

メディエーター複合体のキナーゼサブユニット
による転写制御機構の解析

富山大学大学院医学薬学教育部

薬科学専攻

遺伝情報制御学研究室

深澤 力也

目次

1. 序論.....	4
1.1 真核生物の転写制御機構	4
1.2 メディエーター複合体	5
レチノイン酸による転写制御とメディエーター.....	6
転写因子 C/EBP β による転写制御とメディエーター.....	7
ヒストン修飾とメディエーター.....	7
1.3 エピジェネティックな遺伝子発現制御	8
DNA メチル化.....	8
ヒストン修飾.....	9
エピジェネティックスと疾患.....	10
1.4 ポリコーム複合体	11
ポリコーム複合体による分化制御.....	11
1.5 本研究の目的.....	12
2. 結果.....	20
2.1 メディエーターCDK19 サブユニットの新規相互作用因子の探索	20
2.1.1 酵母 2 ハイブリッド法を用いた新規相互作用因子の探索	20
2.1.2 CDK 野生型組換えタンパク質を用いた <i>in vitro</i> 相互作用解析.....	20
2.1.3 CDK 欠失変異体組換えタンパク質を用いた <i>in vitro</i> 相互作用解析.....	21
2.1.4 HeLa S3 細胞核抽出液を用いた <i>in vitro</i> 相互作用解析.....	21
2.2 メディエーターCDK サブユニットによる転写制御を介した 分化制御機構の解析.....	22
2.2.1 PRC2 サブユニット EZH2 との <i>in vitro</i> 相互作用解析.....	22
2.2.2 CDK19 または CDK8 によるリン酸化標的としての EZH2 の検討	23
2.2.3 CDK19 または CDK8 による神経細胞分化に関連する レチノイン酸標的遺伝子の転写制御の解析	24
2.2.4 神経細胞分化時に起こるレチノイン酸標的遺伝子上における メディエーター複合体と PRC2 の局在解析	25
2.3 考察.....	28
2.4 メディエーター複合体のキナーゼサブユニットによる 転写抑制機構の解析.....	47
2.4.1 C/EBP β 標的遺伝子上における CDK19 または CDK8 の局在解析.....	47

2.4.2	CDK19 または CDK8 による C/EBP β 標的遺伝子の転写制御の解析	48
2.4.3	CDK8 または CDK19 が構成するメディエーター複合体の 新規相互作用因子の探索	48
2.4.4	PRMT5 および WDR77 との <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 相互作用解析	48
2.4.5	C/EBP β 標的遺伝子上における PRMT5, ヒストン H4R3 メチル化 および DNMT3A の局在解析	49
2.5	考察.....	50
3.	総括.....	62
4.	実験方法.....	64
4.1	酵母 2 ハイブリッド法.....	64
4.2	組換えタンパク質発現・精製.....	64
4.3	<i>in vitro</i> 相互作用解析.....	65
4.4	<i>in vivo</i> 相互作用解析.....	65
4.5	細胞培養.....	66
4.6	核抽出液調製.....	66
4.7	HF-CDK8 と HF-CDK19 が構成するメディエーター複合体の精製	67
4.8	<i>in vitro</i> リン酸化解析.....	67
4.9	RT-qPCR.....	67
4.10	クロマチン免疫沈降法.....	68
4.11	siRNA.....	70
4.12	抗体.....	70
5.	引用文献.....	72
6.	謝辞.....	81

1. 序論

1.1 真核生物の転写制御機構

転写反応は、あらゆる生物を問わず遺伝子発現制御の要であり、RNA ポリメラーゼによって行われている。原核生物の場合には、ひとつの RNA ポリメラーゼが全ての遺伝子の転写を担っており、単独で遺伝子プロモーター上の転写開始点から転写を行うことが出来る。これに対して、真核生物には3種類の RNA ポリメラーゼが存在し、それぞれ RNA ポリメラーゼ I (Pol I), II (Pol II), III (Pol III) と命名されている。Pol I は核小体に局在し、リボソーム RNA の転写を担っている (1)。Pol II は核質に局在し、タンパク質をコードする全ての遺伝子の mRNA に加えて、核内低分子 RNA (snRNA) や多くの非翻訳性 RNA (ncRNA) の転写を行う (2)。Pol III も核質に局在し、5S rRNA や転移 RNA (tRNA) に加えて、いくつかの小分子 RNA の転写を行う (3)。このように、真核生物の RNA ポリメラーゼは、それぞれが役割分担を行うことによって様々な遺伝情報を効率良く転写している。しかしながら、真核生物の RNA ポリメラーゼはそれら単独では特異的な DNA 配列を認識して結合する能力を有しておらず、配列特異的な転写開始には多くのタンパク質と転写開始能を有する複合体を形成する必要がある。なかでも Pol II の転写制御には巨大なタンパク質複合体が幾つも必要とされており、これらが Pol II の活性を時間的空間的に複雑に制御している。

Pol II は RPB1 から RPB12 と名付けられた 12 個のサブユニットから構成されており、これらの内、RRB5, RPB6, RPB8, RPB10 および RPB12 の 5 サブユニットは Pol I と Pol III の共通サブユニットである。Pol II の RPB1 には Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 の 7 アミノ酸から成る C 末端領域の繰り返し構造 (CTD) が存在し、CTD は酵母では 26 回、ヒトでは 52 回の繰り返しを持つ (4)。特に転写サイクルの各過程で CTD がリン酸化を受けることで Pol II の機能が制御されていることが明らかになっており、CTD のリン酸化は様々なリン酸化酵素や脱リン酸化酵素によって協調的に制御されている (5)。一般的には、CDK7 による 5 番目セリンのリン酸化が転写の開始と mRNA キャッピング酵素のリクルートに関わり、その後 CDK9 による 2 番目セリンのリン酸化が転写伸長状態への移行と mRNA の 3' 末端プロセシング因子のリクルートに関わると考えられている (6)。また、7 番目セリンは、5 番目セリンと同様に CDK7 によって転写開始段階でリン酸化され、snRNA の転写に必要であると考えられている (7)。

Pol II の転写を制御するのに必要な基本転写因子 (General Transcription Factor, GTF) は、TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF および TFIIF とそれぞれ名付けられた 5 つが存在する。これ

らの GTF と Pol II は、段階的に遺伝子プロモーター上で会合し、転写開始前複合体 (PIC) を形成することで活性化され、正確な転写を開始する (図 1A)。まず、TFIID によるコアプロモーターの TATA ボックスへの結合が引き金となり、次に TFIIB がプロモーター認識と TFIID との直接的な結合を介してリクルートされる。さらに、TFIIF と Pol II が正確な転写開始点へとリクルートされる。その後 TFIIE と TFIIH がリクルートされ、TFIIE 依存的に TFIIH の DNA ヘリカーゼ活性を介して転写開始点近傍でプロモーターが開裂する。その際同時に TFIIH のサブユニットである CDK7 によって CTD の 5 番目セリンがリン酸化を受けて転写が開始すると考えられている (8) (図 1B)。

1.2 メディエーター複合体

1990 年代前半に、精製タンパク質を用いた試験管内転写再構成系において、5 種類の基本転写因子と Pol II のみでは転写活性化因子依存的な転写を再現できないことが示され、転写活性化シグナルを転写開始複合体へと橋渡しする因子として同定されたのがメディエーター複合体 (メディエーター) である (9) (図 2A)。メディエーターは後に、酵母からヒトまでの真核生物間で広く保存されることがわかった (10)。ヒトのメディエーターは約 30 個のサブユニットから構成されるが、サブユニットは種特異的なものも存在する (表 1)。また、構造学的研究から、head, middle, tail および CDK/Cyclin という 4 つのサブモジュールから構成されると考えられている (10,11) (図 2A)。特に、head, middle, tail の 3 つのモジュールから構成されるコア・メディエーター、または、コア・メディエーターに CDK/Cyclin モジュールを含むホロ・メディエーターの 2 つの状態で存在すると考えられている (12)。

各サブモジュールの機能的特徴として、tail モジュールは様々な DNA 結合性の転写活性化因子と相互作用することで転写制御シグナルのインプットに関わると考えられている (13)。また、head モジュールは Pol II や GTF との直接的な相互作用を介して PIC を遺伝子プロモーター上にリクルートすると考えられている (14)。そして middle モジュールの機能は詳細に解析されていないが、tail モジュールからインプットした転写制御シグナルを head モジュールに伝達する役割を果たしていると考えられている (図 2B)。メディエーターは転写活性化因子との相互作用により、様々な立体構造を取ることが電子顕微鏡を用いた構造解析等から明らかになっており、相互作用する転写活性化因子によって異なるコファクターとの相互作用にも繋がっている (15)。このことは、メディエーターが単一的なものではなく、柔軟性を持って遺伝子発現制御に関わ

ると考えられている (表 2)。最近では、転写活性化因子と転写開始複合体間のタンパク質間相互作用によるシグナル伝達を越えて、遺伝子ループ構造の形成や ncRNA との相互作用を介して転写開始に関わることが報告されており、さらに転写開始だけでなく転写伸長や転写終結、RNA プロセッシングにも関わることが報告されている (16-21)。

CDK/Cyclin モジュールはメディエーター中で唯一のキナーゼ活性を持つと考えられる CDK8 または CDK19 を有している (22)。CDK8 と CDK19 はパラログで相互排他的関係にあり、CDK8 は酵母からヒトまでの真核生物間で保存されているのに対し、CDK19 は脊椎動物にのみ存在する (23)。特に、ヒト CDK8 とヒト CDK19 では N 末キナーゼ活性領域の 350 アミノ酸の約 90%、C 末側約 100 アミノ酸の約 50% が一致しており、両者に共通した遺伝子発現制御を行うと考えられてきたが、これら 2 つの CDK が果たす機能の分子機構は詳細にされていない。

レチノイン酸による転写制御とメディエーター

レチノイン酸 (RA) は、細胞増殖をはじめ、発生や分化、免疫応答などの多様な生物学的機能に必要とされる生理活性物質である。RA は、核内受容体の一つであるレチノイン酸受容体 (RAR) のリガンドとして機能し、RA 標的遺伝子の転写を制御している。その際、RAR はレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロダイマー (RAR/RXR) を形成することで、標的遺伝子のプロモーター内に存在するレチノイン酸応答配列 (RARE) と呼ばれる DNA 配列を認識する。RAR/RXR による RARE の認識に RA は必要とされず、RA 非存在下において RAR/RXR は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を含むコリプレッサー複合体をリクルートすることにより標的遺伝子の転写抑制に働いている。一方、RA が結合すると RAR/RXR は、RARE 認識を強めるような構造変換を通じてコリプレッサー複合体を解離した後、SRC/p160 ファミリータンパク質を始めとするヒストンアセチル化酵素 (HAT) 複合体をリクルートすることにより標的遺伝子の転写活性化に働いている (24)。胚性がん細胞 (EC) や胚性幹細胞 (ES) のような未分化状態を維持する細胞は、RA シグナル経路を介した分化関連遺伝子の遺伝子発現の制御により神経細胞や骨格筋細胞等の多様な体細胞系列へと分化する (25,26)。

メディエーターは様々な核内受容体依存的な転写制御に関与しており、RA 標的遺伝子の転写制御には MED1 および MED25 サブユニットが RAR/RXR との直接的な相互作用を介して転写活性化を促すことが報告されている (27,28)。この過程では、RA による転写誘導時に、RAR/RXR と MED1 との相互作用を介してホロ・メディエーターの構造変換が起こることで、CDK/Cyclin モジュールが遺伝子プロモーター上から解離する

ことで転写の活性化を促す。一方、CDK8 による転写抑制機構は、メディエーターと Pol II 間の相互作用を CDK/Cyclin モジュールが立体的に障害することで転写活性化シグナルの伝達を妨げる機構や TFIID の Cyclin H サブユニットのリン酸化を介した TFIID の CTD リン酸化阻害による機構がこれまでに提唱されているが (29,30)、メディエーター-CDK による RA 標的遺伝子の詳細な転写抑制機構は明らかにされていない。

転写因子 C/EBP β による転写制御とメディエーター

C/EBP β は CCAAT/enhancer binding protein ファミリーに属する転写活性化因子であり、急性期の免疫応答、発がんや細胞増殖、また、細胞分化を制御する転写活性化因子として知られている (31-33)。C/EBP β はホモダイマーを形成して標的 DNA 配列を認識する。C/EBP β には翻訳開始部位の変化によって発現制御される 3 つのアイソフォームが存在し、それぞれ p38、p33、p20 (またはそれぞれ Liver Activating protein*(LAP*)、LAP そして Liver inhibitory protein (LIP)) と呼ばれている。細胞内で主に発現しているのは LAP と LIP の 2 つであり、LAP には転写活性化に必要な TAD (Transcriptional activation domain) が存在しているが LIP にはこの領域が欠損しており転写抑制に関与している (32)。また、C/EBP β は様々な翻訳後修飾を受けることが知られており、MAPK によりヒトの C/EBP β の 235 番目のスレオニンがリン酸化されることが知られており、このリン酸化によってメディエーター-MED1 サブユニットとの相互作用が活性化することが知られている (34,35)。

ヒトの細胞内では C/EBP β は幾つかの遺伝子プロモーター上に結合することが知られており、MAPK の活性化でそれらの遺伝子の転写を活性化する (36)。この転写制御過程において、C/EBP β の活性化と同時にプロモーター上より CDK8 が解離することが報告されている。また、MAPK によってリン酸化されていない C/EBP β は CDK8 を含むメディエーターと相互作用し、リン酸化された C/EBP β は CDK8 を含まないメディエーターと相互作用することが報告されている (37)。このように C/EBP β のリン酸化状態の変化によって引き起こされる標的遺伝子の発現制御においても、メディエーターの構造変化もしくはサブコンプレックスの交換が起こっていると考えられる。しかし、非リン酸化型の C/EBP β による転写抑制状態下での CDK8 の果たす役割やメディエーターの変化が標的遺伝子の転写制御機構に与える影響は解明されていない。

ヒストン修飾とメディエーター

メディエーターは Pol II や基本転写因子に加えて、様々な転写制御因子と相互作用す

ることが報告されているのに対して、ヒストン修飾因子やクロマチン構造変換因子との相互作用はあまり報告されていない。これまでの報告では、ヒストン H3 の 9 番目リジンに特異的なメチル化酵素である G9a と MED12 サブユニットが相互作用し、非神経性細胞での神経特異的な遺伝子発現を抑制していることや、CDK8 を含むホロ・メディエーターが HAT 複合体 STAGA の構成因子である TRRAP と GCN5L と協調的にヒストン H3 の 14 番目リジンのアセチル化に関わることが知られている (38,39)。また、ヒストン修飾酵素との相互作用因子を介さずに、CDK8 が *in vitro* で MED12 サブユニット依存的にヒストン H3 の 10 番目セリンのリン酸化を行うことが報告されている (40)。したがって、転写制御の中核を成すメディエーターとクロマチン制御との関係性を明らかにすることは、転写制御とクロマチン制御の包括的な分子機構の理解に繋がると考えられる。

1.3 エピジェネティックな遺伝子発現制御

遺伝情報を有する DNA は、4 種類のヒストン (H2A, H2B, H3 および H4) が 2 つずつ会合したヒストン八量体と共にヌクレオソーム構造を形成しており、この構造変換によって遺伝情報発現は制御されている。その際、DNA 配列の変化を伴わない後天的な遺伝子発現制御、すなわち、エピジェネティックな遺伝子発現制御が働くことによりクロマチン構造変換が行われている。このエピジェネティックな遺伝子発現制御において特徴的なのは、これらが可逆的な反応であり、細胞周期を通じて伝達されることにある (41)。さらに、遺伝子発現制御は様々なエピジェネティックな制御機構が関与しており、これらを代表するのが DNA メチル化とヒストン修飾である。

DNA メチル化

DNA メチル化は、ゲノム上のシトシンの次にグアニンが並ぶ 2 塩基配列が連続する CpG アイランドにおいて高頻度に観察され、一般的には転写抑制に関わることが知られている。DNA メチル化反応は DNA メチルトランスフェラーゼである DNMT ファミリーによって担われており、新規のメチル基転移反応は DNMT3A や DNMT3B が行い、細胞周期間の DNA 複製時には DNMT1 がその維持に関わる (42,43)。転写において DNA メチル化は、3 つの方法で転写に影響を与えられている。一つ目は、転写因子の遺伝子プロモーター上への結合を変化させることで、二つ目は、メチル化 CpG 結合ドメインを含むタンパク質 (MBD) の遺伝子プロモーターあるいは遺伝子領域への結合を変化させること。そして三つ目は、メチル化 DNA それ自身によりクロマチン構造を

変換させることである (44-46)。

また、ヒトの遺伝子の約 60%がプロモーターもしくは転写開始点 (TSS)付近に CpG アイランドを有している。これまでは、TSS 付近の CpG アイランドに焦点を当てた解析がほとんどであったが、近年のゲノムワイドな手法を用いた解析から、遺伝子内領域の DNA メチル化が転写伸長を阻害するよりもむしろ促進することやスプライシング機構にも関与することが報告されている (47,48)。

ヒストン修飾

クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームは、147 塩基対の DNA がヒストン八量体を取り巻く構造体を示し、ヒストンは C 末側が球状の構造を取るのに対して、N 末側はヒストンテイルと呼ばれる突出した鎖上の構造を形成している (49) (図 3A)。ヒストンテイルは、リジン残基のアセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO 化、アルギニン残基のメチル化や脱イミノ化、セリンおよびスレオニン残基のリン酸化、グルタミン酸残基の ADP リボシル化、プロリン残基の異性化という多数の翻訳後修飾を受けることでクロマチン構造変換を介した転写制御に関与している。これらはヒストンコードとも呼ばれ、特定のアミノ酸残基が受ける翻訳後修飾が特定の転写制御を引き起こすことが提唱されている (図 3B)。中でも機能的によく解析されているのはヒストン H3 リジン残基のメチル化制御機構である。リジン残基のメチル化は、メチル化を受ける残基の位置と入るメチル基の量によってその転写制御が異なることが知られている。また、一つの HAT が様々なリジン残基のアセチル化に関わるのに対して、配列特異的なメルトランスフェラーゼが多数同定されていることから、非常に厳密な制御機構が働いていると考えられる。例えば、ヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化 (H3K27me3) は、ポリコーム複合体の一つである PRC2 を構成する EZH2 または EZH1 によって行われ、転写を抑制する (50,51)。また、ヒストン H3 の 36 番目リジンのトリメチル化 (H3K36me3) は、酵母では Set2、ヒトでは SMYD2 によって行われ、転写伸長や遺伝子コード領域から起こるクリプティック転写を制御すると考えられている (52,53)。

さらに近年では、ヒストンのリジン残基の修飾状態に加えて、アルギニン残基のメチル化とその制御機構が注目を受けている。アルギニン残基はモノメチル化と対称的なジメチル化 (SDMA) もしくは、非対称的なジメチル化 (ADMA) の 3 つのメチル化状態を取りうる (54)。これに対応してアルギニン残基をメチル化するプロテインアルギニンメルトランスフェラーゼ (PRMT) もタイプ I、タイプ II、タイプ III そしてタイプ IV に分けられており、タイプ I が ADMA を、タイプ II が SDMA を導入する (55)。ヒス

トンのアルギニン残基のメチル化は、その修飾を認識するリーダー因子および脱メチル化酵素ともにあまり多くを知られておらず、機能はよくわかっていない。しかし、具体的な機構は未知ではあるが、タイプ I の PRMT である PRMT1 の発現低下が ADMA である H4R3me2s の低下を引き起こし、ヒストンテイルのアセチル化を低下させることが知られている (56)。また、SDMA である H4R3me2s は、DNA メチル化酵素である DNMT3A によって認識されてことや転写量が比較的少ない遺伝子のコーディング領域で多いことが知られている (57,58)。このように、ヒストンテイルのアルギニン残基のメチル化を含め、タンパク質メチル化修飾には解析の余地が多く残されている。

さらに、それぞれのヒストン修飾間のクロストークが存在する。例えば、H3K27me3 と H3K36me3 の修飾状態は互いに拮抗することや、H3S28 のリン酸化は H3K27me3 を阻害し、H3K27 のアセチル化を促進すると考えられている (59,60)。加えて、各ヒストン残基の修飾に対応するヒストン脱修飾因子も同定されている (表 3)。そして、遺伝子上におけるヒストン残基の修飾状態は転写の状態と相関があり、修飾因子と脱修飾因子によって厳密な転写制御が行われている (図 3C)。これらのことから、競合的なヒストン修飾の制御は、可逆的なエピジェネティックな遺伝子発現制御を可能にし、生物の複雑性を増すにつれてより高度な遺伝子発現制御を獲得してきたと考えられる。

エピジェネティクスと疾患

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、正常な発生や細胞分化を制御する一方で、その遺伝子発現制御の破綻はがんをはじめとする様々な疾患に関わることが知られている。DNA メチル化を行う DNMT3A においては、DNMT3A 遺伝子のフレームシフト変異やナンセンス変異が急性骨髄性白血病患者でみられ、生存率の低下に繋がることが報告されている (61)。H3K27me3 修飾を行う EZH2 は、転移性の前立腺がんにおいて過剰発現しており、細胞周期に関わる遺伝子の転写抑制を介して細胞増殖を制御していると報告されている (62)。また、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫患者では、EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性を示す SET ドメイン中にアミノ酸の点変異が報告されており、この変異は H3K27me3 活性が減少している (63)。

既に、これらに対する選択的阻害剤が開発されており、中には臨床利用されているものも存在するが、これらの選択的阻害剤が生体内において働くメカニズムを完全に理解されてはいない (64,65)。そのため、これら阻害剤の臨床応用にはエピジェネティックな遺伝子発現制御を分子レベルで理解することが適切な治療薬としての使用には必要不可欠であると考えられる。

1.4 ポリコーム複合体

エピジェネティックなヒストン修飾を介して転写制御に関わる代表的な因子としてポリコーム群 (PcG)タンパク質が知られている。PcG タンパク質は *Hox* 遺伝子の転写抑制因子としてショウジョウバエで同定され、植物を含めて後生動物間で保存されている (66,67)。PcG タンパク質は転写抑制複合体 (PRC)を構成しており、PRC1 と PRC2 の2種類のサブタイプがこれまでに同定されている (図 4A)。PRC1 は、クロモドメインボックスを持つ CBX ファミリー (CBX2, 4, 6-8), PCGF ファミリー (PCGF1-6), RING ファミリー (RING1a, RING1b)および HPH ファミリー (HPH1-3)をコアサブユニットとして構成されており、RING1a または RING1b の E3 リガーゼ活性によるヒストン H2A の 119 番目リジンのモノユビキチン化を介して転写抑制に関わっている (68)。また、PRC2 は、H3K27 に対するヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する EZH2 または EZH1 を含み、その他に SUZ12 や EED, RbAp48 をコアサブユニットとして含んでいる (図 4B)。それぞれのサブユニットの役割は、SUZ12 が EZH2 のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を制御しており、EED は SUZ12 と同様にヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を制御することに加えて、WD40 ドメインを介して H3K27me3 を認識し、遺伝子上への PRC2 リクルートを行うことで隣接したヌクレオソームに H3K27me3 を伝播させると考えられている (69,70)。しかし、PRC2 の遺伝子上へのリクルートメント機構については、ショウジョウバエでポリコーム応答配列と呼ばれるシスエレメントや DNA 結合性のリクルート因子が同定されている一方で、これらは哺乳類の細胞を用いた解析からは見出されていない (71)。代わりに、CpG アイランドや PRC2 のアフィニティー精製により同定された様々な相互作用因子群、さらに近年では生化学的な解析から幾つかのノンコーディング RNA が PRC2 の遺伝子上へのリクルートに関わることが報告されているが、細胞内においてこれらによる PRC2 リクルートメント機構がどのように働いているかは完全に理解されてはいない (72-74)。

ポリコーム複合体による分化制御

PRC2 は発生や分化に転写レベルで関与しており、適切な発生や分化には PRC2 による転写制御が必須であると考えられる。PRC2 を構成する EZH2 が欠損した ES 細胞では、自己複製能は維持している一方で、適切に分化できなくなることが知られている。これは、分化時に未分化マーカーを発現抑制できずに、中内胚葉分化に関わる遺伝子の抑制状態が解除できなくなるためだと考えられる (51,69)。さらに、ノックアウトマウ

スを用いた解析から、個体レベルでは *SUZ12*, *EZH2* または *EED* 遺伝子のノックアウト胚はそれぞれ着床前の段階で胎生致死になることが報告されている (69,75,76)。

また、PcG 複合体の機能解析には、神経系や造血系などの分化系列が限定された組織幹細胞も用いられている。神経前駆細胞の運命決定は発生段階に伴って、ニューロンやアストロサイトへの分化へと分化するが、*EZH2* および *EED* は大脳の発生後期段階において *Ngn1/2* 遺伝子の転写抑制に働いており、ニューロンへの分化を抑制することで、アストロサイトへの分化に関与することが報告されている (77)。

さらに、iPS 細胞作製時に見られる体細胞リプログラミングにおいても PRC2 との関係性が報告されており、PRC2 の機能をサポートすると考えられている *JARID2* や *PCL2* (Polycomb-like 2) のようなアクセサリタンパク質の欠損により神経芽細胞から iPS 細胞への誘導効率が減少する (78)。それに対して、PRC2 サブユニットの過剰発現はリプログラミングを促進すると報告されており、これは PRC2 による多能性遺伝子の発現制御を介して行われていると考えられる (79,80)。このように、PRC2 は転写抑制を介して細胞の分化や自己複製能の維持、リプログラミングと密接に関与することが明らかにされているが、遺伝子上へのリクルート機構は解析の余地が多く残されている。

