

氏名 ふかざわ りきや  
深澤 力也

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 163 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程  
薬科学専攻

学位論文題目 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を介した分化制御機構の解析

論文審査委員

(主査)	准教授	田淵	明子
(副査)	教授	今中	常雄
(副査)	教授	櫻井	宏明 (指導教員)

# 論文内容の要旨

## 【背景・目的】

真核生物において、遺伝子発現は時間的・空間的に厳密な制御が行われている。特に、全ての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) が担う。Pol II は、DNA 上の特異的制御配列であるプロモーター上において、5 種類の基本転写因子 (TFIIB、-IID、-IIE、-IIF、-IIH) とともに転写開始複合体を形成することで活性化されるが、*in vitro* 転写再構成系を用いた研究より、Pol II と 5 種類の基本転写因子のみでは核内受容体をはじめとする転写活性化因子依存的な転写活性化を再現できないことが示されている。そこで、転写活性化因子と転写開始複合体を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。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巨大な複合体であり、立体構造の特徴から、head、middle、tail、CDK/Cyclin という 4 つのサブモジュールから構成されている。CDK/Cyclin モジュールには、複合体中で唯一のキナーゼ活性を有する CDK8 または CDK19 が CDK サブユニットとして含まれる。これまでに、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。しかし、これら 2 つの CDK は互いにパラログの関係にあり、CDK8 は酵母のような下等な真核生物から保存されるのに対し、CDK19 は脊椎動物にのみ存在し、それぞれが相互排他的にメディエーターを構成することが分かっている。さらに当研究室では、CDK8 と CDK19 は同一遺伝子を標的とする一方、相反する転写制御を行うことや、組織間における発現特異性を見出してきた。これらのことは、CDK19 が CDK8 と異なる機能を用いて遺伝子発現制御に関わることを強く示唆している。そこで私は、CDK19 による転写制御機構の解明より、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、これらの解明を目的に研究を行った。

## 【方法・結果】

### 1 章. メディエーターCDK サブユニットの新規相互作用因子の同定

CDK19 の機能解析の足掛かりとして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 ハイブリッド法を行った。約  $4.0 \times 10^7$  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、ポリコム複合体サブユニット SUZ12、B 細胞分化に関わる転写抑制因子 BCL6 の 3 因子の部分配列を CDK19 の相互作用

用候補因子として同定した。タンパク間相互作用をさらに検証するため、大腸菌で発現させ精製した組換えタンパクを用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、候補因子はいずれも全長の CDK19 と CDK8 の両者と直接結合することが分かった。さらに、CDK 側の相互作用領域を特定するため、両 CDK の相同性の高い N 末からキナーゼドメインまでの領域と相同性の低い C 末領域をそれぞれ有する欠失変異体を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、候補因子はいずれも両 CDK の相同性の高い 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が分かった。次に、これら候補因子は単独の 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、HeLa S3 細胞核抽出液を用いて *in vitro* 相互作用解析を行った。その結果、候補因子はいずれも各 CDK が構成するメディエーターとも結合することが分かった。以上より、BRG1、SUZ12、BCL6 を CDK19 及び CDK8 の新規相互作用因子として同定した。

## 2 章. 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

1 章より、CDK19 及び CDK8 が構成するメディエーターは、BRG1、SUZ12、BCL6 が関与する転写制御と密接に関与することが示唆された。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おり、特に SUZ12 が構成する PRC2 はエピジェネティックな制御を介して細胞分化に関わる遺伝子の転写抑制を行う。このことから、PRC2 サブユニット SUZ12 と 2 つの CDK との関係性を明らかにすることで、これらの関わる分化制御を分子レベルで明らかに出来ると考え、研究を進めた。

