領域 (CTD) リン酸化活性の両方を助けることによって、転写を開始させると考えられている。一方、転写活性化因子に依存的な転写は、転写開始複合体のみでは再現できず、転写活性化因子と転写開始複合体の間を橋渡しする転写メディエーター複合体 (メディエーター) が必要であることが明らかになっている。このメディエーターは、真核生物に広く保存され、Head, Middle, Tail, CDK/Cyclin の 4 モジュールよりなる。CDK/Cyclin モジュールに属する CDK8 とその脊椎動物オースログ CDK19 (CDK8/19) は、キナーゼ活性を有し、転写において活性化および抑制という相反する機能を持つことが報告されている。一方、遺伝子発現の際の転写開始複合体とメディエーターによる協調的な転写制御機構についてはいまだ未解明な点が多く残されている。

そこで本研究では、まず転写開始複合体に着目し、転写開始と、開始から伸長への移行期における TFIIE の役割をヒトと線虫の違いを利用して検証した。次に転写活性化因子、メディエーターならびに転写開始複合体による協調的な転写制御のモデルとして、自然免疫活性化受容体である TLR9 に着目し、炎症反応時のサイトカイン遺伝子発現制御機構の解析を行った。

1. 転写開始複合体形成時の TFIIE を介した転写開始から伸長への移行時の Pol II リン酸化の制御

基本転写因子 TFIIE は、 α と β の 2 つのサブユニットのヘテロ 2 量体として存在しており、転写開始から伸長段階への移行に重要な役割を担っているが、詳細な機能は未知であった。そこで TFIIE の β サブユニットの欠失変異体を用いて、C 末端側の 227 アミノ酸が Pol II の CTD リン酸化と転写の両方に関与していることを明らかにした。さらに線虫 TFIIE α (ceTFIIE α) および β (ceTFIIE β) をクローニングし、ヒト TFIIE α (hTFIIE α)、 β (hTFIIE β) と機能的に相補するかを検討した。その結果、ceTFIIE α は hTFIIE α を相補せず ceTFIIE β は hTFIIE β の転写活性を一部相補した。また、hTFIIE β は Pol II の CTD の 2 番目セリン (Ser2) と 5 番目セリン (Ser5) の両方をリン酸化することができたが、ceTFIIE β は Ser2 のリン酸化は正常であったが、Ser5 のリン酸化が弱いことが分かった。これらのことから、TFIIE を介した Pol II CTD の Ser5 リン酸化が転写開始から伸長への移行段階に重要であることが示された。次に、転写活性化補助因子である PC4 の線虫ホモログの解析を行ない、PC4 は転写活性化因子の転写開始複合体へのリクルートを助けるだけでなく、Pol II による転写開始から伸長への移行期にも機能していることを証明した。また TFIIF の溶液での構造解析から転写開始複合体形成時には TFIIE と TFIIF が Pol II を挟んで反対側に位置していることが転写開始時の転写開始複合体形成に重要であることを明らかにした。

2. TLR9 刺激時のメディエーターキナーゼと転写開始複合体による炎症関連遺伝子の協調的な転写制御

次に自然免疫活性化受容体TLR9刺激による炎症応答において、メディエーターキナーゼCDK8/19とTFIIEを含めた転写開始複合体が炎症関連遺伝子の転写制御に果たす役割をTLR9高発現ミエローマ由来細胞株RPMI8226細胞を用いて検証した。RPMI8226細胞をTLR9アゴニストで刺激したところ、炎症関連遺伝子である*IL8*、*IL10*、*PTX3*、*CCL2*の高い発現が見られた。そこでsiRNAによってCDK8およびCDK19をノックダウンしたところ、これら炎症関連遺伝子の発現低下がおこった。さらにChIP解析により、炎症関連遺伝子のプロモーター上にメディエーターCDK8/19とMED1、炎症関連の転写活性化因子NF- κ BとC/EBP β 、基本転写因子TFIIBとTFIIEが共局在していることを明らかにした。以上のことから、細胞外刺激からの炎症応答の際にはCDK8/19を含むメディエーターが転写活性化因子、基本転写因子と協調して転写を活性化する機構が明らかになった。

以上本研究は、転写活性化因子、転写開始複合体さらにメディエーター複合体が転写制御に果たす役割を分子レベルで明らかにした重要な基礎研究であると評価される。さらに本研究は、メディエーターCDK/CyclinモジュールサブユニットCDK8/19がTLR9からの刺激の際に炎症関連遺伝子の転写活性化に積極的に関与していることを明らかにしたものであり、自己免疫疾患や炎症関連疾患への創薬応用につながるものが期待される。

主査および副査は、申請者山本誠司氏に面接ならびに学力確認試験をおこなうと共に論文内容について審査を行い、博士（薬科学）の学位を授けるに価すると判定した。

1. Okamoto, T., Yamamoto, S., Watanabe, Y., Ohta, T., Hanaoka, F., Roeder, R.G., and Ohkuma, Y. Analysis of the role of TFIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of the TFIIE β subunit. *J. Biol. Chem.* 273(31): 19866-76 (1998)
2. Yamamoto, S., Watanabe, Y., van der Spek, P.J., Watanabe, T., Fujimoto, H., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. Studies of nematode TFIIE function reveal a link between Ser-5 phosphorylation of RNA polymerase II and the transition from transcription initiation to elongation. *Mol. Cell. Biol.* 21(1): 1-15 (2001)
3. Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Okuda, M., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. Structural characterization of human general transcription factor TFIIF in solution. *Protein Sci.* 17(3): 389-400 (2008)
4. Akimoto, Y., Yamamoto, S., Iida, S., Hirose, Y., Tanaka, A., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. Transcription cofactor PC4 plays essential roles in collaboration with the small subunit of general transcription factor TFIIE. *Genes Cells*, 19(12): 879-90 (2014)
5. Yamamoto, S., Hagihara, T., Horiuchi, H., Okui, A., Wani, S., Yoshida, T., Inoue, T., Tanaka, A., Ito, T., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. Mediator Cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes Cells*, 22(3):265-276 (2017)