1.5 本研究の目的

以上のような背景のもと、CDK8 を介したメディエーターによる転写制御機構の解析は進みつつあるが、CDK19 に着目した解析はほとんど行われておらず、CDK19 による遺伝子発現制御をはじめ 2 つの CDK 間における機能的な違いに関する情報は極めて少ない。これまでに当研究室において、CDK8 はヒトの組織で普遍的に発現しているのに対し、CDK19 は組織により発現の仕方が異なるという発現特異性、CDK8 と CDK19 はそれぞれどちらかが CDK サブユニットとしてメディエーターに含まれるという相互排他性、さらに、ある遺伝子の転写制御において CDK8 は活性化に CDK19 は抑制に働くという機能性の 3 点について違いが存在することを見出してきた (23,81)。これらは、CDK19 と CDK8 による共通の遺伝子発現制御も存在する一方で、CDK8 または CDK19 に特異的な遺伝子発現制御が存在する可能性が示唆される。特に、脊椎動物のみに備わる CDK19 にこそ特異的な遺伝子発現制御が存在する可能性が強く示唆される。そこで、CDK19 を介したメディエーターによる遺伝子発現制御および CDK19 が転写レベルで果たす生理的機能の解明を目的に、転写制御における CDK19 の機能解析を行った。

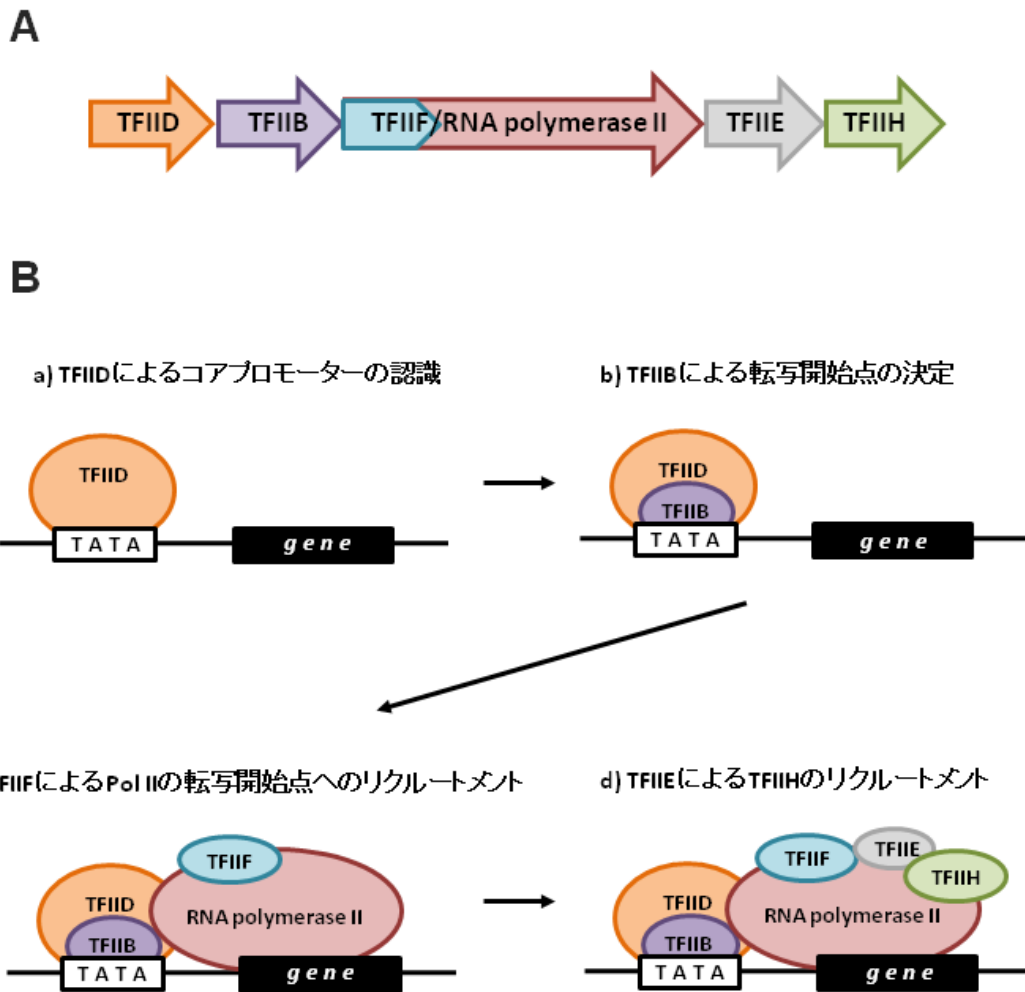
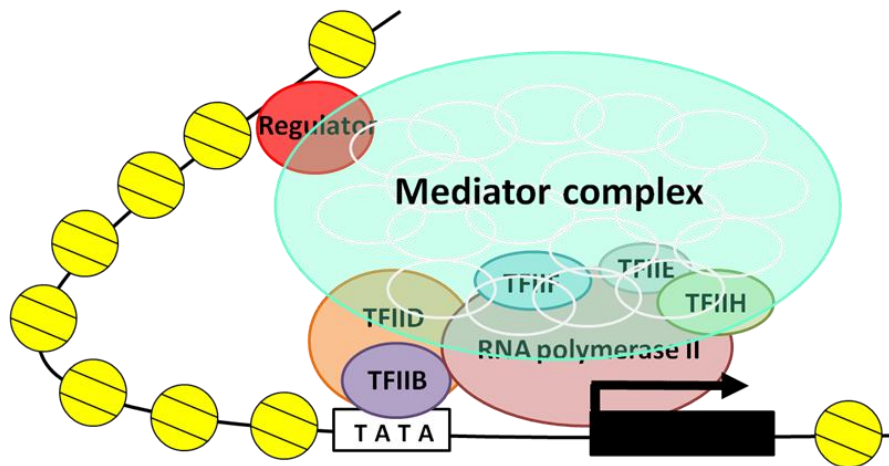


図 1. RNA ポリメラーゼと 5 種類の基本転写因子からなる転写開始機構

(A) 転写開始複合体形成の流れ。

(B) 転写開始複合体形成は、TFIID によるコアプロモーターの認識から始まり、TFIIB が正確な転写開始点を決定した後、TFIIF 依存的に Pol II がリクルートされ、最後に TFIIE 依存的な TFIIH のリクルートにより転写開始複合体が完成する。

A



B

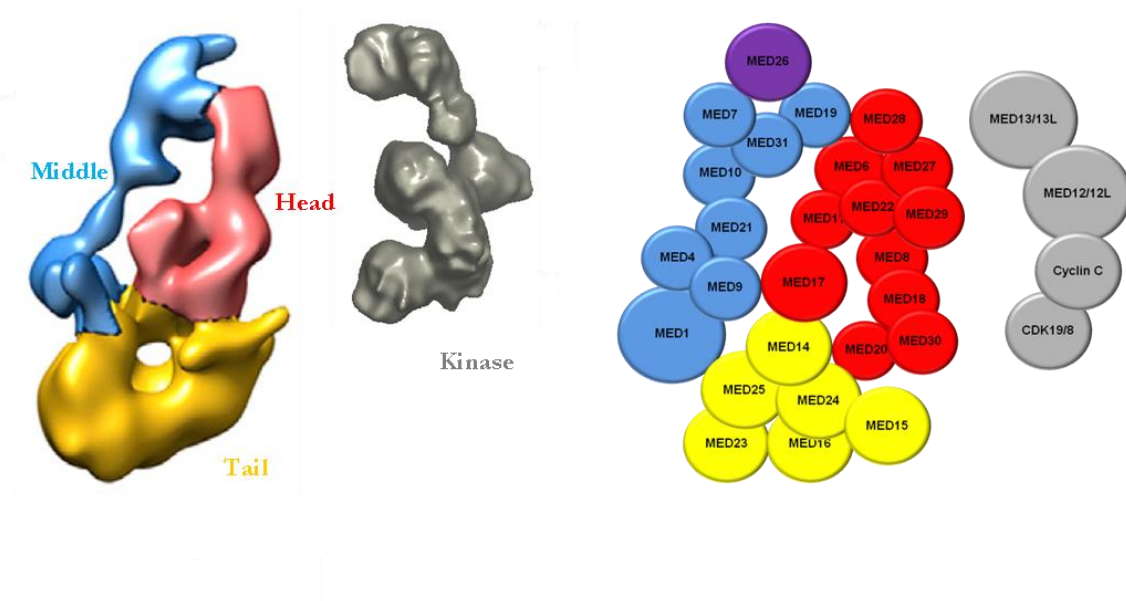


図 2. メディエーター複合体

- (A) メディエーター複合体による転写制御機構の模式図。メディエーター複合体は、DNA 結合性の転写制御因子と Pol II を含む転写開始複合体の橋渡しを行うことで、転写制御シグナルの伝達を担う。
- (B) 左：電子顕微鏡を用いて解いたヒトメディエーター複合体の構造。
右：ヒトメディエーター複合体の模式図。(Tsai, K.L. *et al.* 2014 を参考にした。)

		<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. cuniculi</i>	<i>D. discoideum</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>T. pseudonana</i>	<i>T. thermophila</i>	<i>T. vaginalis</i>
Head	Med6	○	○	○	○	○	○	○	○	②
	Med8	○	○	○	○	○	○	○	○	②
	Med11	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med17	○	○	○	○	○	○	○	○	②
	Med18	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med19	○	○	○	○	○	②	○	○	○
	Med20	○	○	○	○	○	②	○	○	○
	Med22	○	○	○	○	○	②	○	○	○
Middle	Med1	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med4	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med7	○	○	○	○	○	②	○	○	○
	Med9	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med10	○	○	○	○	○	②	○	○	○
	Med21	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med31	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Tail	Med2/29	○	○	○	○	○	○	○	○	③
	Med3/27	○	○	○	○	○	○	○	○	②
	Med5/24	○	○	○	○	②	○	○	○	⑧
	Med14	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med15	○	○	○	○	④	○	○	○	○
	Med16	○	○	○	○	○	○	○	○	②
	Med23	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Unassigned	Med25	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med26	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med28	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Med30	○	○	○	○	○	○	○	○	○
CDK/Cyclin	Med12	②	○	○	○	○	○	○	○	③
	Med13	②	○	○	○	○	○	○	○	⑤
	Cdk8	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Cdk19	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Cyc C	○	○	○	○	②	○	○	○	②
Pol II CTD	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

表 1. 種間におけるメディエーター複合体サブユニットの保存性

ヒト(*H.sapiens*)、ショウジョウバエ(*D. melanogaster*)、出芽酵母(*S. cerevisiae*)、原虫(*E.cuniculi*)、カビ(*D. discoideum*)、シロイヌナズナ(*A. thaliana*)、藻(*T. pseudonana*)、テトラヒメナ(*T. thermophila*)、トリコモナス(*T. vaginalis*)におけるメディエーター複合体サブユニットの保存性を示す。下線が引かれているサブユニットは、生存に必須なサブユニット。白丸内の数字は、その種が保持するパラログ数を示す。(Bourbon, H.M. *et al.* 2008 を改変した。)

Transcription factors	Interaction Mediator subunits
AR	MED1
Aryl HC Receptor	MED1
β -catenin	MED12
BRCA1	MED1
C/EBP β	MED1, MED23
Dif	MED16, MED17, MED23, MED25
DSX	MED29
E1a	MED23
E2F1	CDK8
ELK1	MED23
ER α	MED1, MED14, MED25
ER β	MED1
ESX	MED23
FXR	MED1
GR	MED1, MED14, MED25
HNF4	MED1, MED14, MED25
HSF	MED17, MED23, MED25
MYC	MED1, CDK8
NANOG	MED12
p53	MED1, MED17
PPAR α	MED1
PPAR γ	MED1, MED14
RAR α	MED1, MED25
ROR α	MED1
RTA	MED12
RXR α	MED1, MED25
SMAD2, 3, 4	MED15
SOX9	MED12, MED25
SREBP-1a	MED14, MED15
STAT2	MED14, MED17
STAT5	MED1
TR α	MED1, MED21
TR β	MED1, MED25
VDR	MED1
VP16	MED17, MED25

表 2. DNA 結合性転写制御因子と結合するメディエーターサブユニット

哺乳類細胞におけるメディエーター複合体のそれぞれのサブユニットと結合する DNA 結合性転写制御因子を示す。(Poss, Z.C. *et al.* 2013 を参考にした。)

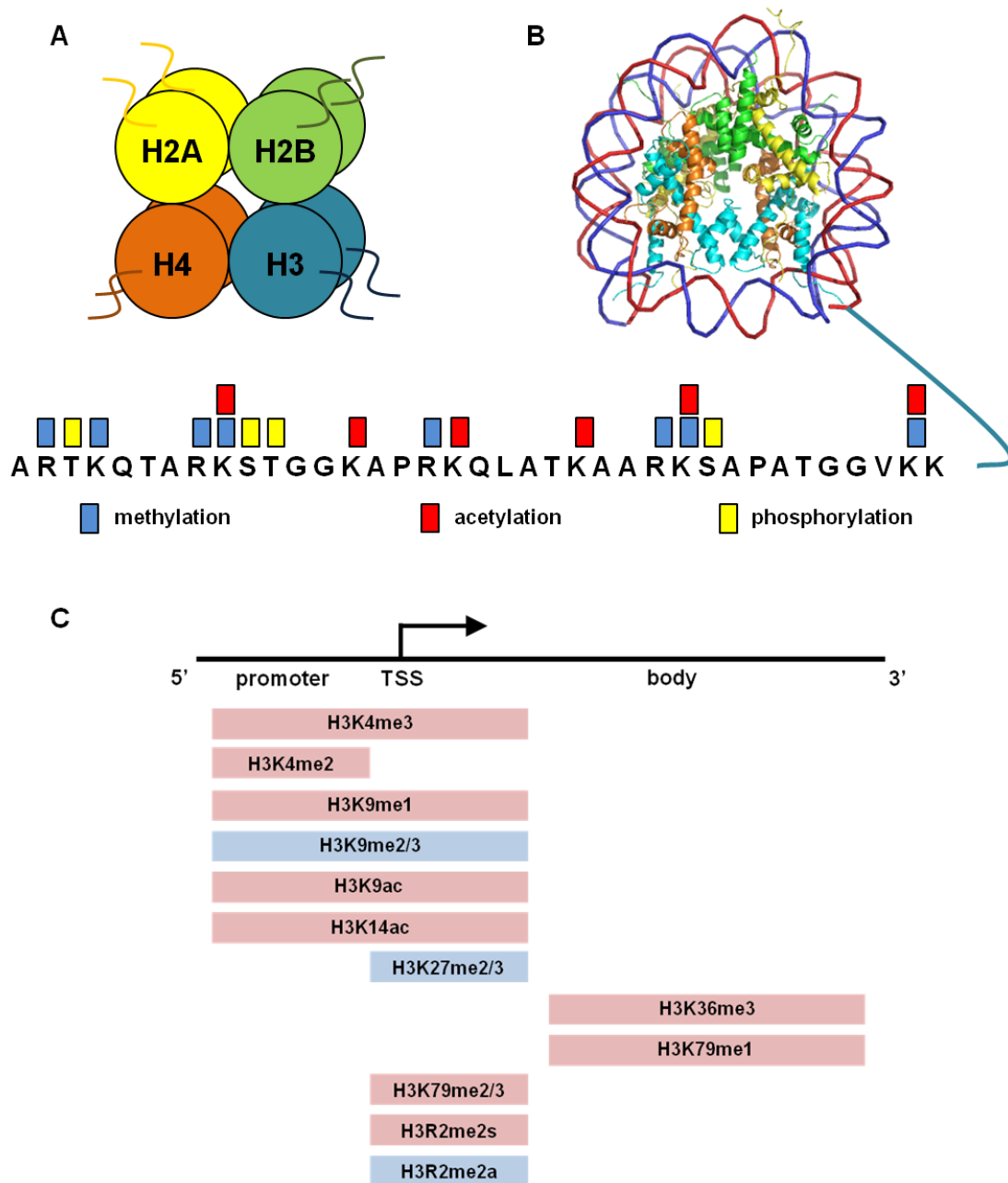


図3. ヒストン修飾

(A) ヒストン八量体の模式図を示す。ヒストン八量体は H2A および H2B から成る四量体と H3 および H4 から成る四量体が組み合わさって構成されている。

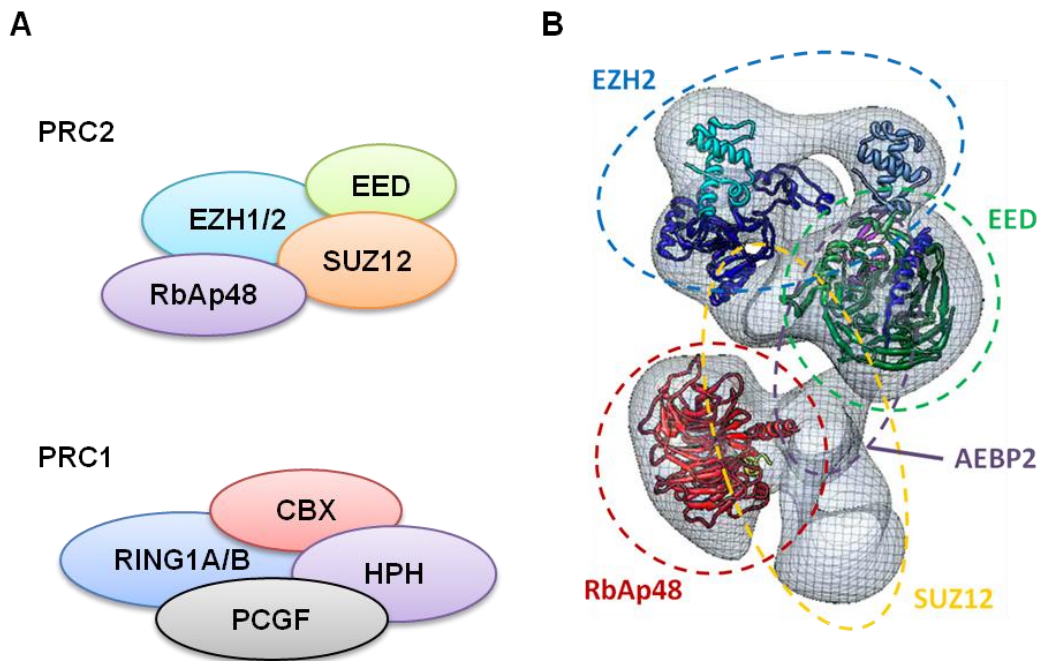
(B) ヒストン八量体は DNA と共にクロマチンの最小単位であるヌクレオソーム構造を形成する。ヌクレオソーム構造は、ヒストンテイルが様々な翻訳後修飾を受けることにより制御される。ここでは、ヒストン H3 のヒストンテイルの一次構造と翻訳後修飾を示す。(ヌクレオソームの結晶構造は Luger, K. *et al.* 1997 を改変した。)

(C) 遺伝子上でのヒストン修飾パターンを示す。赤で示すボックスは転写活性化に、青で示すボックスは転写抑制に関わることを表す。

Modification	writer	eraser	Role
Methylation			
H3R2	CARM1		Transcriptional repression
H3R3	PRMT1		Transcriptional activation
H3K4	MLL1-5 SET1 SET7/9	LSD1	Transcriptional activation
H3R8	PRMT5		Transcriptional repression
H3K9	SUV39H1/2 G9a	JHDM2a/b JMJD2A/B/C/D	Transcriptional activation or repression
H3R17/26	CARM1 PRMT4		Transcriptional activation
H3K27	EZH1/2	UTX JMJD3	Transcriptional repression
H3K36	SET2 NSD1/2 SMYD2	JHDM1a/b JMJD2A/C	Transcriptional activation
H3K79	DOT1L		Transcriptional activation
Acetylation			
H3K4/9/36	PCAF/GCN5	HDAC1/2	Transcriptional activation
H3K14/18	PCAF/GCN5 CBP/p300	HDAC1/2	Transcriptional activation
H3K23	CBP	HDAC1/2	Transcriptional activation
H3K56	GCN5	HDAC1/2	Transcriptional activation
Phosphorylation			
H3T3	HASPIN		Mitosis
H3S10	MSK1/2 Aurora B	PP1	Transcriptional activation
H3T11	DLK/ZIP	PP γ	Mitosis
H3S28	MSK1/2 Aurora B	PP1	Mitosis

表 3. ヒストン H3 の翻訳後修飾を制御する酵素と細胞内機能における役割

ヒストン H3 の翻訳後修飾に関わる様々な修飾酵素 (writer) と脱修飾酵素 (eraser) を示す。ヒストン H3 のメチル化とアセチル化は主に転写制御を行うが、リン酸化が転写制御に与える影響はあまり詳しく解析されていない。(Zhang, G. *et al.* 2014 を 参考にした。)



Polycomb repressive complex 2		
	function	domain
EZH2	H3K27 di- and tri-methylation, ncRNA binding	SANT, CXC, SET
EZH1	H3K27 di- and tri-methylation	SANT, CXC, SET
EED	H3K27me3 binding, required for PRC2 catalytic activity	WD40
SUZ12	PRC2 stability, required for PRC catalytic activity, ncRNA binding	Zinc finger, VEFS-box, glycine rich, alanine rich
RbAp48	Nucleosome binding	WD40
RbAp46	Nucleosome binding	WD40

図 4. Polycomb Repressive Complex

(A) PRC2 と PRC1 の模式図。

(B) 電子顕微鏡により解かれた AEBP2 を含むヒト PRC2 の電子顕微鏡画像とこれまでに解かれた X 線結晶構造を重ね合わせたもの。(Ciferri C. *et al.* 2012 を参考にした。) 表は、PRC2 を構成するサブユニットとそれらの機能および有するドメインを示す。

2. 結果

2.1 メディエーターCDK19 サブユニットの新規相互作用因子の探索

今回、CDK19 の機能解析から、これまで混同されてきた可能性もある 2 つの CDK 間の機能の違いを明らかに出来るだけでなく、脊椎動物における CDK19 の生理的機能を分子レベルで明らかに出来ると考え、CDK19 による特異的な転写制御機構を見出すために、CDK19 の相互作用因子の探索を行った。

2.1.1 酵母 2 ハイブリッド法を用いた新規相互作用因子の探索

まず、CDK19 の機能解析の足掛かりとして、CDK19 と相互作用する細胞核内で転写制御に関わる因子の探索を目的として酵母 2 ハイブリッド法 (Y2H)を行った。今回用いたスクリーニング系は、野生型の CDK19 単独をベイトとして発現する宿主株にヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーをプレイとして遺伝子導入し、レポーター遺伝子の発現により直接的なタンパク質間相互作用の有無および強度や相互作用領域の特定を可能にさせるものである (図 5A)。約 4.0×10^7 クローンをスクリーニングした結果、クロマチンリモデリング複合体 ATPase 活性サブユニット BRG1 (82)、PRC2 複合体サブユニット SUZ12 (69)、B 細胞分化に関わる転写抑制因子 BCL6 (83)の 3 因子をポジティブクロンとして見出した (図 5B)。同様に、全長の CDK8 を用いた Y2H によりこれら 3 因子との相互作用を解析したところ、相互作用はみられなかった (図 5B) また、シーケンス解析から相互作用領域として得られたコード領域は、程度は異なるがいずれも N 末領域が欠失した部分的な配列を有することが分かった (図 5C)。以降、スクリーニングによって得られた部分的な配列を Y2H と表記する。以上より、BCL6, BRG1 および SUZ12 の 3 因子を、CDK19 の相互作用候補因子として同定した。

2.1.2 CDK 野生型組換えタンパク質を用いた *in vitro* 相互作用解析

前節 2.1.1 で CDK19 の相互作用候補因子として見出した BCL6, BRG1 および SUZ12 とのタンパク質間相互作用をさらに検討するため、大腸菌より発現精製を行った組換えタンパク質を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。BCL6 と BRG1 については、スクリーニングによって得られた Y2H 領域の N 末にヒスチジンタグ (6H)を融合させたものを組換えタンパク質として用いた。また、相互作用は抗 His tag 抗体を用いた免疫ブロット法により評価を行った。N 末にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)タグを融合させた野生型 CDK19 または CDK8 をベイトとした *in vitro* 相互作用解析の結果、BCL6

Y2HとBRG1 Y2HはCDK19と直接結合することを明らかにした(図6A)。しかし、CDK8もCDK19と同様にBCL6 Y2HおよびBRG1 Y2Hと直接結合することが分かった(図6A)。一方、SUZ12についてはN末にGSTタグを融合したSUZ12の4種類の欠失変異体(D1-4)とN末に6Hを融合した野生型CDK19またはCDK8の組換えタンパク質を用いて同様に*in vitro*相互作用解析を行った。その結果、SUZ12の2つの欠失変異体であるSUZ12 D1およびD2がCDK19と直接結合することを明らかにした(図6B)。さらに、SUZ12もBCL6およびBRG1と同様にCDK8とも直接結合することがわかった(図6B)。

2.1.3 CDK欠失変異体組換えタンパク質を用いた*in vitro*相互作用解析

前節2.1.2においてSUZ12, BRG1, BCL6と野生型CDK19およびCDK8との直接結合することが明らかになったことから、CDK側の相互作用領域を特定するため、CDK欠失変異体を用いて*in vitro*相互作用解析を行った。CDK19とCDK8はN末からキナーゼドメインまでの約350残基の領域が高度に保存されており、この領域はヒトでは90%を超える相同性を持つ。その一方、CDK19はCDK8に比べ、C末領域が約50アミノ酸長くみられる(図7A)。以上のことから、相同性の高いN末からキナーゼドメインまでの領域と相同性の低いキナーゼドメイン以降のC末領域をそれぞれ有する欠失変異体を作製し、*in vitro*相互作用解析に用いた。*in vitro*相互作用解析の結果、BCL6, BRG1およびSUZ12は、CDK19およびCDK8の相同性の高いN末からキナーゼドメインまでの領域を介して両者と直接結合することを明らかにした(図7B, C)。

2.1.4 HeLa S3細胞核抽出液を用いた*in vitro*相互作用解析

これまでの解析から、BCL6, BRG1およびSUZ12はいずれも単独のCDK19およびCDK8の両者と直接結合することを明らかにしてきた。またCDK19とCDK8は細胞内において、それぞれが相互排他的にメディエーター複合体を構成している一方、CDK/cyclinサブモジュールとしてメディエーターと解離した状態で存在する可能性もある(40)。以上のことから、BCL6, BRG1およびSUZ12が単独のCDKと相互作用するのか、あるいは各CDKが構成するメディエーターと相互作用するのかを検証するため、BCL6, BRG1およびSUZ12の組換えタンパク質をベイトとしてHeLa S3細胞核抽出液を用いた*in vitro*相互作用解析を行った。その結果、BCL6, BRG1およびSUZ12はいずれもCDK19とCDK8の両CDKと相互作用すること、また他のメディエーターサブユニットであるMED6, MED17との相互作用が見出されたことから、BCL6, BRG1および