まず、SUZ12 が構成するポリコーム複合体である PRC2 との関係性をさらに追求するため、PRC2 の構成因子である EZH2 との物理的な相互作用を *in vitro* 相互作用解析により検討した。その結果、EZH2 は全長の CDK19 及び CDK8 の両者と直接結合することが分かった。同様に、CDK 欠失変異体を用いた *in vitro* 相互作用解析の結果、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が分かった。また、他のグループから、EZH2 は CDK19 と CDK8 とは異なる CDK ファミリーによってリン酸化されることが報告されていることから、EZH2 が CDK19 または CDK8 によってもリン酸化され得るかを検討するため、各 CDK が構成するメディエーターと大腸菌で発現させた EZH2 の精製組換えタンパクを用いて *in vitro* リン酸化解析を行った。その結果、EZH2 は CDK19 及び CDK8 の新規リン酸化標的であることが明らかとなった。そこで次に、CDK19 または CDK8 が細胞分化に転写レベルで関与するかを検討するため、レチノイン酸により神経細胞への分化を誘導できる Ntera2 cl. D1 細胞を用いて、CDK19 または CDK8 の発現を siRNA によりノックダウンし、神経細胞分化に関わるレチノイン酸標的遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析した。その結果、CDK19 及び CDK8 はレチノイン酸により早期に誘導される神経細胞分化関連遺伝子の転写活性化に関与することが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子発現が 2 つの CDK 及び PRC2 によって直接制御されるかを検討するため、各遺伝子上でのタンパク局在を ChIP により解析した。その結果、各 CDK を含むメディエーター及び PRC2 は、神経細胞分化関連遺伝子のプロモーター上に共局在することが明らかになった。以上の結果から、CDK を含むメディエーターが PRC2 と協調的に神経

細胞分化関連遺伝子の転写制御に関わることが示唆された。

### 【結論・考察】

本研究において、私は CDK19 の相互作用因子として、SUZ12、BRG1、BCL6 を同定した。また、*in vitro* タンパク質相互作用解析から、これらの3因子は CDK19 及び 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を明らかにした。次に、SUZ12 が構成する PRC2 と CDK19 及び CDK8 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 がレチノイン酸により早期に誘導される神経細胞分化関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 解析から、レチノイン酸標的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、メディエーターは細胞分化時に PRC2 と協調的に神経細胞分化関連遺伝子の転写制御を直接行うことが示唆された。私は、本研究において特に、メディエーターとエピジェネティクスとの関係に CDK19 が関与することを見出した。今後、それぞれの CDK 特異抗体を用いた ChIP-seq のようなゲノムワイドな手法を用いた機能解析により、さらに詳細な分子機構や CDK19 と CDK8 の機能の違いを明らかにすることが出来ると考えている。また、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様々な後天的疾患に関わると考えられており、CDK19 及び CDK8 もそれぞれ疾患との関係性が報告されている。このことから、CDK19 を介した転写やエピジェネティックな遺伝子発現制御は、今後、がん治療や再生医療分野での創薬標的分子としての可能性が期待される。

### 【参考文献】

1. Fukasawa R, Tsutsui T, Hirose Y, Tanaka A, and Ohkuma Y. Mediator CDK subunits are platforms for interactions with various chromatin regulatory complexes. *J. Biochem.* 152(3):241-249 (2012)
2. Tsutsui T, Fukasawa R, Shinmyozu K, Nakagawa R, Tobe K, Tanaka A, and Ohkuma Y. Mediator complex recruits epigenetic regulators via its two cyclin-dependent kinase subunits to repress transcription of immune response genes. *J. Biol. Chem.* 288(29):20955-20965 (2013)
3. Fukasawa R, Iida S, Tsutsui T, Hirose Y, and Ohkuma Y. Mediator complex cooperatively regulates transcription of retinoic acid target genes with Polycomb Repressive Complex 2 during neuronal differentiation. (submitted)
4. Kumafuji M, Umemura H, Furomoto T, Fukasawa R, Tanaka A, and Ohkuma Y. Mediator MED18 subunit plays a negative role in transcription via the CDK/cyclin module. *Genes Cells* 19(7):582-593 (2014)
5. Kikuchi Y, Umemura H, Nishitani S, Iida S, Fukasawa R, Hayashi H, Hirose Y, Tanaka A, Sugawara K, and Ohkuma Y. Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells* Epub ahead of print, December 7 (2014)

# 学位論文審査の要旨

真核生物では、全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) が担う。Pol IIは遺伝子の特異的制御配列であるプロモーター上に、5種の基本転写因子 (TFIIB、D、E、F、H) と転写開始複合体を形成することで活性化されるが、*in vitro*転写再構成系の研究から、Pol IIと基本転写因子のみでは核内受容体を始めとする転写因子依存的な転写活性化が起きないことが示された。近年、そこでの遺伝子発現に至る協調的制御の中心的役者がメディエーター複合体 (メディエーター) であることが明らかになってきた。メディエーターは、真核生物で保存された巨大複合体で、ヘッド、ミドル、テイル、CDK/Cyclinのサブモジュールを構成する。当研究室では、CDK/Cyclinは複合体中で唯一の酵素活性を有するCDK8またはCDK19の一方が相互排他的に含まれることを示した。またCDK8とCDK19は同一遺伝子を標的とする一方、相反する転写制御を行うことや、組織発現特異性を見出した。ところがCDK8解析は進んでいる一方で、CDK19はほとんど解析されておらず、2個のCDK間における機能的違いに関する情報は極めて少ない。そこで本研究では、これらCDKの活性を制御するタンパク質がCDKに結合して機能する可能性を考え、転写と細胞分化制御における役割を、CDKに相互作用するタンパク質の同定と細胞分化誘導系を用いた機能制御解析により解析した。