SUZ12 はいずれも CDK を含むホロ・メディエーターと相互作用すると考えられる(図 7D)。

2.2 メディエーターCDK サブユニットによる転写制御を介した分化制御機構の解析

2.1 章より、CDK19 および CDK8 が形成するメディエーターは、BCL6, BRG1 および SUZ12 が関与する転写制御と密接に関与することが示唆される。これらはいずれもクロマチン制御を介して転写制御を行うことが報告されている (69,82,83)。これまでに、メディエーターとクロマチン制御との関係性は完全に理解されていないことから、CDK を介したメディエーターによる新たな転写制御の一面を見出すことが出来ると考えた。今回 CDK19 および CDK8 と直接相互作用することを見出した SUZ12 が構成するポリコーム複合体 PRC2 と BRG1 が構成する SWI/SNF 複合体は競合的な転写制御を行うことが報告されている (84)。特に、細胞分化に関わる遺伝子発現は SWI/SNF と PRC2 によってバランスが保たれていると考えられている。しかし、遺伝子発現を切り替える際に、SWI/SNF と PRC2 が遺伝子上で入れ替わるものの、これらがどのようなメカニズムで遺伝子上へとリクルートされ、もしくは解離するかについてはほとんど明らかになっていない。そこで、これまでの結果から、メディエーターCDK サブユニットは、自らを足場としてクロマチン制御複合体を遺伝子上にリクルートすることで分化制御における遺伝子発現の切り替えに機能すると仮説を立て、メディエーターCDK サブユニットによる転写制御と分化制御に着目して研究を進めた。

2.2.1 PRC2 サブユニット EZH2 との *in vitro* 相互作用解析

本研究では、2.1 章で相互作用因子として同定された SUZ12 が構成する PRC2 との関係性に着目した。PRC2 複合体は、SUZ12 以外にヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を有する EZH2 とその活性をサポートする EED がコア構成要素として含まれる (69)。特に、EZH2 は CDK ファミリーに属する CDK1 によってリン酸化制御を受け、PRC2 の活性が制御されることが報告されていることから (85)、同様に CDK ファミリーに属する CDK19 および CDK8 が EZH2 のリン酸化を介して PRC2 の活性を制御することが予想される。そこで、メディエーターCDK サブユニットと EZH2 との関係性を追求するため、N 末に GST タグを融合した EZH2 と N 末に 6H タグを融合した野生型の CDK19 または CDK8 を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、EZH2 は野生型の

CDK19 および CDK8 の両者と直接結合することを明らかにした (図 8A)。さらに、EZH2 との結合に必要な CDK 側の結合領域を特定するために、N 末に 6H タグを融合した CDK 欠失変異体を用いた *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、EZH2 も SUZ12 と同様に両 CDK の N 末からキナーゼドメインまでの領域と直接結合することを明らかにした (図 8B)。

これまでの結果から、EZH2 と SUZ12 が両 CDK の同じ領域と直接相互作用すること、また、EZH2 と SUZ12 同士の直接的な相互作用も報告されていることから、CDK19 および CDK8 と EZH2 または SUZ12 との物理的な相互作用が競合的か、あるいは同時に結合することで複合体を形成するかを検討するため、さらなる *in vitro* 相互作用解析を行った。この相互作用解析では、GST-CTD をベイトとして CDK19 または CDK8 と結合反応を行う際に、CDK19 および CDK8 と結合することを見出した SUZ12 D1 を段階的に増やして結合反応に加えることで EZH2 と各 CDK 間の結合に与える影響を評価した。その結果、EZH2 と CDK19 の結合反応時に SUZ12 D1 のタンパク質量を段階的に増やして加えても EZH2 と CDK19 との結合に影響はみられず、その一方で SUZ12 との結合が量依存的に強くなることが分かった (図 8C)。CDK8 も同様に、EZH2 との結合は SUZ12 D1 を加えることによる影響はみられず、SUZ12 との結合は量依存的に強くなることが分かった。これらのことから、CDK19 または CDK8 が EZH2 および SUZ12 と同時に結合することで複合体を形成する可能性が示唆される (図 9)。

2.2.2 CDK19 または CDK8 によるリン酸化標的としての EZH2 の検討

リン酸化プロテオミクス解析から、EZH2 は CDK ファミリーに属する CDK1 によって 2 つのスレオニン残基がリン酸化を受け、PRC2 の活性に与えることが報告されている (85,86) (図 10A)。前節 2.2.1 から、EZH2 が CDK19 および CDK8 のキナーゼドメインを含む領域と直接相互作用することが明らかになったことから、次に CDK19 または CDK8 による EZH2 のリン酸化活性と特異性の検討を行った。はじめに細胞レベルで CDK19 および CDK8 による EZH2 リン酸化活性を検討するため、Ntera2 cl. D1 細胞を用いて siRNA 導入による CDK19 または CDK8 の遺伝子ノックダウンを行い、EZH2 のリン酸化部位特異的抗体を用いた免疫ブロット法による評価を行った。その結果、CDK19 または CDK8 の遺伝子ノックダウンによる EZH2 リン酸化への影響は観察されなかった (図 10B)。さらに、CDK19 および CDK8 による EZH2 リン酸化活性を検討するため *in vitro* リン酸化解析を行った。まず、HA タグと FLAG タグ (HF) が N 末にタンデムに融合し

た CDK19 (HF-CDK19) または CDK8 (HF-CDK8) を安定発現する HeLa S3 細胞から調製した核抽出液を用いて、各 CDK が構成するメディエーター複合体の精製を行った (図 10C)。大腸菌より発現精製を行ったマウスの全長 Pol II CTD 組換えタンパク質を基質として *in vitro* リン酸化解析を行った結果、精製した HF-CDK19 または HF-CDK8 を含むメディエーターは、これまでに報告と一致して 5 番目セリン特異的なリン酸化活性を示した (図 10E)。このことは、CTD リン酸化活性を有する各 CDK を含むメディエーターが精製出来ていることを示している。次に、大腸菌より発現精製した EZH2 組換えタンパク質を基質として *in vitro* リン酸化解析を行った。その結果、HF-CDK19 または HF-CDK8 を含むメディエーターは *in vitro* で EZH2 の 492 番目のスレオニン残基 (T492) を強くリン酸化することを明らかにした (図 10F)。

2.2.3 CDK19 または CDK8 による神経細胞分化に関連するレチノイン酸標的遺伝子の転写制御の解析

これまでの報告により、マウス ES 細胞においてメディエーター複合体は、多能性遺伝子の転写活性化を行うことで幹細胞の多能性に関与していることが示唆されている (19)。また細胞分化の一部は、レチノイン酸 (RA) シグナル経路を介して誘導され、その転写制御機構においてメディエーターが活性化に働くことが知られている (25,28)。まず、分化シグナルを代表する RA によって制御される細胞分化に着目するため、RA による神経細胞への分化を観察できるヒトの精巣性胚性腫瘍細胞である Ntera2 cl. D1 細胞を用いて、神経細胞分化に関わる RA 標的遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR により測定した (87)。RA による刺激後、*Nanog* 遺伝子の mRNA 発現量は経時的にほぼ同じ割合で減少し、一方、*Pax6* 遺伝子の mRNA 発現量は 24 時間から 48 時間にかけて大きく増加した (図 11A)。また、*Lefty1* 遺伝子と *Cyp26a1* 遺伝子の mRNA 発現量は RA 刺激後 1 時間から 2 時間にかけて大きく増加した (図 11B)。以上のことから、*Nanog* 遺伝子と *Pax6* 遺伝子の mRNA 発現量変化の観察は RA 刺激を 48 時間に設定し、これらの遺伝子を後期誘導遺伝子としてみなす一方、*Lefty1* 遺伝子と *Cyp26a1* 遺伝子の mRNA 発現量変化の観察は RA 刺激を 2 時間に設定し、これらの遺伝子を初期誘導遺伝子としてみなすこととした。

次に、RA が制御する細胞分化に CDK19 または CDK8 が転写レベルで関与しているか検討を行うために、siRNA 導入による CDK19 または CDK8 の遺伝子ノックダウンを行い、RA 標的遺伝子の mRNA 発現量に与える影響を RT-qPCR により測定した。その

結果、後期誘導型の RA 標的遺伝子において、*Nanog* 遺伝子では未分化時に各 CDK の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量に有意な差は認められなかったが、分化誘導時に CDK8 の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量の減少が抑制された (図 11C)。同様に、*Pax6* 遺伝子では未分化時に CDK8 の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量が増加するのに対し、未分化時に CDK19 と CDK8 のどちらの遺伝子ノックダウンにおいても mRNA 発現量に優位な差は認められなかった (図 11D)。これらのことから、後期誘導型の RA 標的遺伝子は、タイミングや制御の仕方は異なるが CDK8 によって転写制御を受ける可能性が示唆される。また、初期誘導型の RA 標的遺伝子において、*Lefty1* 遺伝子では未分化時に CDK19 と CDK8 の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量が減少し、分化誘導時に CDK19 の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量の増加が抑制された (図 11E)。同様に、*Cyp26a1* 遺伝子では未分化時に CDK19 と CDK8 の遺伝子ノックダウンにより mRNA 発現量が減少し、分化誘導時に CDK19 と CDK8 のどちらの遺伝子ノックダウンにおいても mRNA 発現量に優位な差は認められなかった (図 11F)。これらのことから、初期誘導型の RA 標的遺伝子は、CDK19 および CDK8 によって正の転写制御を受ける可能性が示唆される。以上の mRNA 発現量解析から、RA が制御する神経細胞分化に CDK19 および CDK8 が転写レベルで神経細胞分化を制御している可能性が示唆される。

2.2.4 神経細胞分化時に起こるレチノイン酸標的遺伝子上におけるメディエーター複合体と PRC2 の局在解析

前節 2.1.7 より、RA が制御する神経細胞分化に CDK19 および CDK8 が転写レベルで関与する可能性が示唆されたことから、各 CDK を含むメディエーター複合体と各 CDK と相互作用することを見出してきた PRC2 が直接 RA 標的遺伝子の転写制御に関わるかを検討するため、神経細胞分化に関わる RA 標的遺伝子上での CDK19, CDK8, MED1, SUZ12, 転写の指標である Pol II および PRC2 による転写抑制の指標であるヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化 (H3K27me3) の存在量についてクロマチン免疫沈降法 (ChIP-qPCR) を用いて解析した。今回の解析では、分化誘導時において初期誘導される遺伝子は運命決定の選択性を担うことや様々なシグナル経路の副次的な影響を介さずに転写制御機構を観察可能であること、また、前節 2.1.7 で CDK19 および CDK8 の両者により転写制御を受けることが示唆されたことから、初期誘導型の RA 標的遺伝子である *Lefty1* 遺伝子と *Cyp26a1* 遺伝子のプロモーターおよび遺伝子内領域をそれぞれ

解析対象とした (図 12A, G)。さらに、CDK19 または CDK8 のそれぞれを特異的に認識できる抗体が存在しないため、CDK19 および CDK8 の解析には両者を認識する抗体 (以下、CDK8/19 と表記) を用いた。まず *Lefty1* 遺伝子上では、mRNA の発現量変化と一致して RA 刺激により Pol II はプロモーターと遺伝子内領域において存在量が増加した (図 12B)。そして、RA 無刺激状態でも CDK8/19 はプロモーター上に存在し、RA 刺激によって CDK8/19 の存在量が増加した (図 12C)。これに付随して、コア・メディエーターを構成する MED1 の存在量もプロモーター上で増加した (図 12D)。このことから、RA 刺激に応答して CDK を含んだホロ・メディエーターが *Lefty1* 遺伝子プロモーター上にリクルートされることが示唆される。また、SUZ12 もプロモーターと遺伝子内領域に存在しており、RA 刺激前後で *Lefty1* 遺伝子上での存在量に変化は認められなかった (図 12E)。さらに、PRC2 による転写抑制の指標である H3K27me3 の存在量も SUZ12 と同様に、RA 刺激前後で *Lefty1* 遺伝子上での存在量に変化は認められなかった (図 12F)。これらのことから、*Lefty1* 遺伝子の転写活性化の際に、CDK を含むホロ・メディエーターがプロモーター上にリクルートされ、転写の活性化に関与することが示唆される。また、*Cyp26a1* 遺伝子上では、こちらも mRNA の発現量変化と一致して RA 刺激により Pol II はプロモーターと遺伝子内領域において存在量が増加した (図 12H)。そして、RA 無刺激状態でも CDK8/19 はプロモーター上に存在し、RA 刺激によって CDK8/19 の存在量が増加した (図 12I)。これに付随して、コア・メディエーターを構成する MED1 の存在量もプロモーター上で増加した (図 12J)。このことから、RA 刺激に応答して CDK を含んだホロ・メディエーターが *Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上にもリクルートされることが示唆される。また、*Lefty1* 遺伝子とは異なり、*Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上の SUZ12 および H3K27me3 は RA 刺激に応答して存在量が減少した (図 12K, L)。これらのことから、*Cyp26a1* 遺伝子の転写活性化の際に、CDK を含むホロ・メディエーターがプロモーター上にリクルートされ、転写の活性化に関与する一方で、その際、ホロ・メディエーターの遺伝子上へのリクルートによって PRC2 は遺伝子プロモーター上から解離する可能性が示唆される。

PRC2 は主に、遺伝子プロモーター上に存在する一方で、そのリクルート機構は完全には理解されていない。そこで、CDK19 および CDK8 が PRC2 の RA 標的遺伝子プロモーターへのリクルートに関与しているかを検討するため、siRNA 導入により CDK19 と CDK8 を遺伝子ダブルノックダウンした状況下で RA 刺激前後における *Lefty1* 遺伝子と *Cyp26a1* 遺伝子の両遺伝子上での CDK8/19, SUZ12, MED1, 転写の指標である Pol II

および PRC2 による転写抑制の指標である H3K27me3 の存在量について ChIP-qPCR を用いて解析した。まず *Lefty1* 遺伝子上では、Pol II は CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンにより、未分化時におけるプロモーターと遺伝子内領域での存在量に変化は認められなかったが、RA 刺激後に遺伝子内領域での存在量がわずかながら減少した (図 13B)。このことは、Pol II の転写開始から伸長への移行がうまく行われてない可能性が示唆される。CDK19 および CDK8 は、遺伝子ダブルノックダウンを行うと、未分化時において存在量は減少したが、予期に反して、RA 刺激後の存在量はわずかしこ減少しなかった (図 13C)。また、コア・メディエーターを構成する MED1 のプロモーター上での存在量は、RA 刺激の有無に関わらず CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンにより変化は認められなかった (図 13D)。このことは、*Lefty1* 遺伝子プロモーター上へのメディエーターのリクルートは、CDK19 および CDK8 に非依存的であり、コア・メディエーターの形でもリクルートされる可能性が示唆される。そして、レチノイン酸刺激前後に関わらず CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンによる SUZ12 および 3K27me3 のプロモーター上での存在量に変化は認められなかった (図 13E, F)。これらのことから、*Lefty1* 遺伝子上への PRC2 リクルートは、CDK19 および CDK8 を直接介さない機構で行われる可能性が示唆される。一方、*Cyp26a1* 遺伝子上では、Pol II は CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンにより、未分化時におけるプロモーターと遺伝子内領域での存在量に変化は認められなかったが、RA 刺激後にプロモーター上での存在量が増加した (図 13H)。このことは *Lefty1* 遺伝子で観察されたことと同様に、Pol II の転写開始から伸長への移行がうまく行われてない可能性が示唆される。CDK19 および CDK8 は、遺伝子ダブルノックダウンを行うと、未分化時において存在量は減少したが、予期に反して、RA 刺激後の存在量に変化は認められなかった (図 13H)。また、コア・メディエーターを構成する MED1 のプロモーター上での存在量は、RA 刺激の有無に関わらず CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンにより変化は認められなかった (図 13I)。このことは、*Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上へのメディエーターのリクルートは、少なくとも未分化時において CDK19 および CDK8 に非依存的であり、コア・メディエーターの形でもリクルートされる可能性が示唆される。そして、レチノイン酸刺激前後に関わらず CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンによる SUZ12 および 3K27me3 のプロモーター上での存在量に変化は認められなかった (図 13K, L)。これらのことから、*Cyp26a1* 遺伝子上への PRC2 リクルートは CDK19 および CDK8 を直接介さない機構で行われる可能性が示唆される。

2.3 考察

メディエーターCDK8 サブユニットによる転写制御機構への理解は徐々に深まりつつあるが、CDK19 を介した転写制御の分子機構については依然として多くの謎が残されている。脊椎動物のみに備わる CDK19 の機能を分子レベルで理解することは、高等動物における生命現象への理解に繋がることに加えて、生命現象の根幹を成す遺伝子発現制御におけるメディエーターの重要性をさらに高めると考えられる。そこで私は、CDK19 の転写制御における機能解析を目的に結合タンパク質のスクリーニングを行い、CDK19 の相互作用因子として、SUZ12, BRG1, BCL6 の 3 因子を同定した。*in vitro* 相互作用解析から、これらの 3 因子は CDK19 および CDK8 の両者と相同性の高いキナーゼドメインを含む領域と直接結合することに加え、各 CDK が構成するメディエーターと結合することが明らかとなった。SUZ12, BRG1 および BCL6 はいずれもクロマチン構造変換に関与する因子であり、メディエーターによる転写制御とクロマチン制御が直接結びつく可能性を示す意味で、非常に興味深い。さらに、SUZ12 が構成する PRC2 とメディエーターCDK との関係性に着目して研究を進めた結果、2 つの CDK は PRC2 を構成する EZH2 と直接結合し、これをリン酸化することを明らかにした。さらに、mRNA 発現量解析から、2 つの CDK が初期誘導型レチノイン酸標的連遺伝子の転写活性化に関わることを明らかにした。そして、ChIP-qPCR 解析から、*Lefty1* 遺伝子および *Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上に各 CDK を含むメディエーターと PRC2 が共局在することを明らかにした。これらの結果から、レチノイン酸による神経細胞分化時に CDK を含むホロ・メディエーターが PRC2 と協調的にレチノイン酸標的遺伝子の転写制御を直接行うことが示唆された。このことはさらに、高等動物に特有の脳や神経の発生過程において、メディエーターを構成する 2 つの CDK が重要な働きを持つことを示唆している。

酵母 2 ハイブリッド法により、CDK19 の新規相互作用因子として、BCL6, BRG1 および SUZ12 の 3 因子を同定した。これらの 3 因子は、酵母内では CDK8 とは相互作用せず、CDK19 に選択的な相互作用を示したが、*in vitro* 相互作用解析では相互作用の選択性が失われた。この理由の一つとして、相互作用の選択性にはタンパク質の翻訳後修飾が関与する可能性が示唆される。*in vitro* 相互作用解析で用いたタンパク質は、大腸菌より調製しており、大腸菌発現系ではヒトのタンパク質に起こりうる翻訳後修飾は行われていない。CDK19 および CDK8 がリン酸化酵素であることも踏まえると、相互作用因子に対するリン酸化修飾が相互作用の選択性を生み出すのに必要とされる可能性がある。他に、CDK が複合体を形成することが相互作用の選択性に繋がる可能性が示唆される。メディエーター複合体中で CDK19 および CDK8 は Cyclin C と複合体を形成し

ており、酵母には Cyclin C のオルソログである Srb11 が存在する (88)。酵母を用いてヒトのタンパク質間相互作用を解析する一つのメリットとして、偽陽性が少ないことが挙げられ、酵母 2 ハイブリッド法により見出した相互作用は直接的なものであると考えられる。しかし、CDK19 または CDK8 が酵母の内在性の Srb11 と複合体を形成した状態での相互作用である可能性は排除できない。これらのことから、CDK19 または CDK8 間の相互作用の選択性については、ヒトの細胞内で CDK を含むメディエーターと相互作用因子が構成する複合体同士の相互作用を確認することにより明らかにできると考えている。

EZH2はSUZ12と同様にPRC2を構成するサブユニットであり、EZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性はPRC2による転写抑制機構に必須であるだけでなく、PRC2の遺伝子上へのリクルートにも関わるということが報告されている (66,85)。さらに、EZH2はCDKファミリーに属するCDK1によって2つのスレオニン残基がリン酸化制御を受け、このリン酸化制御はPRC2の活性にも影響を与えることが知られている。350番目のスレオニン残基 (T350)のリン酸化は、ncRNAとの相互作用を亢進させ、PRC2の遺伝子上へのリクルートに関わる (85)。また、492番目のスレオニン残基 (T492)のリン酸化はEZH2のユビキチン化によるPRC2の不安定化を引き起こし、標的遺伝子プロモーター上のH3K27me3を減少させる (86,89)。今回の精製タンパク質を用いた*in vitro*解析から、EZH2はCDK19およびCDK8のキナーゼドメインを含む領域と直接結合すること、そしてCDK19およびCDK8を含むホロ・メディエーターがEZH2のT492をリン酸化することを明らかにした (図8B, 10F)。これらのことから、CDK19およびCDK8がEZH2との相互作用を介してT492をリン酸化することにより、PRC2の安定性を制御する可能性が示唆される。T492のリン酸化がPRC2の不安定化を引き起こすメカニズムは明らかにされていないが、T492はEZH2とSUZ12の相互作用に用いられる領域に含まれる (85)。そして、SUZ12が複合体の安定性やEZH2のヒストンメチルトランスフェラーゼ活性に必要とされることが報告されていることから (69)、EZH2のT492のリン酸化はSUZ12との相互作用を妨害することによってPRC2の不安定化を引き起こす可能性が示唆される。しかし、細胞内におけるEZH2のリン酸化はCDK19またはCDK8の遺伝子ノックダウンにより大きな影響は受けなかった (図10C)。このことは、細胞内でCDK1のようなCDK19やCDK8とは異なるリン酸化酵素がEZH2のリン酸化に寄与している可能性やCDK19およびCDK8によるEZH2のリン酸化は限られた標的遺伝子上でのみ行われている可能性が存在する。また、今回の解析ではCDK19またはCDK8を単独で遺伝子ノックダウンした際

のリン酸化レベルを評価している。そのため、両CDKがEZH2のリン酸化に関わるのであれば、その影響は見えにくいと考えられるため、両CDKを遺伝子ノックダウンした際のEZH2リン酸化レベルも同様に評価すべきだと考えられる。さらに、*in vitro*リン酸化解析で用いた各CDKを含むホロ・メディエーターには、精製した際にCDK19またはCDK8とは異なるリン酸化酵素を同時に精製した可能性は排除できない。このことから、CDK19およびCDK8のキナーゼ活性阻害剤を用いたリン酸化解析を行うことで、CDK19またはCDK8によるEZH2のリン酸化標的としての検討を行ってみたい。

また、神経細胞分化に関わるレチノイン酸 (RA)標的遺伝子のmRNA発現量解析から、CDK19およびCDK8がこれらの転写制御に関わることを明らかにした (図11)。しかし、今回解析に用いた*Nanog*, *Pax6*, *Lefty1*, *Cyp26a1*遺伝子のCDK19およびCDK8による転写制御は統一的というよりも、むしろ遺伝子ごとにそれぞれ異なる転写制御を受けていた。未分化時において、*Lefty1*遺伝子および*Cyp26a1*遺伝子のmRNA発現にはCDK19およびCDK8が関与することや後期誘導型のRA標的遺伝子のmRNA発現にはCDK8のみが関与することはそれぞれ、両CDKに共通の遺伝子発現制御あるいはCDK8特異的な遺伝子発現制御である可能性が示唆される。その一方で注目すべきは、RAによる分化誘導時において、CDK19の遺伝子ノックダウン時にのみ転写制御に関わることが示唆された点である (図11E)。このことはCDK19特異的な遺伝子発現制御が存在する可能性を示唆するものである。今後はマイクロアレイやRNA-seqを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析を用いて、CDK19またはCDK8にそれぞれ特異的な遺伝子発現制御を見出すことで2つのCDKにおける機能の違いにもアプローチできると考えている。

さらに、ChIP-qPCRによる遺伝子上でのタンパク質局在解析から、CDKサブユニットを含むホロ・メディエーターは、*Lefty1*遺伝子と*Cyp26a1*遺伝子のプロモーター上に存在し、直接これらの転写制御に関わることが示唆された (図12)。これに加えて、未分化時においては、CDK19またはCDK8の遺伝子ノックダウンによって*Lefty1*遺伝子および*Cyp26a1*遺伝子のmRNA発現量が減少し (図11)、CDK19およびCDK8の遺伝子ダブルノックダウンによってこれらの遺伝子プロモーター上のCDK19およびCDK8の存在量が減少した (図13)。これらの結果は、CDK19およびCDK8を含むホロ・メディエーターがRAによる分化誘導時だけでなく未分化時においても遺伝子プロモーター上で転写活性化に働くことを示唆している。広くはメディエーターCDKサブユニットは転写抑制に働くと考えられており、今回の解析からCDK19およびCDK8を介したメディエーターによる新たな転写制御の一面を見出すことが出来たと考えている。また、メディエーターと

PRC2との関係性については、RA刺激により *Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上において SUZ12とH3K27me3の存在量が減少した (図12K, L)のに対し、ホロ・メディエーターが増加することから (図12I, J)、RA刺激により *Cyp26a1* 遺伝子プロモーター上においてホロ・メディエーターのリクルートはPRC2の解離を促す可能性が示唆される。さらに、CDK19またはCDK8がPRC2の遺伝子上での局在に関わるか、CDK19およびCDK8の遺伝子ダブルノックダウンを行った際のChIP-qPCRを行った結果、CDK19およびCDK8の遺伝子ダブルノックダウンにより、*Lefty1* 遺伝子と *Cyp26a1* 遺伝子のプロモーター上におけるSUZ12およびH3K27me3の存在量は変化しなかった。この結果から、メディエーターの他のサブユニットがCDK以上にPRC2の遺伝子プロモーター上へのリクルートに関わる可能性やメディエーターがPRC2をリクルートするのではなく、逆にPRC2がCDKサブユニットを介してメディエーターをリクルートしている可能性が考えられる。また、PRC2がncRNAによって遺伝子上へとリクルートされるのと同様に、メディエーターのCDK/Cyclinモジュールを構成するMED12はncRNAとの相互作用を介して遺伝子上へとリクルートされることが報告されている (20)。これらの報告から、同種のncRNAによって同時にホロ・メディエーターとPRC2が遺伝子上へとリクルートされる可能性が考えられる。これらの可能性については、PRC2サブユニットの遺伝子ノックダウンを介したChIP-qPCRや、ゲノムワイドなChIP解析を行うことで明らかにできると考えている。面白いことに、CDK19およびCDK8の遺伝子ダブルノックダウンにより、Pol IIは *Lefty1* 遺伝子ではプロモーター上での存在量は変化せず、遺伝子内領域での存在量が減少したことに対し、*Cyp26a1* 遺伝子ではプロモーター上での存在量が増加した一方、遺伝子内領域での存在量は変化しなかった。これらのことは、Pol IIの転写開始から伸長への移行がうまく行われていない可能性が示唆される。CDK8は、血清応答や低酸素刺激時に転写伸長に関与することが示されており、分化シグナル応答に関してもCDK8およびCDK19が転写伸長に関与する可能性が考えられるため、Pol IIのリン酸化状態や他の転写伸長因子にも着目しながら更なる解析を進めていきたいと考えている (16,17)。

以上の結果より、神経細胞分化時においてCDKを含むホロ・メディエーターとPRC2による *Cyp26a1* 遺伝子の転写制御モデルが考えられる (図14)。未分化時においてPRC2はプロモーター上でヒストンH3の27番目リジンのトリメチル化を行うことで転写抑制に関わっている。レチノイン酸刺激により、RAR/RXRの構造変換が起きた結果、MED1を介してメディエーター複合体が遺伝子上へとリクルートされ、CDK19またはCDK8によるEZH2のリン酸化が起こり、遺伝子上からPRC2が解離する。その後、Pol IIを含む転

写開始複合体をメディエーターがプロモーター上へとリクルートし、CDK19またはCDK8によってPol IIのCTDがリン酸化を受け、転写開始から伸長へと移行するというモデルが考えられる。このモデルをさらに検討するためには、より細かなRA応答に対する、遺伝子上でのEZH2やEZH2のリン酸化の動きをChIP-qPCRにより確認する必要があると考えている。

最後に、今回同定した全ての相互作用因子はクロマチン制御、特にエピジェネティクスと呼ばれる遺伝子配列の変化を伴わない後天的な現象に関与する。このエピジェネティックな遺伝子発現制御は、細胞分化だけでなく発がんや老化などの様々な後天的疾患に関わると考えられており、特に PRC2 サブユニットの過剰発現や体細胞変異が多くのがん細胞において発見されていることから、このようなエピジェネティクス関連タンパク質を標的とした創薬アプローチが注目されている (63,90,91)。また、senexin A や cortistatin A といった CDK19 および CDK8 に選択的なキナーゼ活性阻害剤が開発されているが、これら2つのCDKのリン酸化標的を含めて2つのCDKの生理的機能はよく分かっていない (92,93)。本研究の結果は、CDK/Cyclin モジュールがそのキナーゼ活性を介してクロマチン構造変換を制御することを示唆するものであり、CDK19 および CDK8 を標的とした創薬の足掛かりになることが期待される。

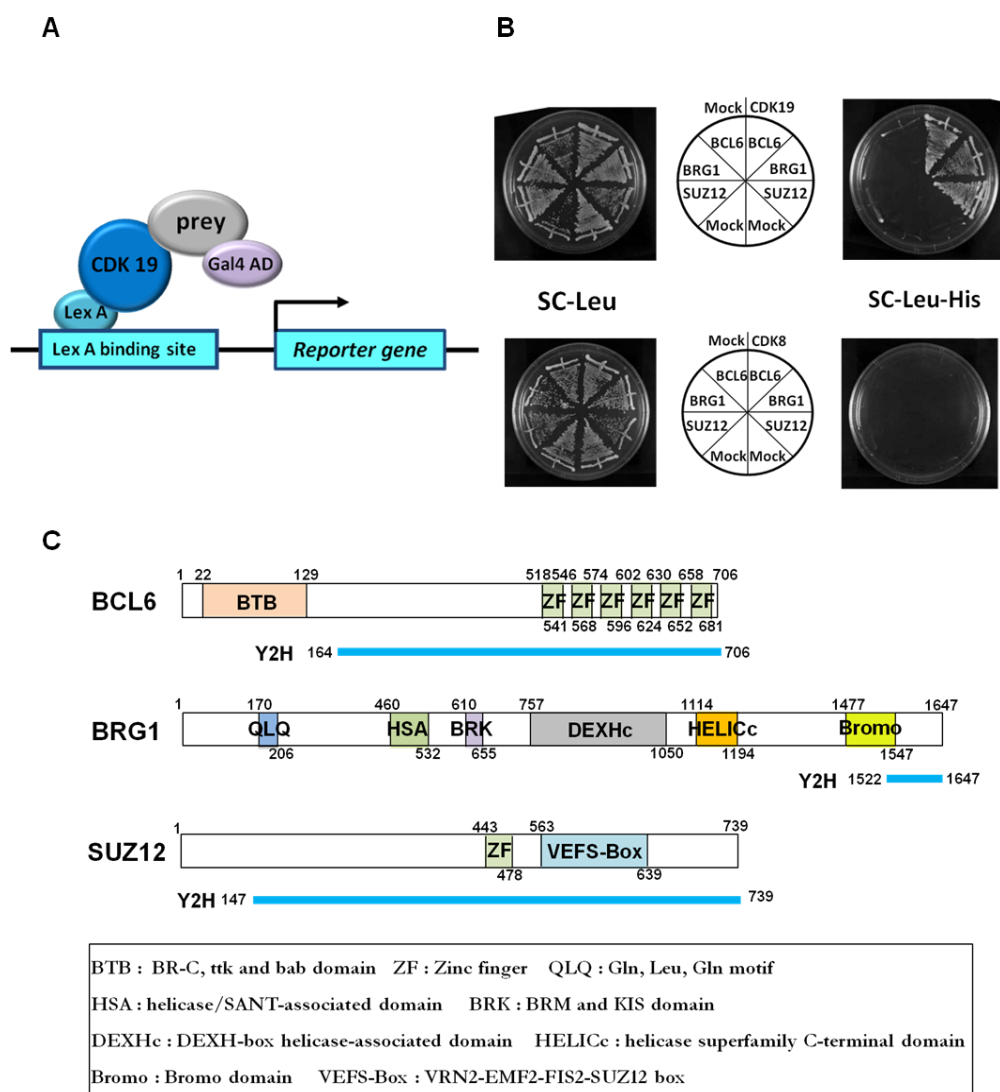


図 5. hCDK19 との新規相互作用因子の同定

- (A) 酵母 2 ハイブリッド法 (Y2H) の模式図。N 末に LexA タグの融合した hCDK19 の全長をベイトに、ヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリーをプレイとして用いた。レポーター遺伝子の発現によりポジティブクローンが得られるような選択培地を用いてスクリーニングを行った。
- (B) スクリーニングによって得られたポジティブクローンである BCL6 (164-706aa)、BRG1 (1522-1647aa)、SUZ12 (147-739aa) と全長の hCDK19 または全長の hCDK8 との相互作用解析。
- (C) Y2H によって得られた hCDK19 との相互作用候補因子のアミノ酸モチーフを示す。それぞれのアミノ酸モチーフの下に示す青線で示した領域が Y2H で確認された相互作用領域である。黒枠内にそれぞれのアミノ酸モチーフの略語を示す。

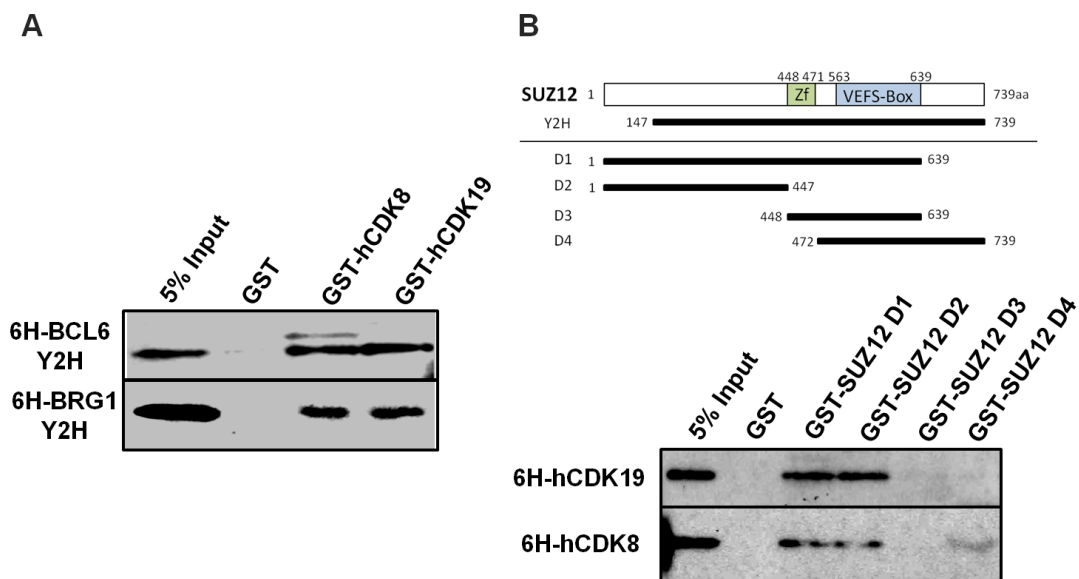


図 6. BCL6, BRG1 および SUZ12 は *in vitro* で hCDK19 と hCDK8 の両者と相互作用する

- (A) GST-hCDK8 または hCDK19 とスクリーニングによって得られた領域を有する 6H-BCL6 Y2H または BRG1 Y2H を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。500 ng の GST 融合タンパク質を Glutathione-Sepharose 4B を用いて精製した後、500 ng の 6H タグ融合タンパク質を加えて結合反応を行い、タンパク質間相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。
- (B) (上) 作製した SUZ12 欠失変異体の模式図。
 (下) GST-SUZ12 D1-D4 と 6H-hCDK8 または hCDK19 を用いて、(A)と同様の *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。

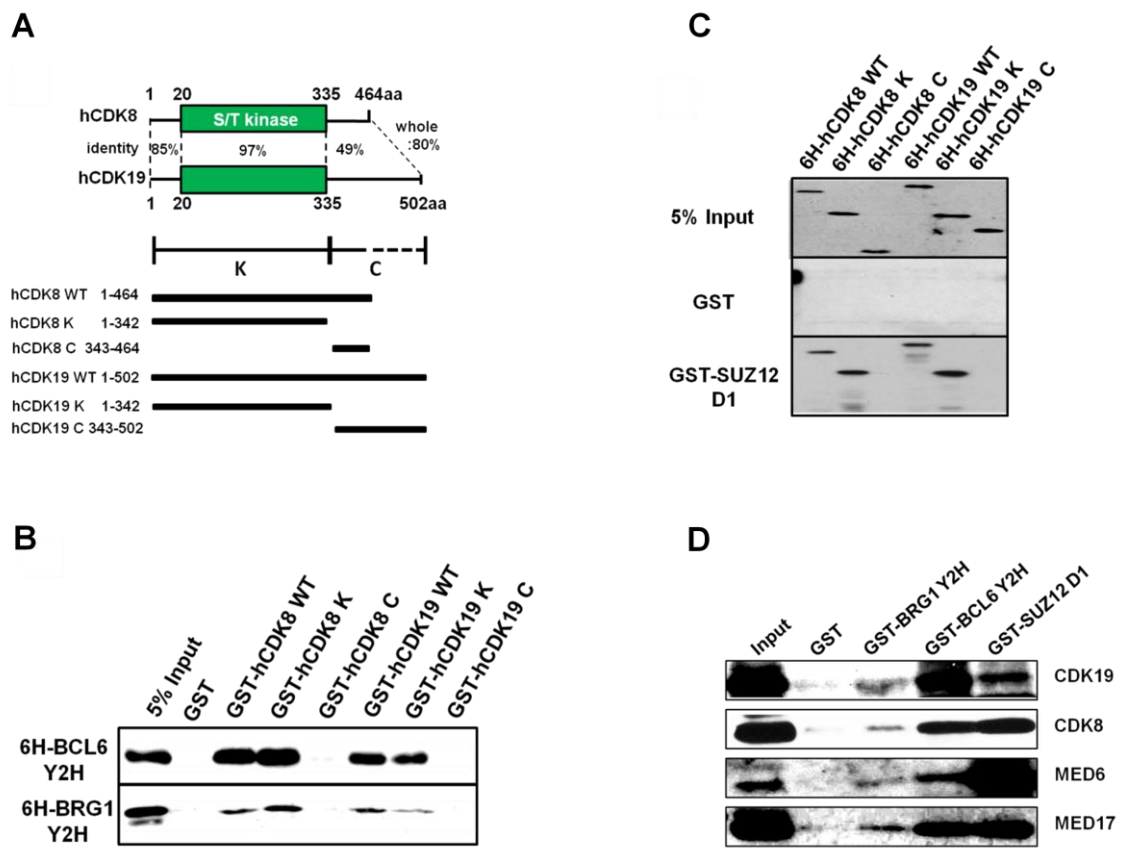


図7. BCL6, BRG1 および SUZ12 は *in vitro* で hCDK19 と hCDK8 の相同性の高い領域と相互作用する。

- (A) 作製した CDK 欠失変異体の模式図。
- (B) GST-hCDK8 または CDK19 の全長あるいは欠失変異体と 6H-BCL6 Y2H, BRG1 Y2H を用いた *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。
- (C) 全長の hCDK8 または CDK19 と相互作用することが示された GST-SUZ12 D1 と 6H-hCDK8 または CDK19 の全長あるいは欠失変異体を用いて *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。
- (D) GST-BRG1 Y2H, BCL6 Y2H, SUZ12 D1 をベイトとして HeLa S3 細胞核抽出液を用いた *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。

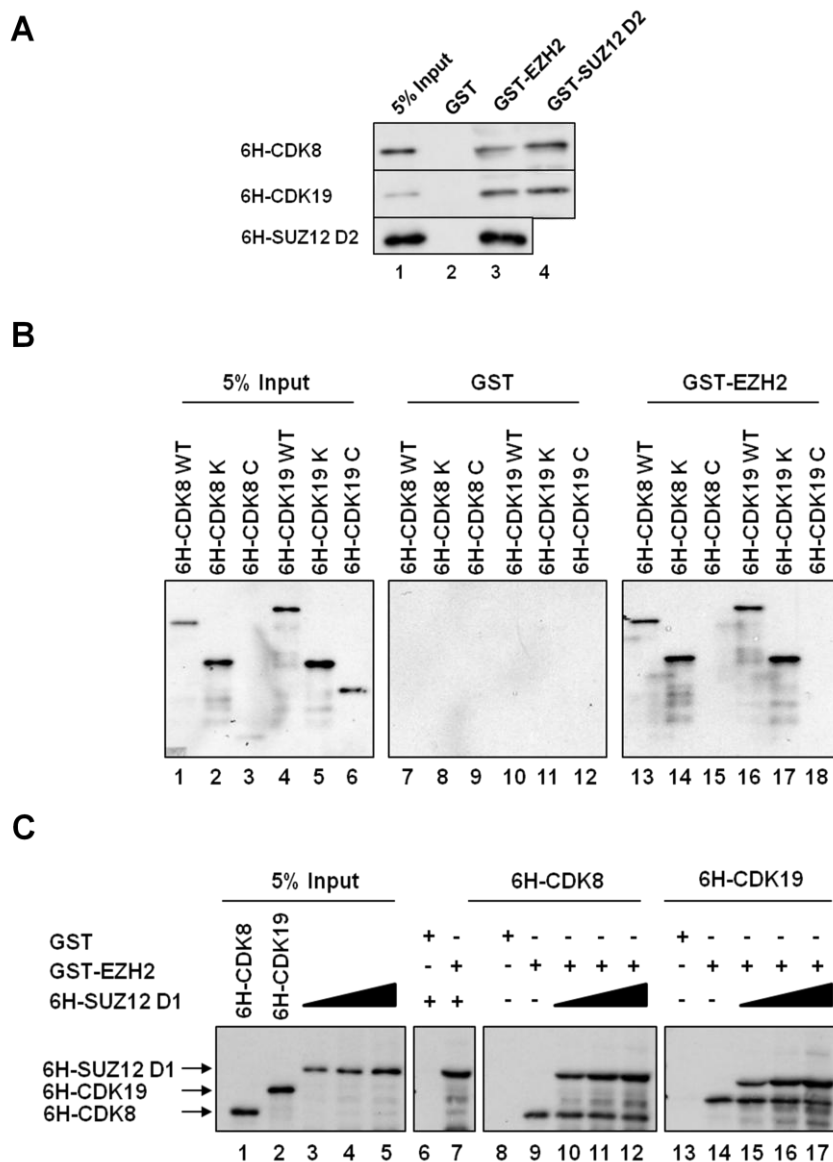
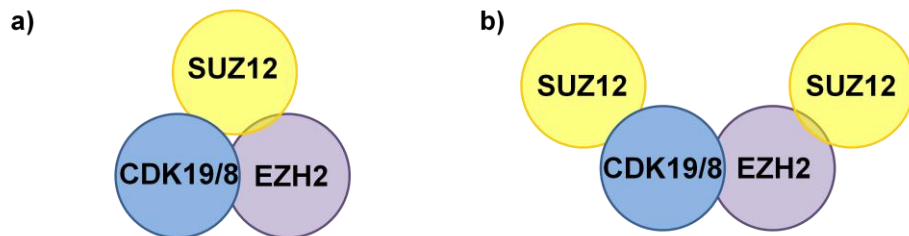


図 8. メディエーター複合体 CDK サブユニットは EZH2 と物理的に相互作用する。

- (A) GST-EZH2 または SUZ12 D2 と 6H-CDK8, CDK19 または SUZ12 D2 を用いて *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。
- (B) GST-EZH2 と 6H-CDK8 または CDK19 欠失変異体を用いて *in vitro* 相互作用解析を行い、6H タグ融合タンパク質との相互作用を His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。
- (C) GST-EZH2 と 6H-CDK8 または CDK19 との結合反応時に、SUZ12 D1 の量を段階的に増やして結合反応に加えた際に EZH2 と各 CDK との結合に与える影響を *in vitro* 相互作用解析により評価した。6H タグ融合タンパク質との相互作用は、His タグに対する抗体を用いた免疫ブロット法により検出した。

A



B

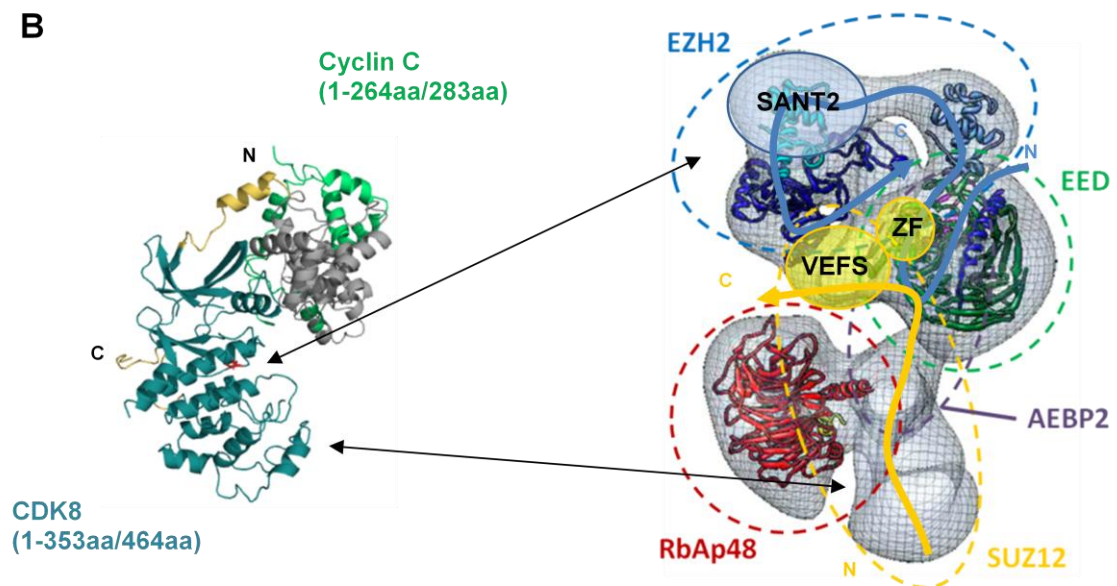


図 9. CDK8/CycC 複合体と PRC2 複合体の相互作用モデル

- (A) CDK8 または CDK19 と SUZ12 および EZH2 との相互作用モデル。
(B) ヒト CDK8/Cyclin C 複合体の結晶構造 (Schnider E.V. *et al.* 2011) とヒト PRC2-AEBP2 複合体の電子顕微鏡像 (Ciferri C. *et al.* 2012) を示す。

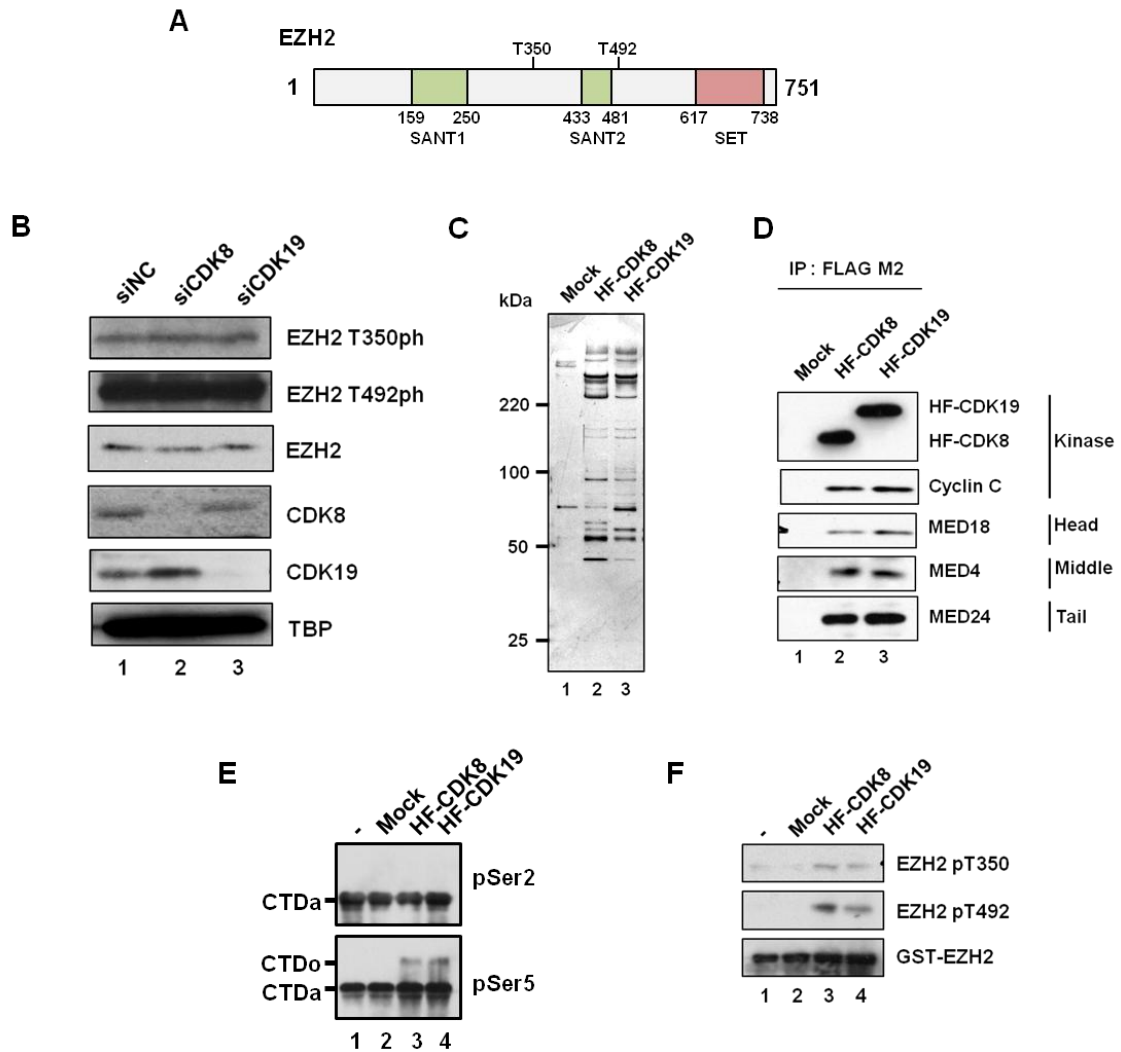


図 10. HF-CDK8 または HF-CDK19 を含むメディエーター複合体は EZH2 の 492 番目スレオニンをリン酸化する。

(A) EZH2 のアミノ酸モチーフの模式図。

(B) Ntera2 cl. D1 細胞に CDK8 または CDK19 を標的とする siRNA を終濃度 20 nM で導入し 60 時間の培養後、核抽出液を回収した。回収したタンパク質を SDS-PAGE によって展開し、免疫ブロットにより EZH2 リン酸化に与える影響および遺伝子ノックダウン効率を評価した。siNC は Non targeting control を示す

(C) FLAG M2 agarose を用いて精製したメディエーターを 0.3 mg/mL の FLAG ペプチドで溶出し、5-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE で展開し、silver stain MS kit (Wako) で銀染色を行った。

(D) (C) で精製したメディエーターに含まれる各サブモジュールのサブユニットを免疫ブロット法により確認した。

- (E) 精製した大腸菌発現の GST-mCTD full length を用いて、*in vitro* で HF-CDK8 または HF-CDK19 を含むメディエーターのリン酸化活性をそれぞれのリン酸化特異的な抗体を用いて評価した。
- (F) 精製した大腸菌発現の GST-EZH2 を用いて、*in vitro* で HF-CDK8 または HF-CDK19 を含むメディエーターのリン酸化活性をそれぞれのリン酸化特異的な抗体を用いて評価した。