## 1. メディエーターCDKの結合因子の同定

ヒト胎児脳cDNAライブラリーを酵母ツーハイブリッドスクリーニングし、クロマチン再構成複合体ATPase活性サブユニットBRG1、ポリコム複合体サブユニットSUZ12、B細胞分化転写抑制因子BCL6の3因子をCDK19結合因子として同定した。そしてタンパク質間相互作用を検証するため、大腸菌発現組換えタンパク質を用い、*in vitro*結合解析を行った。その結果、候補因子はいずれも全長CDK19とCDK8の両者と直接結合した。次にCDK側のこれら因子の結合領域を同定するため、両CDKで相同性の高いN末キナーゼドメイン領域と相同性の低いC末領域を各々有する欠失変異体を用い、結合実験を行った。その結果、これらは両CDKのN末キナーゼドメイン領域と直接結合することが分った。次にこれら因子はフリーのCDKと結合するのか、メディエーター中のCDKと結合するかを検証するため、HeLa核抽出液を用いて*in vitro*結合解析を行なった。その結果、因子は各CDKが構成するメディエーターと結合した。以上よりBRG1、SUZ12、BCL6は、CDK19及びCDK8の新規結合因子であると判断した。他方、メディエーターを精製し、CDK結合因子としてアルギニンメチル化酵素PRMT5とその相方WDR77を同定し、転写抑制における機能も報告した。

## 2. メディエーターCDKによる転写制御を介した分化制御機構

CDK結合因子SUZ12は、ポリコム複合体のPRC2複合体を形成し、エピジェネティック

に細胞分化関連遺伝子の転写を抑制する。そこでSUZ12とCDKとの関係性を調べ、分化制御を分子レベルで解明する糸口にしようと考えた。まず、PRC2構成因子EZH2との結合を、*in vitro*で検討した。その結果、EZH2は両CDKと直接結合した。同様にCDK欠失変異体を用いた解析の結果、EZH2もSUZ12と同様に両CDKのN末キナーゼ領域と直接結合した。またEZH2はCDK19とCDK8のリン酸化標的であった。そこで次にCDK19またはCDK8が細胞分化に転写レベルで関与するか検討するため、レチノイン酸により神経細胞へ誘導できるNtera2 cl. D1細胞を用い、CDK19またはCDK8の発現をsiRNAによりノックダウンし、神経細胞分化に関わるレチノイン酸標的遺伝子の発現量を定量性PCRにより解析した。その結果、両CDKはレチノイン酸により早期に誘導される神経細胞分化関連遺伝子の転写活性化に関わっていた。さらに、これらの遺伝子発現がCDK及びPRC2によって直接制御されるかを遺伝子のChIP解析により検討した。その結果、各CDKを含むメディエーター及びPRC2は、神経細胞分化関連遺伝子プロモーター上に共局在していた。以上から、CDKを含むメディエーターがPRC2と協調的に細胞分化のための転写制御に関わることが示唆された。

これらの研究成果の多くは国際的な学術誌に公表している。また面接等による学位論文審査を行った。以上のことより、提出した論文内容が博士（薬科学）の学位を授けるに値すると判断した。

なお、本学位論文は、富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）大熊芳明元教授の指導のもとで行われたものである。

1. Rikiya Fukasawa, Taiki Tsutsui, Yutaka Hirose, Aki Tanaka and Yoshiaki Ohkuma. Mediator CDK subunits are platforms for interactions with various chromatin regulatory complexes. *J. Biochem.* 152(3):241-249 (2012).
2. Taiki Tsutsui, Rikiya Fukasawa, Kaori Shinmyozu, Reiko Nakagawa, Kazuyuki Tobe, Aki Tanaka and Yoshiaki Ohkuma. Mediator complex recruits epigenetic regulators via its two cyclin-dependent kinase subunits to repress transcription of immune response genes. *J. Biol. Chem.* 288 (29): 20955-20965 (2013).
3. Rikiya Fukasawa, Taiki Tsutsui, Yutaka Hirose, Satoshi Iida and Yoshiaki Ohkuma. Mediator complex cooperatively regulates transcription of RA-regulated genes with chromatin regulators during neuronal differentiation. in preparation.