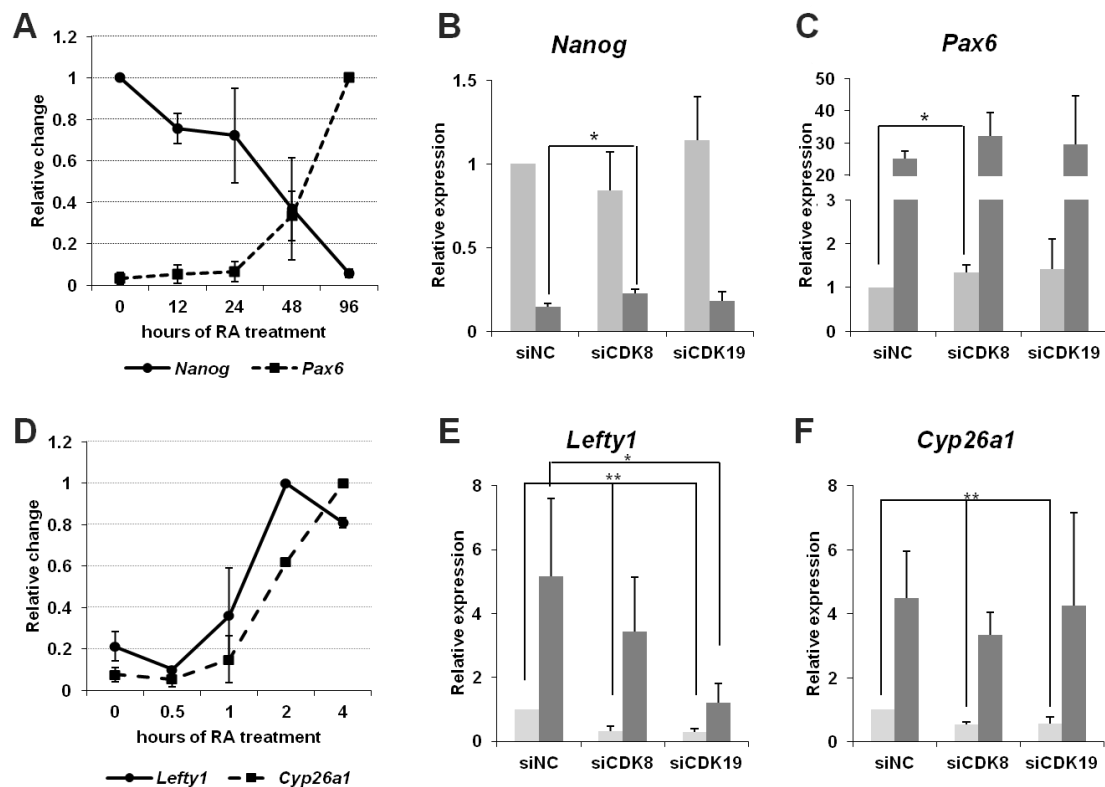


図 11. CDK8 または CDK19 に遺伝子ノックダウンがレチノイン酸標的の遺伝子発現に与える影響

(A, B) Ntera2 cl. D1 細胞を 10 μ M の retinoic acid (RA) で経時的に処理した後、トータル RNA を回収してそれぞれの遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR で測定した (n=2)。

(C, D) Ntera2 cl. D1 細胞に CDK8 または CDK19 を標的とする siRNA あるいは非ターゲット siRNA (siNC) を導入し、遺伝子ノックダウンを行った後、RA 処理または vehicle (DMSO) 処理したもののトータル RNA を回収し、RT-qPCR で *Nanog* 遺伝子または *Pax6* 遺伝子の mRNA 発現量を測定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, student's *t* test, n=3~5)。RA-: DMSO, RA+: 10 μ M RA, 48 時間。

(E, F) Ntera2 cl. D1 細胞に CDK8 または CDK19 を標的とする siRNA あるいは非ターゲット siRNA (siNC) を導入し、遺伝子ノックダウンを行った後、RA 処理または vehicle (DMSO) 処理したもののトータル RNA を回収し、RT-qPCR で *Lefty1* 遺伝子または *Cyp26a1* 遺伝子の mRNA 発現量を測定した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, student's *t* test, n=3~5)。RA-: DMSO, RA+: 10 μ M RA, 2 時間。

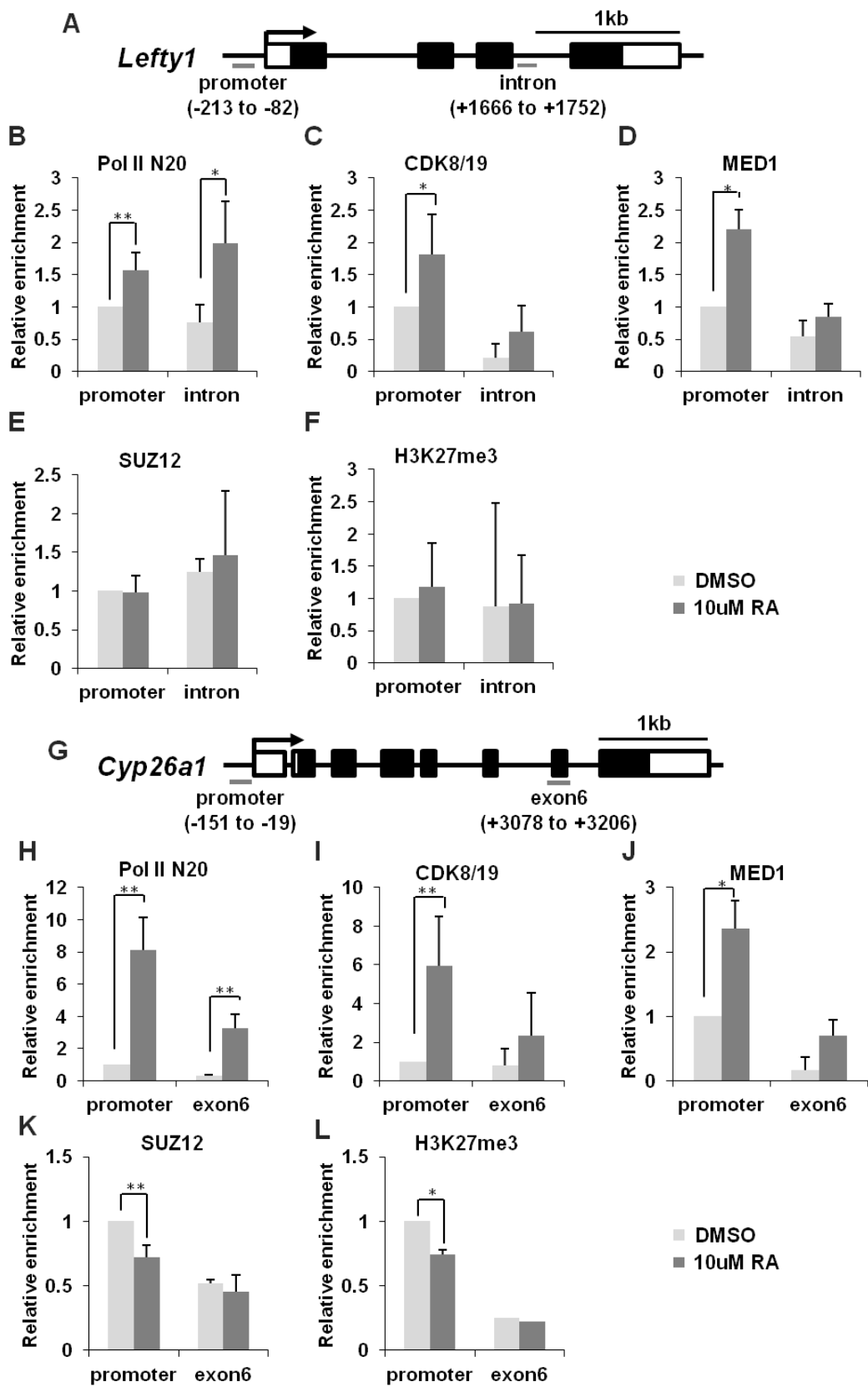


図 12. Ntera2 cl. D1 細胞を用いたレチノイン酸刺激による神経細分化に関わるレチノイン酸標的遺伝子上でのタンパク質局在変化の観察

Ntera2 cl. D1 細胞を 10 μ M の retinoic acid (RA) で 2 時間処理した後、それぞれの抗体を用いて ChIP-qPCR を行った (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, student's t test, $n=3$)。

(A) *Lefty1* 遺伝子の模式図と qPCR に用いた遺伝子のプロモーターまたはイントロン領域を増幅するプライマーの位置を示す。

(B-F) *Lefty1* 遺伝子プロモーターまたはイントロン上における Pol II, CDK8/19, MED1, SUZ12, H3K27me3 の ChIP シグナル。

(G) *Cyp26a1* 遺伝子の模式図と qPCR に用いた遺伝子のプロモーターまたはエクソン領域を増幅するプライマーの位置を示す。

(H-L) *Cyp26a1* 遺伝子プロモーターまたはエクソン上における Pol II, CDK8/19, MED1, SUZ12, H3K27me3 の ChIP シグナル。

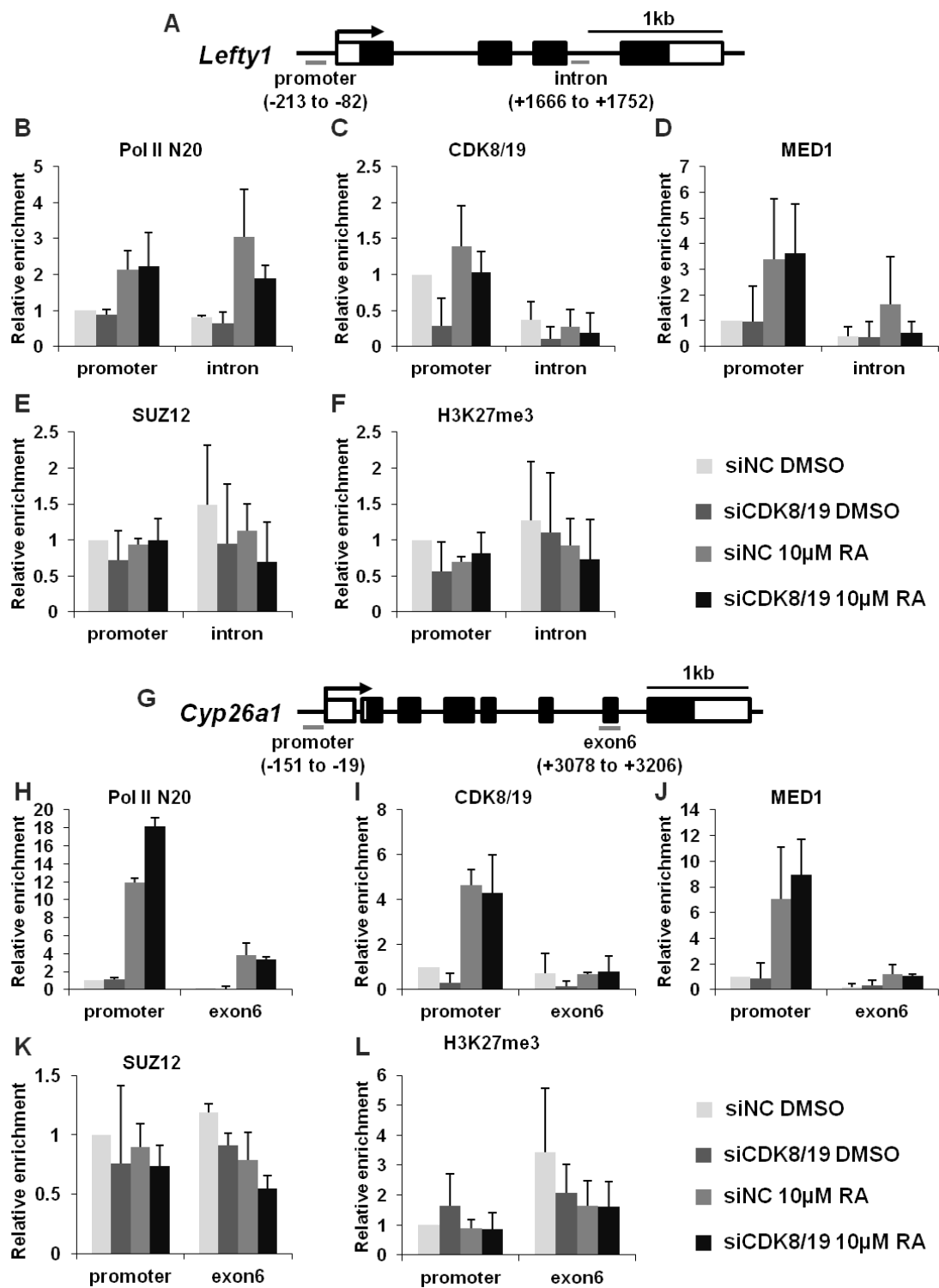


図 13. Ntera2 cl. D1 細胞での CDK19/8 遺伝子ダブルノックダウンによる神経細分化に関わるレチノイン酸標的遺伝子上でのタンパク質局在変化の観察

Ntera2 cl. D1 細胞を用いて、CDK8 と CDK19 を標的とする siRNA の同時導入または非ターゲット siRNA (siNC) の導入による遺伝子ノックダウンを行った後、10 μ M の retinoic acid (RA) で 2 時間処理し、それぞれの抗体を用いて ChIP-qPCR を行った (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, student's t test, $n = 3$)。

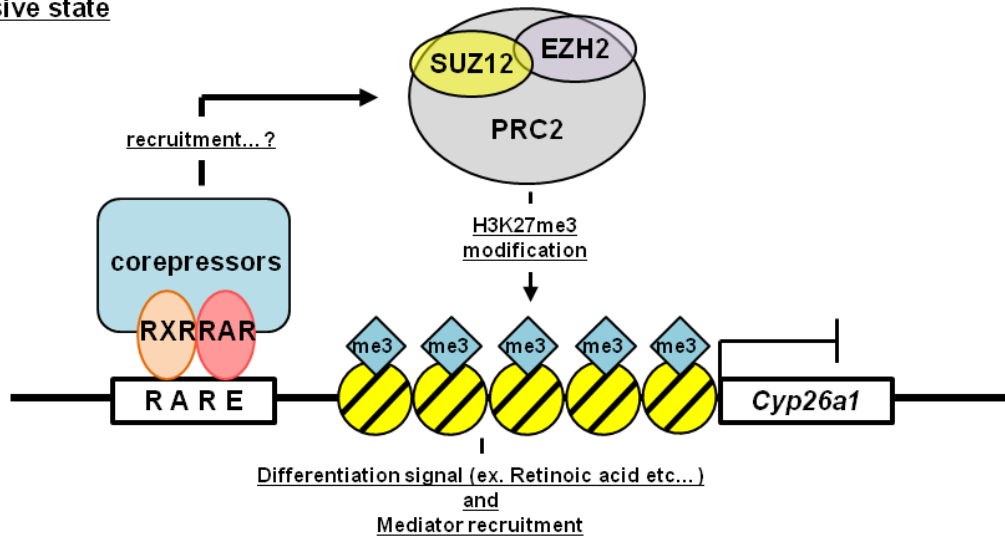
(A) *Lefty1* 遺伝子の模式図と qPCR に用いた遺伝子のプロモーターまたはイントロン領域を増幅するプライマーの位置を示す。

(B-F) *Lefty1* 遺伝子プロモーターまたはイントロン上における Pol II, CDK8/19, MED1, SUZ12, H3K27me3 の ChIP シグナル。

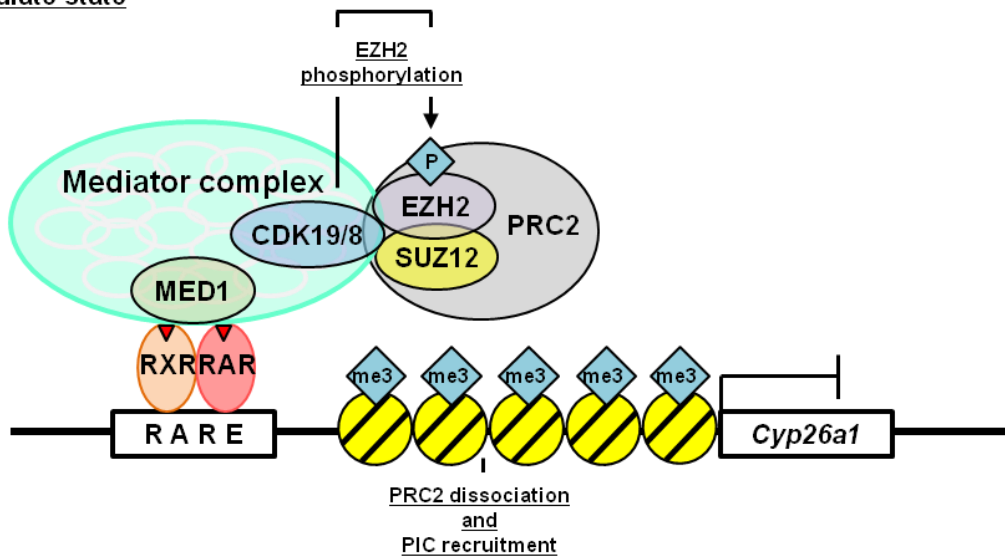
(G) *Cyp26a1* 遺伝子の模式図と qPCR に用いた遺伝子のプロモーターまたはエクソン領域を増幅するプライマーの位置を示す。

(H-L) *Cyp26a1* 遺伝子プロモーターまたはエクソン上における Pol II, CDK8/19, MED1, SUZ12, H3K27me3 の ChIP シグナル。

Repressive state



Intermediate state



Active state

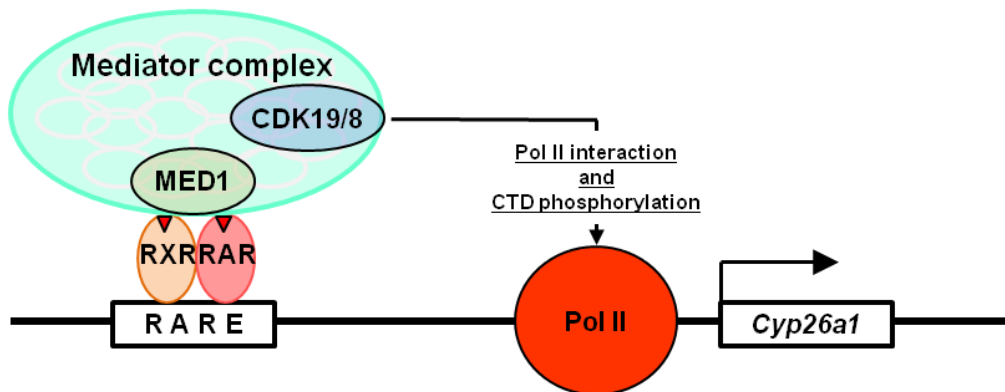


図 14. 神経細胞分化時におけるメディエーター複合体と PRC2 による転写制御モデル

未分化時において PRC2 はプロモーター上でヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化を行うことで転写抑制に関わっている。レチノイン酸刺激後、MED1 を介して遺伝子上にメディエーターがリクルートされ、CDK19 または CDK8 により EZH2 がリン酸化を受け、遺伝子プロモーター上から PRC2 が解離する。その後、Pol II を含む転写開始複合体をメディエーターがリクルートし、CDK19 または CDK8 によって Pol II CTD がリン酸化を受け、転写開始から伸長へと移行する。

2.4 メディエーター複合体のキナーゼサブユニットによる転写抑制機構の解析

メディエーターの CDK サブユニットである CDK8 は、これまで一般的には転写の抑制に関わると考えられてきた (29,94)。当研究室において、CDK19 および CDK8 はそれぞれが相互排他的にメディエーターを形成する一方で、マイクロアレイ解析から CDK19 および CDK8 は HeLa S3 細胞内では主に、ほぼ同一の遺伝子を標的として転写の活性化と抑制の相反的に働くことを見出ししてきた (23,81)。以上より、メディエーターの CDK が転写制御に関わることが示唆されるが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。その中でも、C/EBP β による転写制御過程において、CDK8 が転写抑制に関与している可能性が示唆されており、また、*in vitro* 転写解析から、CDK8 を含むホロ・メディエーターは転写活性化に対して抑制的に働くことが知られている (37,95)。そこで、C/EBP β 標的遺伝子の制御における CDK19 と CDK8 の役割に着目し、ホロ・メディエーターによる転写抑制の分子機構解明を目指した。

2.4.1 C/EBP β 標的遺伝子上における CDK19 または CDK8 の局在解析

C/EBP β は MAPK によるリン酸化を受けて構造変換を起こすことにより活性化すると考えられており、MAPK を活性化すると考えられている発がんプロモーターである Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激により標的遺伝子の転写を活性化する (36)。まず、HeLa S3 細胞においての C/EBP β 標的遺伝子の転写制御機構を解析するために、HeLa S3 細胞を PMA で処理した際の、C/EBP β 標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、C/EBP β 標的遺伝子である *IL-8* および *TNF α* の mRNA 発現量が PMA 刺激によって誘導されることが分かった (図 15A, B)。

次に、これら遺伝子上での C/EBP β , CDK19 および CDK8、そして転写活性化の指標である CTD がリン酸化された Pol II の存在量を ChIP-qPCR により解析した。その結果、mRNA 発現量解析からも予想されるように、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上における C/EBP β の存在量は、PMA 刺激により増加した (図 15C, D)。このことから、これらの遺伝子は HeLa S3 細胞においても C/EBP β によって転写制御を受けており、PMA 刺激により転写が活性化されることが分かった。また、転写活性化の指標であるリン酸化された Pol II CTD の存在量も、PMA 刺激により *IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーターおよびエクソン上で増加した (図 15C, D)。そして、これまでの報告同様に PMA 刺激により、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーターでの CDK19 および CDK8 の存在量が減少した (図 15C, D)。このことは、PMA 刺激に応答して CDK19 および CDK8 が *IL-8* および *TNF α* 遺伝子プロモーター上から解離することを示しており、

CDK19 および CDK8 が C/EBP β による転写活性化に対して抑制的に関与することが示唆される。

2.4.2 CDK19 または CDK8 による C/EBP β 標的遺伝子の転写制御の解析

2.2.1 の結果から、C/EBP β 標的遺伝子のプロモーター上において CDK19 および CDK8 が転写抑制因子のように機能することが分かった。そこで、CDK19 および CDK8 が C/EBP β 標的遺伝子の転写抑制に関与しているかをさらに検討するため、siRNA 導入による CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンを行い、C/EBP β 標的遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR により測定した。その結果、*IL-8* および *TNF α* 遺伝子の mRNA 発現量は、非誘導状態において CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンによって増加した (図 15E)。このことは、CDK19 および CDK8 が遺伝子プロモーター上に存在している状態で *IL-8* および *TNF α* 遺伝子の転写抑制に関与していることを示唆している。

2.4.3 CDK8 または CDK19 が構成するメディエーター複合体の新規相互作用因子の探索

CDK19 および CDK8 による転写抑制機構を解明するために、HF-CDK8 または HF-CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞株の核抽出液から、それぞれの CDK を含むメディエーター複合体を精製し、相互作用因子の探索を行った。未知の相互作用因子を同定するために、今回精製したメディエーター複合体の銀染色像から予想されるメディエーター複合体サブユニット以外のバンドを相互作用因子とみなし、銀染色バンドを切り出して、LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、これらはそれぞれ PRMT5 と WDR77 であることを明らかにした (図 16A)。さらに、免疫プロット解析から PRMT5 と WDR77 は HF-CDK19 または HF-CDK19 をそれぞれ含むメディエーターと相互作用していることが明らかになった (図 16C)。

2.4.4 PRMT5 および WDR77 との *in vitro* および *in vivo* 相互作用解析

PRMT5 と WDR77 は、anti-FLAG 精製時に非特異的に相互作用が検出されるタンパク質である (96)。そこで、CDK19 または CDK8 と PRMT5, WDR77 との相互作用をさらに検証するため、HF-CDK8 または HF-CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞株の核抽出液をゲルろ過後、約 2MDa のホロ・メディエーターに相当するフラクションから FLAG 精製を行った。その結果、HF-CDK8 を安定発現する HeLa S3 細胞株から調製した核抽

出液のゲル濾過より、ホロ・メヂエーター特異的な MED12 サブユニットがコア・メヂエーターの MED15 サブユニットと共に約 2MDa の分子量にピークを持つことが分かった (図 17A)。しかし、PRMT5 と WDR77 は約 1MDa に相当するフラクションにピークがみられ、約 2MDa のフラクションにはあまり存在していなかった。この PRMT5 と WDR77 の約 1MDa のピークはメチロソームと呼ばれる複合体であると考えられる (97)。また、同様の結果を HF-CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞株から調製した核抽出液のゲル濾過解析により確認した (図 17B)。そして、両 CDK の約 2MDa のフラクションを用いて anti-FLAG 精製を行い、共沈降したタンパク質を免疫ブロットにより確認した。その結果、両 CDK が形成する複合体に他のメヂエーターサブユニットおよび PRMT5, WDR77 が含まれることが分かった (図 17C, D)。これらのことから、PRMT5 と WDR77 は CDK を含むホロ・メヂエーターと複合体を形成していると考えられる。

次に、PRMT5 と WDR77 が CDK19 または CDK8 と直接結合するかを検証するため、N 末に S タグを融合させた PRMT5 (S-PRMT5) または WDR77 (S-WDR77) と HF-CDK19 または HF-CDK8 を HeLa S3 細胞内で共発現させ、S タグに対するアフィニティー精製を行った。その結果、S-PRMT5 および S-WDR77 はそれぞれ、HF-CDK19 または HF-CDK8 と相互作用することが明らかになった (図 18A, B)。このことは、HeLa S3 細胞より精製された HF-CDK8 または CDK19 を含むメヂエーターと PRMT5 および WDR77 との相互作用が FLAG 精製による非特異的な反応ではないことを示している。さらに、大腸菌発現の N 末に GST タグの融合した CDK19 または CDK8 と、同じく大腸菌発現の S-PRMT5 および S-WDR77 を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、両 CDK に PRMT5 と WDR77 が直接結合することが明らかになった (図 18C)。

2.4.5 C/EBP β 標的遺伝子上における PRMT5、ヒストン H4R3 メチル化および DNMT3A の局在解析

前節 2.4.4 より、CDK を含むホロ・メヂエーターが PRMT5 および WDR77 と複合体を形成することが明らかになった。PRMT5 は、タイプ II に属するアルギニンメチル基転移酵素であり、タンパク質のアルギニン残基に対称的なメチル基付加を触媒する (54)。特に、ヒストンタンパク質をメチル化することで知られており、ヒストン修飾因子として機能するときは転写抑制因子である (55)。また、WDR77 は PRMT5 のコファクターとして知られている (97)。さらに、これまでのゲノムワイドな ChIP 解析から H4R3me2s が発現量の少ない遺伝子上に局在していることが分っている (58)。これらの

ことから、PRMT5 が直接 C/EBP β 標的遺伝子の転写抑制に関与しているかを検討するため、C/EBP β 標的遺伝子上での PRMT5 やそのヒストン修飾 H4R3me2s の存在量を ChIP-qPCR を用いて解析した。その結果、PMA 刺激により、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上において、CDK19 および CDK8 の挙動と同様に、PRMT5 の存在量が減少した (図 19A, B)。また、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上における H4R3me2s の存在量も、PMA 刺激により減少した (図 19A, B)。さらに、PRMT5 は、DNMT3A と直接相互作用することや、DNMT3A は H4R3me2s を認識し、標的遺伝子の CpG をメチル化することで転写抑制に関与すると報告されている (57)。これらのことから、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上における DNMT3A の存在量も同様に ChIP-qPCR より解析した。その結果、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上において、PRMT5 と H4R3me2s の挙動と同様に、DNMT3A の存在量が減少した (図 19A, B)。そして、これまでの報告と一致して、H4R3me2s はエクソン領域にもみられ、この修飾を認識すると考えられる DNMT3A もエクソン上に存在することが分かった (図 19A, B)。これらのことから、PRMT5 と DNMT3A は、CDK19 および CDK8 と同様に *IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上に存在している状態で転写を抑制しており、PMA 刺激により、PRMT5 と DNMT3A が段階的に遺伝子プロモーター上から解離することが示唆される。

これまでの ChIP-qPCR 解析から、PMA 刺激による PRMT5 の C/EBP β 標的遺伝子プロモーターからの解離は、CDK19 および CDK8 と同様の挙動を示すことが明らかになった。次に、CDK19 および CDK8 が PRMT5 の C/EBP β 標的遺伝子プロモーターへのリクルートに関与しているかを検討するため、siRNA 導入により CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンを行った時の、C/EBP β 標的遺伝子上における PRMT5 および DNMT3A の存在量を ChIP-qPCR を用いて解析した。その結果、CDK19 と CDK8 の遺伝子ダブルノックダウンにより、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上での PRMT5 の存在量 10 から 20%にまで減少した (図 20A, B)。さらに、*IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上での DNMT3A の存在量も著しく減少した (図 20A, B)。このことから、PRMT5 と DNMT3A は CDK19 および CDK8 によって C/EBP β 標的遺伝子のプロモーター上へリクルートされることが示唆される。

2.5 考察

メディエーターは、転写の活性化と抑制の両方を制御できる巨大な複合体である。こ

れまでに、核内受容体を含む様々な DNA 結合性の転写制御因子との相互作用を介してメディエーターが転写の活性化に関わることが明らかにされてきたのに対して、転写の抑制にどのように関わるかについては不明な点が多い。とりわけ、メディエーターによる転写の抑制には CDK/Cyclin モジュールを含んだホロ・メディエーターが関わりと考えられており、多様な抑制機構が報告されているがその実態については議論の余地がある。そこで我々は、2 つの CDK サブユニットを介したホロ・メディエーターによる転写抑制機構に着目し、研究を行った。

本研究では、PMA 刺激によって誘導される転写誘導系をモデルとして用い、HeLa S3 細胞において CDK19 および CDK8 は、C/EBP β 標的遺伝子のプロモーター上に存在し、PMA による発現誘導によりプロモーター上から解離すること (図 15)、また、それぞれの CDK を標的とする siRNA を導入すると、C/EBP β 標的遺伝子の mRNA 発現量が増加することから、CDK19 および CDK8 は C/EBP β 標的遺伝子の転写抑制から活性化への移行に関わることを明らかにした (図 15)。さらに、CDK を含むホロ・メディエーターによる転写抑制機構を明らかにするために、CDK19 または CDK8 を含むメディエーターと相互作用する因子の探索を行った。その結果、ヒストンメチルトランスフェラーゼである PRMT5 とそのコファクター WDR77 を新規相互作用因子とした (図 16, 17, 18)。さらに、*in vitro* 相互作用解析から、これらの相互作用因子は CDK19 および CDK8 と直接結合することを明らかにした (図 18)。PRMT5 はヒストン H4 の 3 番目アルギニンの対称的なメチル化 (H4R3me2s) を行い、転写抑制に関わりと考えられている (55)。そこで、C/EBP β 標的遺伝子の転写制御における関係性を調べたところ、PRMT5 は C/EBP β の遺伝子プロモーター上に存在し、PMA 刺激によってプロモーターから解離するだけでなく、H4R3me2s も PRMT5 と挙動を同じくして減少することが明らかとなった (図 19, 20)。さらに、H4R3me2s を認識することで遺伝子上にリクルートされ、DNA のメチル化を行うことで転写抑制に関わる DNMT3A との関係性にも着目したところ、DNMT3A も C/EBP β 標的遺伝子のプロモーター上に存在し、PRMT5 と協調的に転写抑制に寄与していることが示唆された (図 19, 20)。これらの結果から、CDK19 と CDK8 は PRMT5 を *IL-8* および *TNF α* の両遺伝子プロモーター上にリクルートすることにより、プロモーター領域のヒストン H4 の R3me2s 修飾を制御し、さらに H4R3me2s の認識を介した DNMT3A のプロモーター上へのリクルートを行うことで標的遺伝子の転写を抑制していると考えられる (図 21)。

C/EBP β は、非リン酸化状態では転写抑制に働き、この時にホロ・メディエーターと

相互作用し、これをプロモーターにリクルートすることが知られているが、その詳細な転写抑制機構は明らかにされていなかった (37)。今回の解析で得られた結果から、ホロ・メディエーターの CDK サブユニットは PRMT5 および WDR77 をリクルートし、メチル化されたヒストン H4 のアルギニン残基を DNMT3A が認識して転写抑制状態が構築されると我々は考えている。そして、転写を活性化するときには C/EBP β は MAPK によるリン酸化が構造変化を引き起こし、この構造変化を認識してホロ・メディエーターから CDK/Cyclin モジュールが外れるか、ホロ・メディエーターとコア・メディエーターの交換が行われることにより標的遺伝子のプロモーター上でメディエーターの構造変化が促されて転写の活性化が起こると考えられる。また、C/EBP β と相互作用すると知られているメディエーターサブユニットは 2 つ知られており、MED23 はリン酸化状態と非リン酸化状態のどちらでも相互作用するが、MED1 は C/EBP β のリン酸化によって相互作用が亢進することが知られている (35,37)。このように、少なくともコア・メディエーターは C/EBP β 標的遺伝子の転写活性化に関わることから、今後は、mRNA 発現量解析や ChIP-qPCR を用いて C/EBP β の転写制御シグナルのメディエーターへの入力およびメディエーターからの出力、そして遺伝子プロモーター上に存在するメディエーターの構成を解析することにより、転写活性化状態におけるメディエーターの役割を詳細に理解していきたいと考えている。

また、ChIP-qPCR 解析から、C/EBP β 標的遺伝子である *IL-8* 遺伝子および *TNF α* 遺伝子の転写制御は、CDK19 および CDK8 と PRMT5 によって協調的に行われることを明らかにした。しかしながら、PMA 刺激による PRMT5 の遺伝子上での挙動と、H4R3me2s の遺伝子上での挙動は完全に一致していない (図 20)。すなわち、*TNF α* 遺伝子において、PMA 刺激により、プロモーター上における PRMT5 の存在量が著しく減少する一方で、H4R3me2s の存在量は若干の変化が認められただけである。このことは、PRMT5 とは異なる PRMT が相補的に関与している可能性が示唆される。特に、PRMT7 は PRMT5 と同様にタイプ II の PRMT に属し、H4R3me2s に関わる (98)。さらに、脱メチル化酵素である JMJD6 による脱メチル化反応は、*IL-8* 遺伝子および *TNF α* 遺伝子において異なる可能性も考えられる。これらのことから、CDK19 および CDK8 と PRMT5 とは異なる PRMT や脱メチル化酵素との関係性についても明らかにしていきたいと考えている。

興味深いことに、PRMT5 のヒストンメチル化活性は WDR77 の CDK4 によるリン酸化によって活性化されることが報告されており、CDK19 と CDK8 も PRMT5 のリクル

ートだけでなく、活性制御に関与する可能性も考えられる (99)。今後は、CDK19 および CDK8 による PRMT5 のリン酸化解析や、CDK 欠失変異体を用いた相互作用解析からメディエーターCDK と PRMT5 との関係性をより詳細に解析していきたいと考えている。加えて、PRMT5 の下流で機能する DNMT3A による DNA メチル化が C/EBP β 標的遺伝子の転写抑制に関与しているかを検討するため、バイサルファイトシーケンス解析によるゲノムワイドな DNA メチル化解析を行うことで、メディエーターによる C/EBP β 標的遺伝子の転写制御を包括的に理解していきたいと考えている。

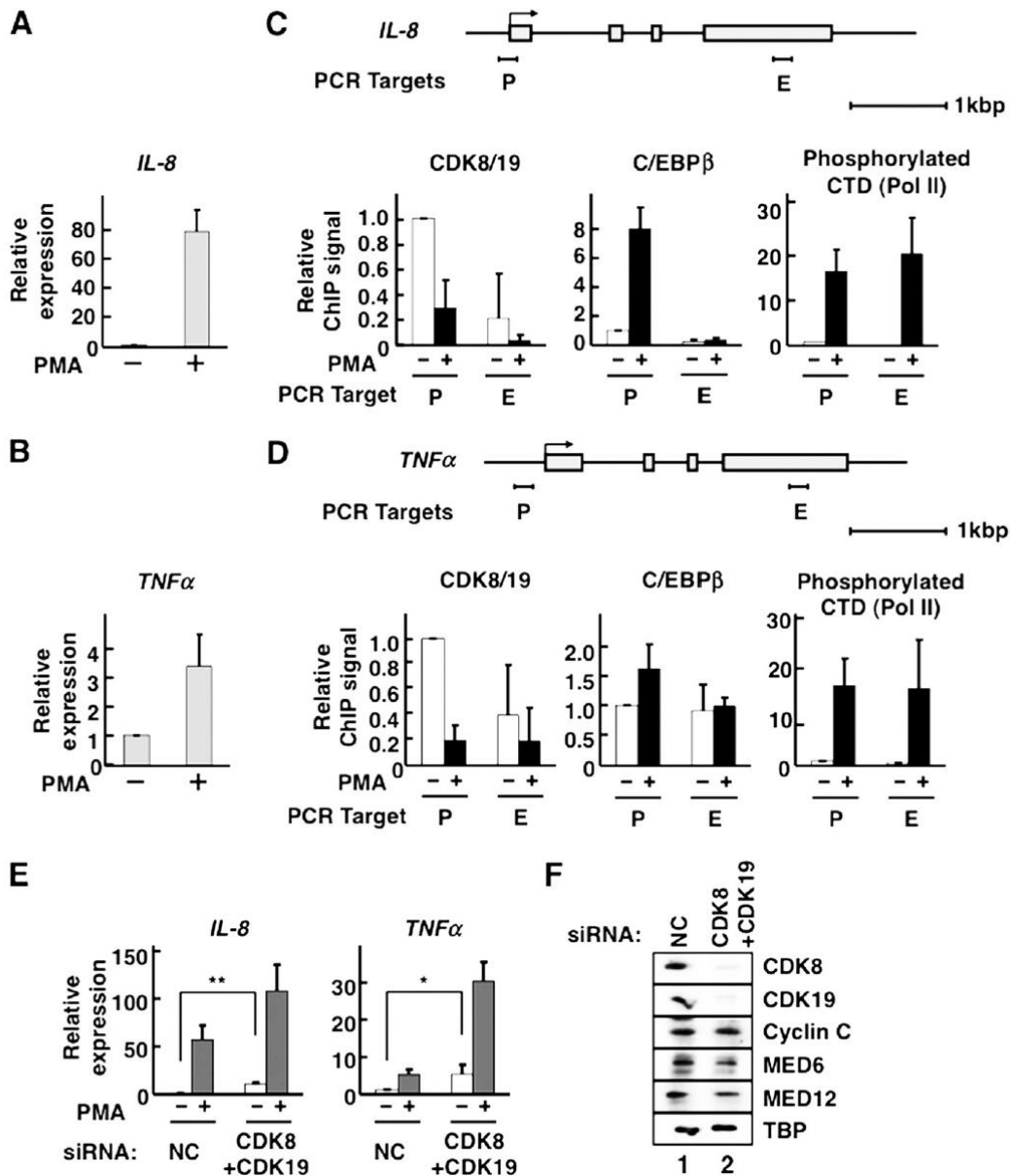


図 15. メディエーターCDK は C/EBPβ 標的遺伝子の転写を抑制する

(A, B) HeLa S3 細胞を 25 ng/ml の濃度で 2 時間の PMA 刺激を行った後、トータル RNA を回収して、RT-qPCR でそれぞれの遺伝子の発現量を解析した (n=2)。

(C, D) HeLa S3 細胞を 25 ng/ml の濃度で 2 時間の PMA 刺激を行った後、それぞれの抗体を用いて ChIP を行い、*IL-8* 遺伝子または *TNFα* 遺伝子のプロモーターまたはエクソン領域を増幅するプライマーを用いて qPCR を行った (n=3)。PMA 無刺激時のプロモーター上での存在量を 1 とした時の相対値を示す。各遺伝子の構造と qPCR で増幅した領域 (PCR Targets) をグラフ上の模式図で示す。

(E) HeLa S3 細胞を用いて、CDK8 と CDK19 を標的とする siRNA の同時導入または

非ターゲット siRNA (siNC)の導入による遺伝子ノックダウンを行った後、25 ng/ml の濃度で2時間のPMA刺激を行ったもののトータルRNAを回収し、RT-qPCRでそれぞれの遺伝子の発現量を解析した (n=4; *: p<0.05, **: p<0.01)。PMA無刺激時のsiNCシグナルを1とした時の相対値を示す。

(F) HeLa S3細胞をCDK8とCDK19を標的とするsiRNAを同時に導入し、遺伝子ノックダウンを行って回収した細胞抽出液をSDS-PAGEで展開し、免疫ブロットによりタンパク発現に与える影響を確認した。

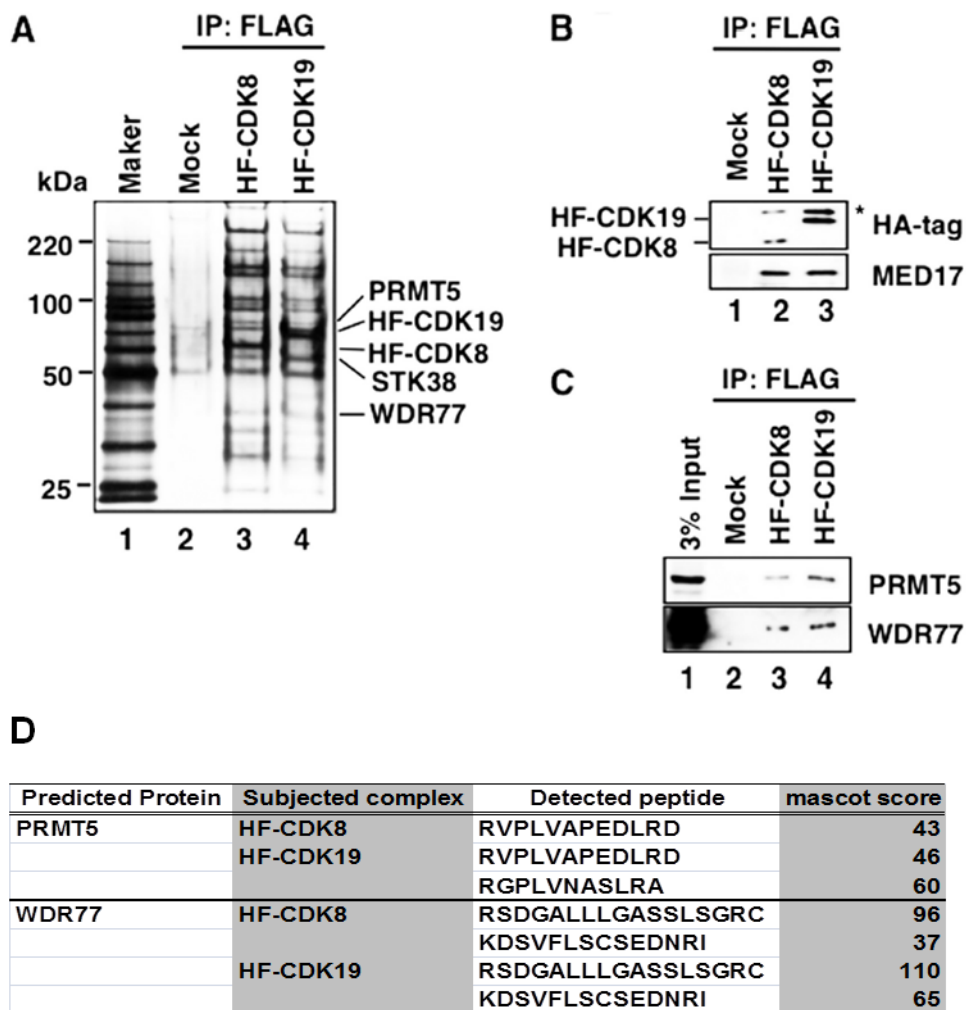


図 16. CDK19 または CDK8 を含むメディエーターと相互作用する因子の探索

- (A) HF-CDK19 または HF-CDK8 を安定発現する HeLa S3 細胞株から調製した核抽出液から、FLAG M2 agarose を用いてそれぞれの CDK を含むメディエーターを精製した。精製した各 CDK を含むメディエーター画分を 4-15% グラジエントゲルを用いて SDS-PAGE で展開し、銀染色を行った。その後、LC-MS/MS で切り出したバンドの解析を行い、同定された相互作用因子を示す。
- (B) アフィニティー精製したメディエーター画分を SDS-PAGE で展開し、免疫ブロットによってメディエーターの存在を確認した。
- (C) アフィニティー精製したメディエーター画分を SDS-PAGE で展開し、免疫ブロットによって PRMT5 および WDR77 との相互作用を確認した。
- (D) LC-MS/MS により検出されたペプチドとその mascot スコア。

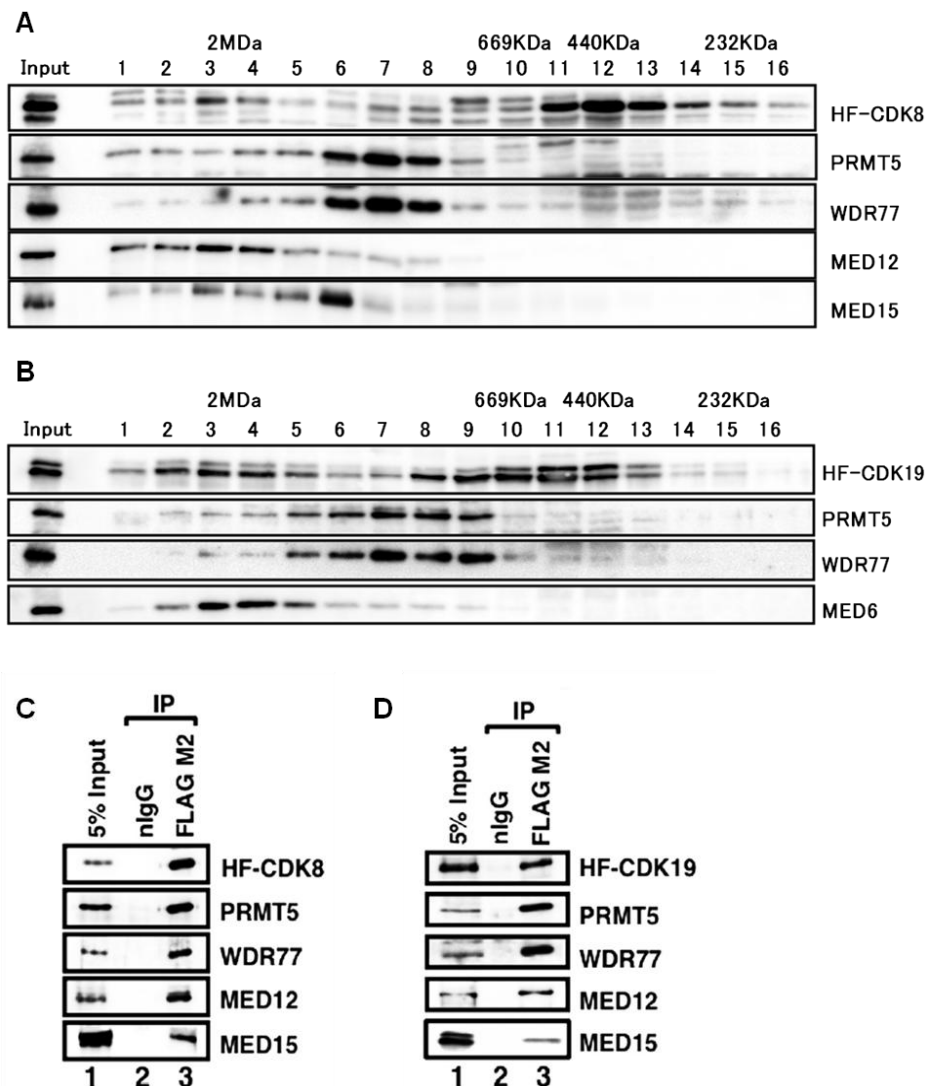


図 17.2 段階精製を行ったメディエーターは PRMT5 および WDR77 と相互作用する

- (A) HF-CDK8 を安定発現する HeLa S3 細胞核抽出液を G4000SW x 1 カラムでゲル濾過を行い、それぞれの抗体を用いて免疫ブロットした。推定される分子量を上に表示している。
- (B) HF-CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞核抽出液を G4000SW x 1 カラムでゲル濾過を行い、それぞれの抗体を用いて免疫ブロットした。推定される分子量を上に表示している。
- (C) HF-CDK8 を安定発現する HeLa S3 細胞核抽出液の 2 MDa 付近のフラクションから anti-FLAG M2 を用いて、免疫沈降を行い、共沈降したタンパク質をそれぞれの抗体を用いて検出した。
- (D) HF-CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞核抽出液の 2 MDa 付近のフラクションから anti-FLAG M2 を用いて、免疫沈降を行い、共沈降したタンパク質をそれぞれの抗体を用いて検出した。

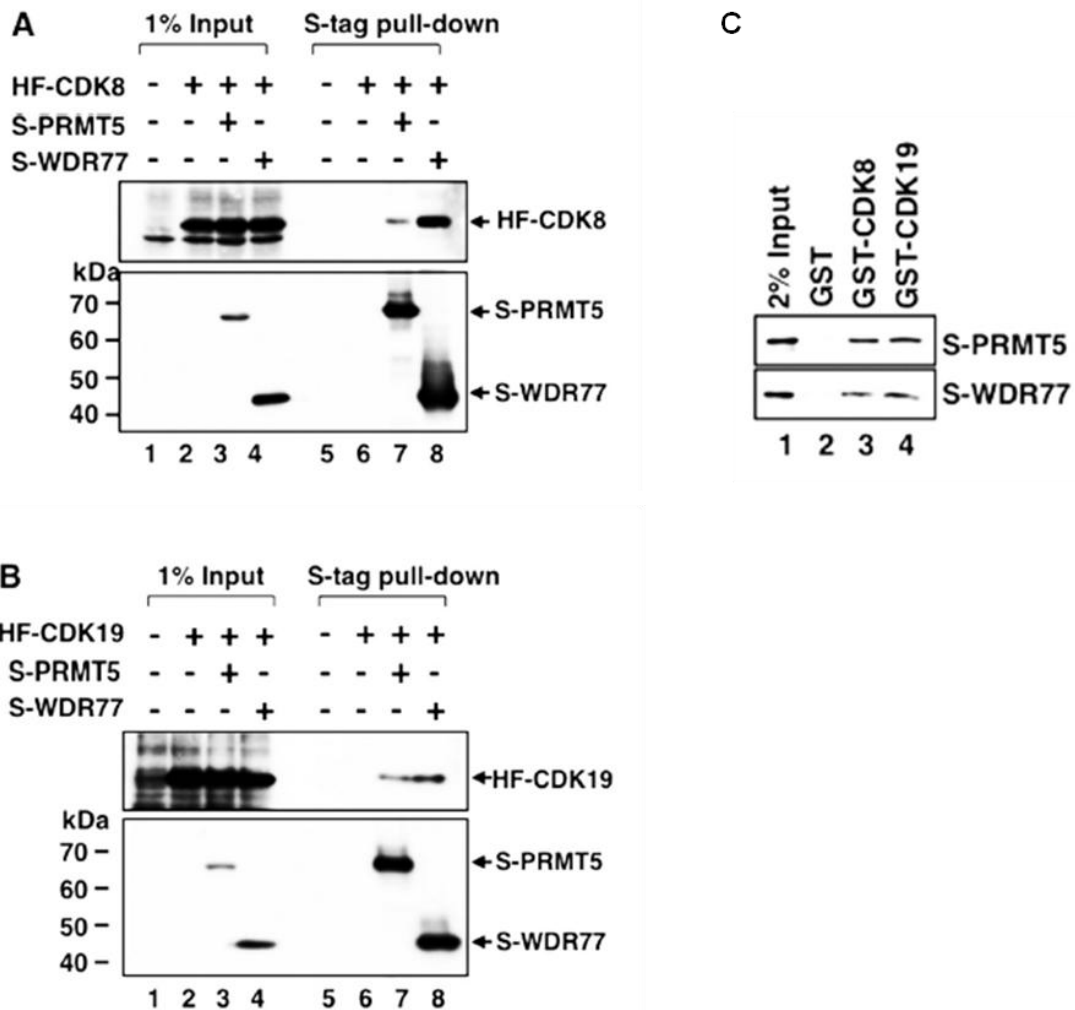


図 18. PRMT5 および WDR77 は *in vivo* および *in vitro* で、CDK19 または CDK8 を含むメディエーターおよび両 CDK と直接相互作用する

(A) HF-CDK8 と S-タグ融合 PRMT5 (S-PRMT5) または WDR77 (S-WDR77) 発現ベクターを HeLa S3 細胞に導入して回収した細胞抽出液を用いて、S タグに対するアフィニティー精製を行い、S-PRMT5 または S-WDR77 との相互作用を S タグに対する抗体を用いて検出した。

(B) HF-CDK19 と S-PRMT5 または S-WDR77 発現ベクターを HeLa S3 細胞に導入して回収した細胞抽出液を用いて、S タグに対するアフィニティー精製を行い、S-PRMT5 または S-WDR77 との相互作用を S タグに対する抗体を用いて検出した。

(C) 大腸菌発現 GST-CDK8 または CDK19 と大腸菌発現 S-PRMT5 または S-WDR77 を用いて *in vitro* 相互作用解析を行い、S タグ融合タンパク質との相互作用を S タグに対する抗体を用いて検出した。

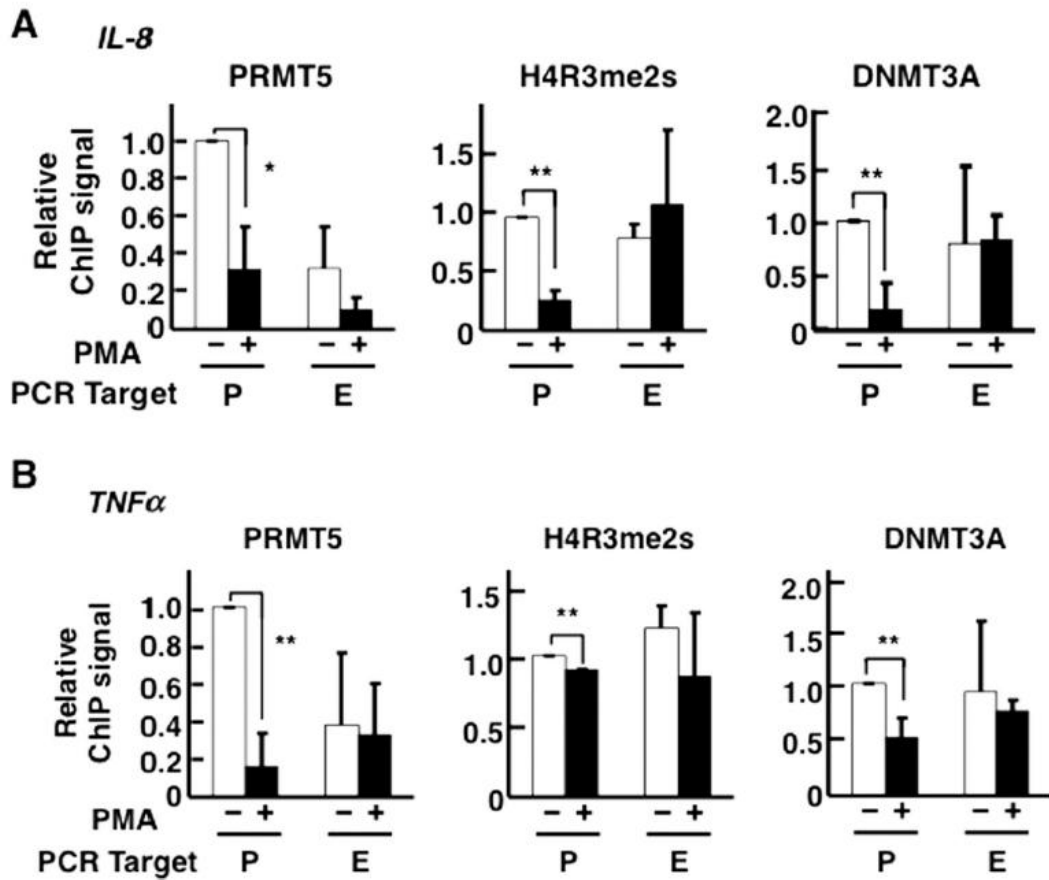


図 19. HeLa S3 細胞を用いた C/EBPβ 標的遺伝子上での PMA 刺激によるタンパク質局在変化の観察

HeLa S3 細胞を 25 ng/ml の濃度で 2 時間の PMA 刺激を行った後、それぞれの抗体を用いて ChIP を行い、*IL-8* 遺伝子 (A) および *TNFα* 遺伝子 (B) のプロモーターまたはエクソン領域を増幅するプライマーを用いて qPCR を行った (n=3)。PMA 無刺激時のプロモーター上での存在量を 1 とした時の相対値を示す (*: p<0.05, **: p<0.01)。

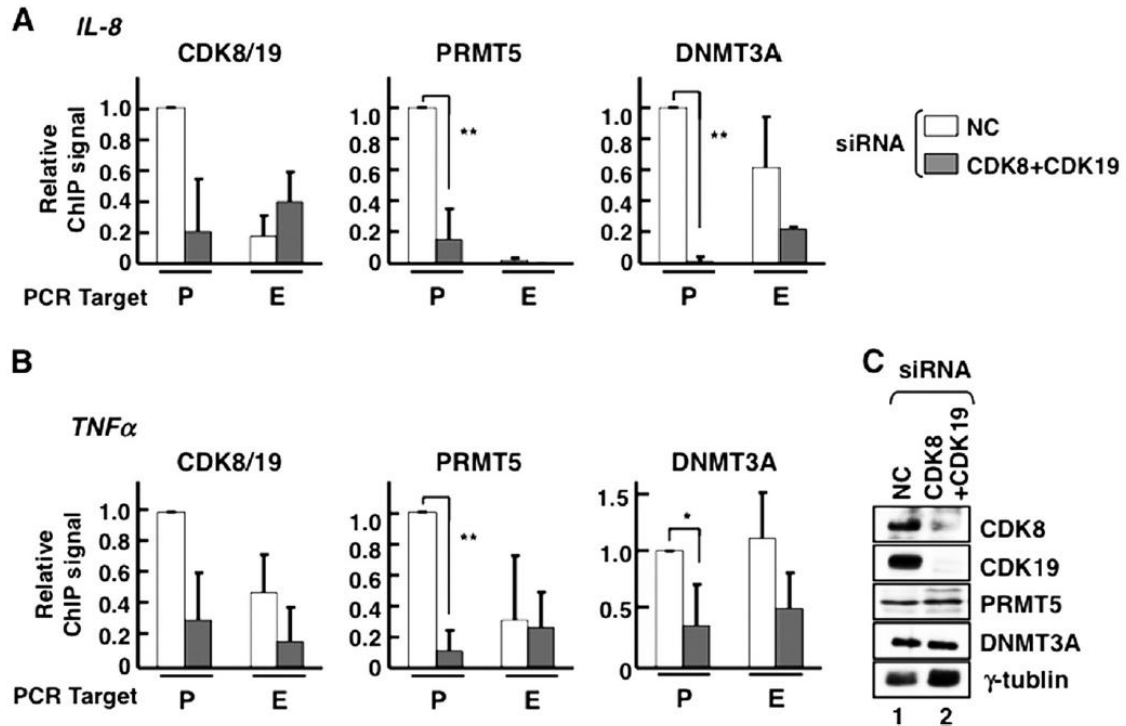


図 20. CDK8/19 のダブルノックダウンを行った HeLa S3 細胞における、C/EBPβ 標的遺伝子上でのタンパク質局在変化の観察

HeLa S3 細胞を用いて CDK8 または CDK19 を標的とする siRNA の同時導入あるいは非ターゲット siRNA (siNC) の導入による遺伝子ノックダウンを行った後、25 ng/ml の濃度で 2 時間の PMA 刺激を行い、それぞれの抗体を用いて ChIP を行い、*IL-8* 遺伝子 (A) および *TNFα* 遺伝子 (B) のプロモーターまたはエクソン領域を増幅するプライマーを用いて qPCR を行った (n=3)。PMA 無刺激時のプロモーター上での存在量を 1 とした時の相対値を示す (*: p<0.05, **: p<0.01)。

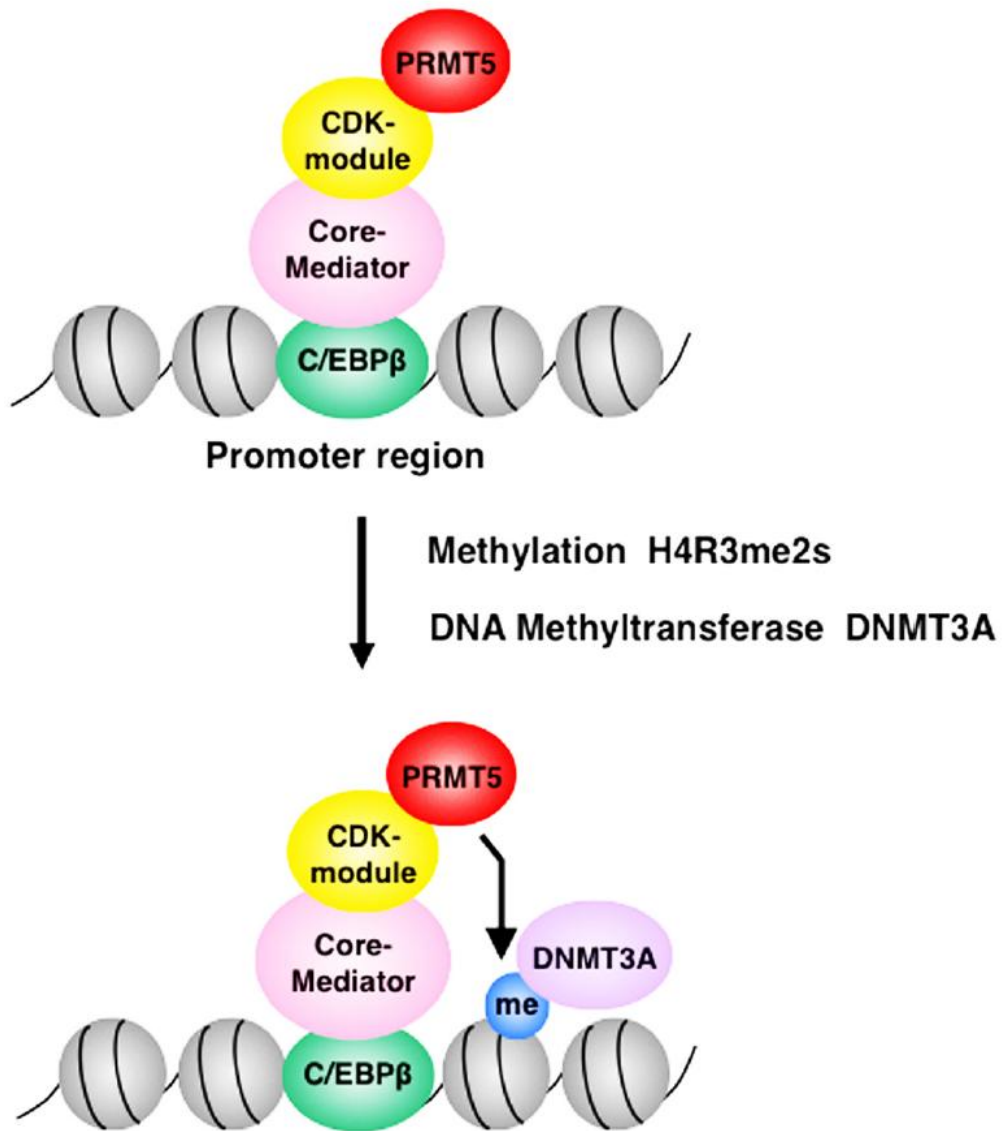


図 21. PRMT5 を介した CDK を含むホロメディエーターによる C/EBPβ 標的遺伝子の転写抑制機構モデル

C/EBPβ によって標的遺伝子上にリクルートされた CDK を含むホロ・メディエーターは、PRMT5 および WDR77 と相互作用している。PRMT5 はヒストン H4 の 3 番目アルギニン残基の対称的なジメチル化修飾(H4R3me2s)を行い、この修飾を認識して DNMT3A が標的遺伝子上にリクルートされる。DNMT3A はプロモーター領域の DNA メチル化修飾を行い、これらの一連の流れを介して C/EBPβ 標的遺伝子は転写の抑制状態を維持していると考えられる。

3. 総括

あらゆる生物において転写は遺伝子発現の第一段階であり、様々な環境応答に対して遺伝子レベルで生命の根幹を制御しているといえる。この時、多種多様なタンパク質が時間的、空間的に厳密な転写制御を行っており、その中核を成すのがメディエーターである。メディエーターは、細胞外からのシグナルを細胞核内で受容し、そのシグナルを遺伝子発現へと導く役割を果たしており、これまでに転写の活性化と抑制の両方で機能することが知られている。メディエーターは真核生物間で保存された約 30 個のサブユニットから構成されており、それぞれのサブユニットが異なる機能によって転写制御に関わっている。複合体中で唯一のキナーゼ活性を有する 2 つの CDK サブユニットである、CDK19 と CDK8 による遺伝子発現制御が注目されているが、その全容は明らかになっていない。特に、脊椎動物特異的に発現する CDK19 の機能解析はほとんど行われておらず、CDK19 による遺伝子発現制御をはじめ 2 つの CDK 間における機能的な違いに関する情報は極めて少ない。そこで本研究では、メディエーターの 2 つの CDK サブユニットである CDK19 と CDK8 に着目し、これらが行う遺伝子発現制御についての研究を行った。

メディエーターの 2 つの CDK の足掛かりとして、相互作用因子の探索を行った結果、エピジェネティックな転写制御に関わる因子との相互作用を見出した。まず、ヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化を行う PRC2 との関係性を追求した結果、メディエーターと PRC2 は神経細胞への分化誘導時において、協調的にレチノイン酸標的遺伝子の転写制御を行うことが示唆された。この過程において、CDK19 および CDK8 は神経細胞分化誘導時にレチノイン酸標的遺伝子の転写活性化を行っており、転写の抑制から活性化へのスイッチとしての役割を担う可能性が示唆される。また、ヒストン H4 の 3 番目アルギニンの対称的なメチル化を行う PRMT5 との関係性を追求した結果、CDK19 および CDK8 は PRMT5 の足場となることで C/EBP β 標的遺伝子の転写抑制を行うことを明らかにした。これらの解析から、CDK19 および CDK8 による新たな転写制御機構を見出すことが出来たことに加えて、近年注目を浴びるエピジェネティクスとの新たな関係性を見出すことが出来た。エピジェネティクスはクロマチン制御に関わっており、近年では細胞のがん化や分化と密接に関係することが知られている。今回解析対象としたレチノイン酸標的遺伝子は細胞の分化やリプログラミングに関わる因子をコードしていることが多く、また、C/EBP β 標的遺伝子は発がんプロモーターである PMA によって制御を受ける。このことから、メディエーターは CDK サブユニットを介して遺伝

子レベルで細胞分化やがん化の制御を行う可能性が示唆される。また、がんをはじめとする疾患でメヂエーターのサブユニットの発現異常や変異が報告されている。このことは、メヂエーターの転写制御における重要性が再認識されるとともに、再生医療やがん治療においてメヂエーター自身とメヂエーターと相互作用するエピジェネティック修飾因子が創薬ターゲットとしての可能性を強く示唆している。そのため、メヂエーターとエピジェネティック修飾因子による遺伝子レベルでの転写制御が、細胞レベルあるいは個体レベルにおいてどのような生理学的機能を有するかについて検討していきたいと考えている。

本研究においてメヂエーターの2つのCDK間の遺伝子発現制御における機能的な違いを見出すことは叶わなかったが、CDK19 または CDK8 を含むそれぞれのホロ・メヂエーターによる転写制御機構の一部を明らかに出来たことは新しい発見であり、薬学的にも意義のある発見が出来たと考えている。今後は、CDK19 または CDK8 をそれぞれ特異的に認識する抗体を用いた ChIP シーケンスのようなゲノムワイドな機能解析を取り入れることにより、CDK19 と CDK8 の機能的差異を明らかにし、メヂエーターによる遺伝子発現制御の理解を深めていきたいと考えている。

4. 実験方法

4.1 酵母 2 ハイブリッド法

出芽酵母 *Mav* χ (*MAT* α , *ura3-52*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3-200*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , *SPAL10::URA3*, *LYS2::KanMX-LexAop-His*, *GAL1::lacZ*) を宿主株として用いた。全長ヒト CDK19 の cDNA を組み込んだ pHLZ プラスミド (hCDK19/pHLZ) をベイトとして、酢酸リチウム法を用いて形質転換を行った。ベイトタンパク質の発現をウエスタンブロッティング法で確認後、ヒト胎児脳由来 cDNA ライブラリー (Clontech) をプレイとして、同様に酢酸リチウム法を用いて形質転換した。形質転換体に対して、ロイシンとヒスチジンが欠落した選択培地 (SC-Leu-His) 上でスクリーニングを行った。選択培地に播いて 3~5 日で生育してきたコロニーを新たな SC-Leu-His 培地に播き、形成されたコロニーに対してコロニーチェック PCR を行った。アガロース電気泳動により単一バンドが確認された PCR 産物をシーケンス解析し、BLAST (Basic Local Alignment search tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いたアライメント解析から相互作用候補因子を明らかにした。核内で転写制御に関わる因子をポジティブクローンとし、プラスミドを精製後、ベイトタンパク質を発現する宿主株に再度導入し再現性の確認を行った。

4.2 組換えタンパク質発現・精製

cDNA を組み込んだ大腸菌発現用プラスミドで形質転換した大腸菌 RosettaTM (DE3) を TBGM9 培地 (1% Bacto tryptone, 0.5 M NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.3% KH₂PO₄, 1.5% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.4% Glucose, 1 mM MgSO₄, 50 μ g/ml Carbenicillin) で培養し、OD₅₉₅=0.4~0.6 の時に終濃度が 0.4 mM になるように IPTG を加えて、30°C、3 時間でタンパク質の発現を誘導後、遠心分離によって菌体を回収した。菌体は、バッファー B (0.5) (20 mM Tris-HCl (pH 7.9, 4°C), 10% (v/v) Glycerol, 0.5 M NaCl, 0.1% NP40, 10x Protease inhibitor, 0.2 mM PMSF, 10 mM β -ME) で懸濁し、超音波処理によって破碎した。この溶液に対して 15,000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心を行い、上清を可溶性画分として得た。6H タグ融合タンパク質の精製では、BB (0.5) で平衡化した 20 μ l の Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN) とイミダゾールを終濃度 10 mM で加え、4°C で 4 時間の結合反応を行った。結合反応後、遠心分離によって非結合画分を取り除き、1 ml の 40 mM のイミダゾールを含むバッファー D (0.5) (20 mM Tris-HCl (pH 7.9, 4°C), 10% (v/v) Glycerol, 0.5 M KCl, 0.1% NP40, 1x Protease inhibitor, 0.2 mM PMSF, 10 mM β -ME) で 5 回洗浄後、バッファー中のイミダゾール濃度を 100 mM, 150 mM と段階的に上げ、6H タグ融合タンパク質を

溶出した。また、GST 融合タンパク質の精製では、BB (0.5)で平衡化した 15 μ l の Glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) を加え、4°Cで4時間の結合反応を行った。結合反応後、遠心分離によって非結合画分を取り除き、1 ml のバッファーC (0.2) (20 mM Tris-HCl (pH 7.9, 4°C), 20% (v/v) Glycerol, 0.2 M KCl, 0.1% NP-40, 1x Protease inhibitor, 1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 10 mM β -ME)で5回洗浄後、200 mM の還元型グルタチオンを含む 200 μ l の BC (0.1)中で4°C、20分の溶出反応を5回行いプールさせた。溶出したサンプルは BC (0.1)中で、1時間2回、14時間1回の透析を行った。

4.3 *in vitro* 相互作用解析

GST タグ融合タンパク質 500 ng と Glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) 7.5 μ l、Sephacryl S4B (GE Healthcare) 7.5 μ l を 400 μ l の BC (0.1) で懸濁し、4°Cで2時間の結合反応を行った。その後、遠心して非結合画分を取り除き、それぞれ 1 ml の BC (0.2)で2回、BC (0.1)で1回レジンを洗浄した。洗浄済みの GST タグ融合タンパク質 500 ng が結合したレジンを 500 ng 分の 6H タグ融合タンパク溶液または 1 mg 分の HeLa 核抽出液と 200 μ g/ml の BSA を含む 400 μ l の BC (0.1)で懸濁し、4°Cで4時間の結合反応を行った。その後、遠心して非結合画分を取り除き、それぞれ 1 ml の BC (0.2)で2回、BC (0.1)で1回レジンを洗浄した。レジンに結合したタンパク質を SDS バッファーで溶出後、SDS-PAGE で展開し、immobilon P (Millipore)に転写して免疫ブロット法で検出した。転写には、ウェット転写装置 (Bio-Rad) を使用し、100 mA で14時間、トランスファーバッファー (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)中で、あるいは、セミドライ転写装置 (Bio-Rad) を使用し、15 V で30分、セミドライバッファー (50 mM Tris, 39 mM glycine, 20% methanol, 0.1% SDS) 中で行った。転写後の膜は、2% BSA で室温1時間のブロッキング後、リンスバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で希釈した一次抗体溶液中で、室温1時間または4°Cで一晩、リンスバッファーで希釈した二次抗体溶液で室温30分の順に反応させた。検出は ECL (GE Healthcare)を用いた化学発光法により行い、X線フィルム (富士フィルム) に感光させた。

4.4 *in vivo* 相互作用解析

PRMT5 (FLJ90770AAAN)および WDR77 (FLJ12798AAAN)の cDNA 配列を NBRC (NITE Biological Resource Center)より入手した。これらの cDNA は、Gateway® Vector Conversion System (Invitrogen)を用いて改変した pTriEX-2 (Millipore)に、Gateway のマニ

ュアルに従って挿入し PRMT5 (S-PRMT5)または WDR77 (S-WDR77)発現ベクターを
製した。10 cm ディッシュに播種した HeLa S3 細胞に Lipofectamine™ LTX (invitrogen)
を用いて、それぞれ 3 µg の HF-CDK8、HF-CDK19、S-PRMT5 または S-WDR77 発現ベ
クターを遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に細胞を回収し、BC (0.3)で懸濁後ハン
ディソニケーターを用いて 10 秒間の破砕を行った。破砕して回収した細胞抽出液に 20
µl の S-protein agarose (Novagen)を加えて、4°Cで 6 時間の結合反応を行った。その後、
遠心して非結合画分を取り除き、1 ml の BC (0.3)で 4 回レジンを洗浄した。レジンに結
合したタンパク質を SDS バッファーで溶出後、SDS-PAGE で展開し、immobilon P
(Millipore)に転写して免疫ブロット法で検出した。

4.5 細胞培養

HeLa S3 細胞は 5% Calf serum を加えた DMEM 培地 (ニッスイ)または RPMI 培地 (ニ
ッスイ)を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。また、Ntera2 cl. D1 (NT2/D1)細胞は
American Type Culture Collection (ATCC)から入手した。NT2/D1 細胞は 10% Fetal bovine
serum (Cell Culture Biosciences)と 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Gibco)を加えた DMEM
high glucose 培地 (Gibco)を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。神経細胞への分化を誘
導には、10 µM all-trans レチノイン酸 (Sigma)で 2 日間または 2 時間の刺激を行った。

4.6 核抽出液調製

ラージスケールでの調整は、浮遊化させた HA/FLAG (HF)-CDK8 または CDK19 を安
定発現する HeLa S3 細胞株を 50 L の RPMI (5% CS、70 µg/ml Penicillin G、150 µg/µl
Streptomycin)で培養し、Dignam 法 (100)に従って調整を行った。核抽出液はバッファー
C (20 mM Tris-HCl (pH 7.9, 4°C), 20% (v/v) Glycerol, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM
PMSF)で透析を行った。また、スモールスケールでの調整は、10 cm ディッシュ上で 90%
コンフルエントまで育った NT2/D1 を CELLOTION (ZENOAQ)で回収し、遠心後の細胞
体積を算出した。遠心後の細胞を 1ml の溶解バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM
NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 2 mM DTT 1x Protease inhibitor)で懸濁後、遠心操作によ
り粗製の核を回収した。再度 1 ml の溶解バッファーで洗浄した後、1 細胞体積分の抽出
バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.3 M KCl, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerol, 2 mM
DTT, 1x Protease inhibitor)で再懸濁し、氷上で 10 分間の抽出を行い、遠心後の上清を核
抽出液として用いた。

4.7 HF-CDK8 と HF-CDK19 が構成するメディエーター複合体の精製

HF-CDK8 または CDK19 を安定発現する HeLa S3 細胞から調整した核抽出液 7 mg に 20 μ l の anti-FLAG M2 アガロース (Sigma)を加え、4°Cで一晩結合反応を行った。それぞれ 1 ml の BC (0.3)で 5 回の洗浄と BC (0.1)で 1 回の洗浄後、300 μ g/ml の FLAG ペプチドを含む BC (0.1)を加え、4°Cで 30 分の溶出反応を行った。溶出したタンパク質 10 μ l 分は SuperSepTM Ace 5-20% (Wako)を用いて SDS-PAGE による展開後、Silver stain MS kit (wako)を用いた染色と免疫ブロット法により精製を確認した。

また、ゲルろ過精製時には、溶出画分に Protein G アガロース (GE Healthcare)を 10 μ l 加え、4°Cで 1 時間の結合反応を行い、遊離している IgG を除去した。遠心後の上清を BC (0.3)で平衡化したゲルろ過カラムである G4000SWxl 7.8 mm \times 30 cm カラム (Tosoh) に添加して、分子量ごとに分画した。それぞれの分画を適当なタンパク質量になるように TCA 沈殿によって濃縮した後、4-20%グラジエントゲル (第一化学)に流して銀染色 (第一化学)と免疫ブロットを行った。

4.8 *in vitro* リン酸化解析

大腸菌発現後、精製した GST 融合の全長マウス CTD または EZH2 を 2 μ g と anti-FLAG 精製した HF-CDK8 または HF-CDK19 がそれぞれ構成するメディエーター複合体 100 ng をキナーゼバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 20% (v/v) Glycerol, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 μ g/ml BSA, 50 μ M ATP)中で 30°C、30 分間反応させた。反応後のタンパク質は SDS-PAGE で展開し、それぞれのリン酸化特異抗体を用いて免疫ブロット法により検出した。

4.9 RT-qPCR

NT2/D1 細胞を 12 ウェルプレートに 2.0 \times 10⁴ cells/ml の濃度で播き、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。30-50%コンフルエントの細胞に siRNA を終濃度 20 nM になるように Lipofectamine RNAi MAX (invitrogen)で導入し、60 時間の培養を行った。細胞回収 2 時間または 48 時間前に終濃度が 10 μ M になるようにレチノイン酸で刺激を行った。ReliaPrepTM RNA Cell Miniprep System (Promega)を用いて RNA 精製を行い、逆転写には、500 ng の精製した RNA から PrimeScriptTM RT Master Mix (TaKaRa)を用いて cDNA を合成した。qPCR は、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH plus) (TaKaRa)と Mx3000P QPCR system (Stratagene)を用いて解析を行った。qPCR には、以下のプライマーを用いた。

<i>Nanog</i>	Forward: GCAGAAGGCCTCAGCACCTA Reverse: AGGTTCCCAGTCGGGTCA
<i>Pax6</i>	Forward: GGTGAATGGGCGGAGTTATG Reverse: TGACACACCAGGGGAAATGA
<i>Lefty1</i>	Forward: CCCTGGACCTTGGGGACTAT Reverse: AGTTCTCGGCCCACTTCATC
<i>Cyp26a1</i>	Forward: TAAATGGATACCAGATTCCCAAGG Reverse: CTCCTTGTTGGTGAAGATCTCTG
<i>IL-8</i>	Forward: AAGAAACCACCGGAAGGAAC Reverse: ACTGCACCTTCACACAGAGC
<i>TNFα</i>	Forward: GGCAGTCAGATCATCTTCTCG Reverse: CAGCTTGAGGGTTTGCTACA
<i>CDK8</i>	Forward: CCCTGAACTACTTCTTGGAGC Reverse: CAGCTGGTCATGGTGATAAGG
<i>CDK19</i>	Forward: GTCAGTCTACCTTAGAGAAAGCCAG Reverse: AACTCCTTGAGAGCAAGAAC
β - <i>actin</i>	Forward: TGGCACCCAGCACAATGAA Reverse: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA

4.10 クロマチン免疫沈降法

10 cm ディッシュ上で 90% コンフルエントまで育った NT2/D1 細胞に、培地中に終濃度 1% になるように 16% Formaldehyde を加え、室温で 10 分間 クロスリンク反応を行った。反応後、終濃度 0.125 M になるように 1.25 M Glycine 溶液を加え室温でさらに 5 分間反応させた。細胞を冷却した PBS で 2 回洗浄し、CELLOTION (ZENOAQ) を用いて細胞を回収した。遠心し、上清を除いた後、0.25% Sarkosyl、1 mM DTT、10x Protease inhibitor を加えた RIPA 0 バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% Deoxycholate) で細胞を懸濁し、氷上で 10 分間静置した。クロマチンの断片化処理は、Bioruptor sonication device UCD-250 (Cosmo Bio) を用いて、インテンシティ High で 14 サイクル (15 s : on、45 s : off) の条件で行った。遠心後、回収した上清に終濃度 0.3 M になるように 5 M NaCl 溶液を加えた RIPA0.3 バッファー中で 5 μ g の抗体と一

晩反応させた。また同時に、Dynabeads Protein G (invitrogen)をそれぞれの抗体に対し 30 μ l 用意し、終濃度 1 mg/ml になるように 20 mg/ml BSA を加えた RIPA 0.3 を用いて 4°C で一晩ブロッキング反応を行った。一晩の抗体抗原反応後、ブロッキング反応済みの Dynabeads Protein G を加え、さらに 4°C で 2 時間反応させた。反応後、洗浄を RIPA 0.3 バッファー、RIPA0 バッファー、LiCl 洗浄バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % Deoxycholate) 、TE バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH8.0)を用いてそれぞれ 1ml で 2 回ずつ行った。洗浄後の免疫複合体を、終濃度 0.2 M になるように 5 M NaCl を加えた溶出バッファー (100 mM NaHCO₃, 1 % SDS)中で 65°C、6 時間以上反応させ、溶出と脱クロスリンクを行った。脱クロスリンク後、RNase A 処理を 37°C で 1 時間、Proteinase K 処理を 45°C で 2 時間行い、DNA を QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)で精製した。精製した DNA は以下のプライマーを用いて qPCR により解析した。

<i>Lefty1</i> promoter	Forward: CACAGCCCAGACAGACTTGC Reverse: TCACACCCCTGAGACCTCCT
<i>Lefty1</i> intron	Forward: TGCTGAGGGTCAAACCTGGTAA Reverse: TCATTCATTCCCACAGCACTC
<i>Cyp26a1</i> promoter	Forward: GAGTTCTTCTGCGCGATCCT Reverse: TGATGAGGAAGCAAGGGAAA
<i>Cyp26a1</i> exon6	Forward: TGCAAGAGCAATCAAGACAACA Reverse: CTTCAAGAGCAACCCGAAACC
<i>IL-8</i> promoter	Forward: CCATCAGTTGCAAATCGTGGA Reverse: GAAGCTTGTGTGCTCTGCTG
<i>IL-8</i> exon	Forward: GATACTCCCAGTCTTGTCATTGC Reverse: AAACAAGTTTCAACCAGCAAGAA
<i>TNFα</i> promoter	Forward: TACCGCTTCCTCCAGATGAG Reverse: AATCATTCAACCAGCGGAAA
<i>TNFα</i> exon	Forward: GACCACCACTTCGCCACCTG Reverse: GTGGTTGCCAGCACTTCAC

4.11 siRNA

EZH2 のリン酸化解析および RA 標的遺伝子における CDK19 および CDK8 の機能解析のために、以下に示す各 CDK に対する 4 種類の siRNA を含む siRNA プールを調製し、Lipofectamine RNAi MAX を用いて Ntera2 cl. D1 細胞に終濃度 20 nM で導入した。

siCDK19: GAGCAUGACUUGUGGCAUA (J-004689-05)
 GAUCGGAUUUUAGUGUCA (J-004689-06)
 UAAAGCCACUAGCAGAUUU (J-004689-07)
 UAUGGCUGCUGUUUGAUUA (J-004689-08)

siCDK8: GGACAGAAUAUCAAUGUA (J-003242-09)
 GAGCAAGGCAUUAUACCAA (J-003242-10)
 AGAAAUAGCAUUAUCUUCGA (J-003242-11)
 CGUCAGAACCAAUAUUUCA (J-003242-12)

Non-Target control (siNC): D-001810-01-05

4.12 抗体

RNA ポリメラーゼ II: anti-Pol II N20 (Santa Cruz; sc-899)、anti-phosphorylated Pol II CTD (4H8, abcam; ab5408)、phosphorylation-specific anti-CTD [3E8 (pSer2) and 3E10 (pSer5)] (Ascension)。

メディエーター複合体: anti-MED1 (Santa Cruz; sc-5334)、anti-MED4 (Sigma; HPA006232)、anti-MED6 (Santa Cruz; sc-9434)、anti-MED12 (abcam; ab70842)、anti-MED15 (protein tech. Group; 11566-1-AP)、anti-MED17 (abnova; H00009440-M02)、anti-MED18 (Bethyl; A300-777A)、anti-MED24 (abcam; ab80468)、anti-Cyclin C (Santa Cruz; sc-1061)、anti-human CDK8/19 goat polyclonal (Santa Cruz; sc-1521)、anti-human CDK19 rabbit polyclonal (Sigma; HPA007053)。

PRC2: anti-SUZ12 rabbit polyclonal (active motif; 39357)、anti-EZH2 rabbit polyclonal (Sigma; SAB1410354)、anti-pEZH2 T345 rabbit polyclonal antibody and anti-pEZH2 T487 rabbit polyclonal antibody (kindly gifted from Dr. Danny Reinberg, New York University, New York)。

ヒストン修飾: anti-Histone H3 (abcam; ab1791)、anti-Trimethyl-Histone H3 (lys27) (millipore; 07-449)、anti-Histone H3 (tri methyl K27) (abcam; ab6002)、anti-phospho-Histone H3 (Ser28) (Millipore; 07-145)、anti-H3S10ph (upstate; 06570)、anti-H4R3me2s (abcam; ab5823)、anti-H4 (abcam; ab7311)。

その他: anti-C/EBP β (Santa Cruz; sc-150)、anti-PRMT5 (Millipore; 07-405)、anti-WDR77

(abcam; ab57722), anti-DNMT3A (Santa Cruz; sc-20703), anti- γ -tubulin goat polyclonal (Santa Cruz; sc-7396), anti-5His (QIAGEN; 34660), anti-HA (12CA5, Roche; 158316), anti-S-tag (Novagen; 71549-3), anti-FLAG M2 (Sigma; F3165)。

5. 引用文献

1. Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., and Bautz, E. K. (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**, 43-46
2. Roeder, R. G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**, 327-335
3. Weinmann, R., and Roeder, R. G. (1974) Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1790-1794
4. Chapman, R. D., Heidemann, M., Hintermair, C., and Eick, D. (2008) Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet* **24**, 289-296
5. Jeronimo, C., Bataille, A. R., and Robert, F. (2013) The writers, readers, and functions of the RNA polymerase II C-terminal domain code. *Chem Rev* **113**, 8491-8522
6. Zhou, Q., Li, T., and Price, D. H. (2012) RNA polymerase II elongation control. *Annu Rev Biochem* **81**, 119-143
7. Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S. (2007) Serine-7 of the RNA polymerase II CTD is specifically required for snRNA gene expression. *Science* **318**, 1777-1779
8. Hahn, S. (2004) Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 394-403
9. Flanagan, P. M., Kelleher, R. J., Sayre, M. H., Tschochner, H., and Kornberg, R. D. (1991) A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* **350**, 436-438
10. Bourbon, H. M. (2008) Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res* **36**, 3993-4008
11. Malik, S., and Roeder, R. G. (2010) The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* **11**, 761-772
12. Blazek, E., Mittler, G., and Meisterernst, M. (2005) The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* **113**, 399-408
13. Tsai, C. J., and Nussinov, R. (2011) Gene-specific transcription activation via long-range allosteric shape-shifting. *Biochem J* **439**, 15-25
14. Davis, J. A., Takagi, Y., Kornberg, R. D., and Asturias, F. A. (2002) Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* **10**, 409-415
15. Ebmeier, C. C., and Taatjes, D. J. (2010) Activator-Mediator binding regulates Mediator-cofactor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11283-11288
16. Donner, A. J., Ebmeier, C. C., Taatjes, D. J., and Espinosa, J. M. (2010) CDK8 is a positive

- regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 194-201
17. Galbraith, M. D., Allen, M. A., Bensard, C. L., Wang, X., Schwinn, M. K., Qin, B., Long, H. W., Daniels, D. L., Hahn, W. C., Dowell, R. D., and Espinosa, J. M. (2013) HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell* **153**, 1327-1339
 18. Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q. J., Yin, J. W., Liang, Y., Heiner, M., Tian, B., Hui, J., and Wang, G. (2012) Mediator complex regulates alternative mRNA processing via the MED23 subunit. *Mol Cell* **45**, 459-469
 19. Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., and Young, R. A. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**, 430-435
 20. Lai, F., Orom, U. A., Cesaroni, M., Beringer, M., Taatjes, D. J., Blobel, G. A., and Shiekhhattar, R. (2013) Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* **494**, 497-501
 21. Mukundan, B., and Ansari, A. (2013) Srb5/Med18-mediated termination of transcription is dependent on gene looping. *J Biol Chem* **288**, 11384-11394
 22. Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T. J., Florens, L., Zybailov, B., Swanson, S. K., Banks, C. A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M. P., Conaway, J. W., and Conaway, R. C. (2004) A set of consensus mammalian mediator subunits identified by multidimensional protein identification technology. *Mol Cell* **14**, 685-691
 23. Tsutsui, T., Umemura, H., Tanaka, A., Mizuki, F., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2008) Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcriptional regulation. *Genes Cells* **13**, 817-826
 24. Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16
 25. Martinez-Ceballos, E., and Gudas, L. J. (2008) Hoxa1 is required for the retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells into neurons. *J Neurosci Res* **86**, 2809-2819
 26. McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K., and Anderson, P. J. (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**, 165-167
 27. Lee, H. K., Park, U. H., Kim, E. J., and Um, S. J. (2007) MED25 is distinct from TRAP220/MED1 in cooperating with CBP for retinoid receptor activation. *EMBO J* **26**, 3545-3557
 28. Pavri, R., Lewis, B., Kim, T. K., Dilworth, F. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., and Reinberg, D. (2005) PARP-1 determines specificity in a retinoid

- signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell* **18**, 83-96
29. Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000) TFIID is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* **407**, 102-106
 30. Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelson, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H., and Gustafsson, C. M. (2006) The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15788-15793
 31. Sebastian, T., and Johnson, P. F. (2006) Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle* **5**, 953-957
 32. Nerlov, C. (2007) The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* **17**, 318-324
 33. Rosen, E. D. (2005) The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **73**, 31-34
 34. Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2207-2211
 35. Li, H., Gade, P., Nallar, S. C., Raha, A., Roy, S. K., Karra, S., Reddy, J. K., Reddy, S. P., and Kalvakolanu, D. V. (2008) The Med1 subunit of transcriptional mediator plays a central role in regulating CCAAT/enhancer-binding protein-beta-driven transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem* **283**, 13077-13086
 36. Kowenz-Leutz, E., Pless, O., Dittmar, G., Knoblich, M., and Leutz, A. (2010) Crosstalk between C/EBPbeta phosphorylation, arginine methylation, and SWI/SNF/Mediator implies an indexing transcription factor code. *EMBO J* **29**, 1105-1115
 37. Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H., and Leutz, A. (2004) Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* **13**, 241-250
 38. Ding, N., Zhou, H., Esteve, P. O., Chin, H. G., Kim, S., Xu, X., Joseph, S. M., Friez, M. J., Schwartz, C. E., Pradhan, S., and Boyer, T. G. (2008) Mediator links epigenetic silencing of neuronal gene expression with x-linked mental retardation. *Mol Cell* **31**, 347-359
 39. Meyer, K. D., Donner, A. J., Knuesel, M. T., York, A. G., Espinosa, J. M., and Taatjes, D. J. (2008) Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3. *EMBO J* **27**, 1447-1457
 40. Knuesel, M. T., Meyer, K. D., Donner, A. J., Espinosa, J. M., and Taatjes, D. J. (2009) The human CDK8 subcomplex is a histone kinase that requires Med12 for activity and can function independently of mediator. *Mol Cell Biol* **29**, 650-661
 41. Probst, A. V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009) Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 192-206
 42. Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004) The Dnmt1

- DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* **279**, 48350-48359
43. Takeshima, H., Suetake, I., Shimahara, H., Ura, K., Tate, S., and Tajima, S. (2006) Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards naked and nucleosomal DNA. *J Biochem* **139**, 503-515
 44. Kim, J., Kollhoff, A., Bergmann, A., and Stubbs, L. (2003) Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum Mol Genet* **12**, 233-245
 45. Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Fraga, M. F., Alaminos, M., Setien, F., and Esteller, M. (2006) A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res* **66**, 8342-8346
 46. Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., and Lander, E. S. (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**, 766-770
 47. Hahn, M. A., Wu, X., Li, A. X., Hahn, T., and Pfeifer, G. P. (2011) Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS One* **6**, e18844
 48. Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., and Oberdoerffer, S. (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, 74-79
 49. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260
 50. Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* **16**, 2893-2905
 51. Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y. J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G. C., and Orkin, S. H. (2008) EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* **32**, 491-502
 52. Brown, M. A., Sims, R. J., Gottlieb, P. D., and Tucker, P. W. (2006) Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* **5**, 26
 53. Li, B., Jackson, J., Simon, M. D., Fleharty, B., Gogol, M., Seidel, C., Workman, J. L., and Shilatifard, A. (2009) Histone H3 lysine 36 dimethylation (H3K36me2) is sufficient to recruit the Rpd3s histone deacetylase complex and to repress spurious transcription. *J Biol Chem* **284**, 7970-7976

54. Di Lorenzo, A., and Bedford, M. T. (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett* **585**, 2024-2031
55. Bedford, M. T., and Clarke, S. G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* **33**, 1-13
56. Huang, S., Litt, M., and Felsenfeld, G. (2005) Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev* **19**, 1885-1893
57. Zhao, Q., Rank, G., Tan, Y. T., Li, H., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Cerruti, L., Curtis, D. J., Patel, D. J., Allis, C. D., Cunningham, J. M., and Jane, S. M. (2009) PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 304-311
58. Xu, X., Hoang, S., Mayo, M. W., and Bekiranov, S. (2010) Application of machine learning methods to histone methylation ChIP-Seq data reveals H4R3me2 globally represses gene expression. *BMC Bioinformatics* **11**, 396
59. Lau, P. N., and Cheung, P. (2011) Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2801-2806
60. Schmitges, F. W., Prusty, A. B., Faty, M., Stützer, A., Lingaraju, G. M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S., Bunker, R. D., Wirth, U., Bouwmeester, T., Bauer, A., Ly-Hartig, N., Zhao, K., Chan, H., Gu, J., Gut, H., Fischle, W., Müller, J., and Thomä, N. H. (2011) Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell* **42**, 330-341
61. Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J. R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J. F., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Magrini, V. J., Vickery, T. L., Hundal, J., Cook, L. L., Conyers, J. J., Swift, G. W., Reed, J. P., Alldredge, P. A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M. A., Heath, S., Shannon, W. D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Link, D. C., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Mardis, E. R., and Wilson, R. K. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **363**, 2424-2433
62. Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-629
63. Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., Paul, J. E., Boyle, M., Woolcock, B. W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R. K., Griffith, O. L., Shah, S., Zhu,

- H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J. F., Tcherpakov, M., Corbett, R., Tam, A., Varhol, R., Smailus, D., Moksa, M., Zhao, Y., Delaney, A., Qian, H., Birol, I., Schein, J., Moore, R., Holt, R., Horsman, D. E., Connors, J. M., Jones, S., Aparicio, S., Hirst, M., Gascoyne, R. D., and Marra, M. A. (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* **42**, 181-185
64. Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P. L., Karuturi, R. K., Tan, P. B., Liu, E. T., and Yu, Q. (2007) Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* **21**, 1050-1063
65. Gnyszka, A., Jastrzebski, Z., and Flis, S. (2013) DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Res* **33**, 2989-2996
66. Margueron, R., and Reinberg, D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343-349
67. Lewis, E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-570
68. Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**, 873-878
69. Cao, R., and Zhang, Y. (2004) SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* **15**, 57-67
70. Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M. L., Son, J., Drury, W. J., Voigt, P., Martin, S. R., Taylor, W. R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D., and Gamblin, S. J. (2009) Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* **461**, 762-767
71. Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X. Y., Bourgon, R., Biggin, M., and Pirrotta, V. (2006) Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **38**, 700-705
72. Kanhere, A., Viiri, K., Araújo, C. C., Rasaiyaah, J., Bouwman, R. D., Whyte, W. A., Pereira, C. F., Brookes, E., Walker, K., Bell, G. W., Pombo, A., Fisher, A. G., Young, R. A., and Jenner, R. G. (2010) Short RNAs are transcribed from repressed polycomb target genes and interact with polycomb repressive complex-2. *Mol Cell* **38**, 675-688
73. Peng, J. C., Valouev, A., Swigut, T., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., and Wysocka, J. (2009) Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* **139**, 1290-1302
74. Riising, E. M., Comet, I., Leblanc, B., Wu, X., Johansen, J. V., and Helin, K. (2014) Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell* **55**, 347-360
75. Faust, C., Schumacher, A., Holdener, B., and Magnuson, T. (1995) The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* **121**, 273-285

76. O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S. C., Surani, M. A., and Jenuwein, T. (2001) The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol* **21**, 4330-4336
77. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M., and Gotoh, Y. (2009) Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* **63**, 600-613
78. Zhang, Z., Jones, A., Sun, C. W., Li, C., Chang, C. W., Joo, H. Y., Dai, Q., Mysliwiec, M. R., Wu, L. C., Guo, Y., Yang, W., Liu, K., Pawlik, K. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lee, Y., Min, J., Townes, T. M., and Wang, H. (2011) PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Stem Cells* **29**, 229-240
79. Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S. L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012) Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* **150**, 1209-1222
80. Onder, T. T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A. U., Zhu, N., Bernt, K. M., Cahan, P., Marcarci, B. O., Unternaehrer, J., Gupta, P. B., Lander, E. S., Armstrong, S. A., and Daley, G. Q. (2012) Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**, 598-602
81. Tsutsui, T., Fukasawa, R., Tanaka, A., Hirose, Y., and Ohkuma, Y. (2011) Identification of target genes for the CDK subunits of the Mediator complex. *Genes Cells*
82. Trotter, K. W., and Archer, T. K. (2008) The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal* **6**, e004
83. Jardin, F., Ruminy, P., Bastard, C., and Tilly, H. (2007) The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol (Paris)* **55**, 73-83
84. Wilson, B. G., Wang, X., Shen, X., McKenna, E. S., Lemieux, M. E., Cho, Y. J., Koellhoffer, E. C., Pomeroy, S. L., Orkin, S. H., and Roberts, C. W. (2010) Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell* **18**, 316-328
85. Kaneko, S., Li, G., Son, J., Xu, C. F., Margueron, R., Neubert, T. A., and Reinberg, D. (2010) Phosphorylation of the PRC2 component *Ezh2* is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev* **24**, 2615-2620
86. Wei, Y., Chen, Y. H., Li, L. Y., Lang, J., Yeh, S. P., Shi, B., Yang, C. C., Yang, J. Y., Lin, C. Y., Lai, C. C., and Hung, M. C. (2011) CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat Cell Biol* **13**, 87-94
87. Andrews, P. W. (1988) Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* **948**, 17-36
88. Liao, S. M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J., and Young, R. A. (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II

- holoenzyme. *Nature* **374**, 193-196
89. Wu, S. C., and Zhang, Y. (2011) Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)-mediated phosphorylation of enhancer of zeste 2 (Ezh2) regulates its stability. *J Biol Chem* **286**, 28511-28519
 90. Kirmizis, A., Bartley, S. M., and Farnham, P. J. (2003) Identification of the polycomb group protein SU(Z)12 as a potential molecular target for human cancer therapy. *Mol Cancer Ther* **2**, 113-121
 91. Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J* **22**, 5323-5335
 92. Porter, D. C., Farmaki, E., Altilia, S., Schools, G. P., West, D. K., Chen, M., Chang, B. D., Puzyrev, A. T., Lim, C. U., Rokow-Kittell, R., Friedhoff, L. T., Papavassiliou, A. G., Kalurupalle, S., Hurteau, G., Shi, J., Baran, P. S., Gyorffy, B., Wentland, M. P., Broude, E. V., Kiaris, H., and Roninson, I. B. (2012) Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13799-13804
 93. Cee, V. J., Chen, D. Y., Lee, M. R., and Nicolaou, K. C. (2009) Cortistatin A is a high-affinity ligand of protein kinases ROCK, CDK8, and CDK11. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 8952-8957
 94. Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998) Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* **2**, 43-53
 95. Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C. X., Fondell, J. D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R. G. (1999) A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* **3**, 97-108
 96. Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003) Methods and tips for the purification of human histone methyltransferases. *Methods* **31**, 49-58
 97. Friesen, W. J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002) A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J Biol Chem* **277**, 8243-8247
 98. Jelinic, P., Stehle, J. C., and Shaw, P. (2006) The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* **4**, e355
 99. Aggarwal, P., Vaites, L. P., Kim, J. K., Mellert, H., Gurung, B., Nakagawa, H., Herlyn, M., Hua, X., Rustgi, A. K., McMahon, S. B., and Diehl, J. A. (2010) Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell* **18**, 329-340
 100. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**,

1475-1489

謝辞

本研究は富山大学大学院医学薬学教育部遺伝情報制御学研究室においてなされたものです。大熊芳明・前富山大学教授には、本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、お忙しい中多くのご指導を賜りました。自主性を重視し、人間的にも成長できる非常に恵まれた研究環境を与えて下さったこと、また、研究活動のみならず、様々な面において便宜を図って下さったことも併せ、厚く御礼申し上げます。

廣瀬豊・富山大学准教授、田中亜紀・富山大学助教、日々の適切な助言を頂き、様々な面から助けて頂きました。飯田智・特命助教には、本論文の作成にあたり、実験データの解釈の仕方や表現方法について多くのアドバイスを頂くことで完成させることが出来ました。深く感謝いたしますとともに、研究室及び皆様の更なる発展をお祈りいたします。

また、本論文をご精読頂いた櫻井宏明・富山大学教授、今中常雄・富山大学教授、田淵明子・富山大学准教授には心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、ニューヨーク大学ダニー・ラインバーグ博士より EZH2 のスレオニンリン酸化特異抗体を分与して頂きました。また、LC-MS/MS 解析は、新名主カオリ・元 RIKEN CDB 研究員との共同研究で行いました。併せてこの場を借りて深く感謝いたします。

さらに、遺伝情報制御学研究室メディエーター研究班の皆さんには日々の生活で大変お世話になりました。研究室での生活の中で、皆さんの存在は私にとって大きな支えになったと感じています。感謝いたしますとともに、皆様の今後の更なるご活躍をお祈り申し上げます。

最後に、私の大学での研究生活は家族の支えなしではやり遂げることができませんでした。離れた所で常に支えてくれた私の家族に心から感謝いたします。