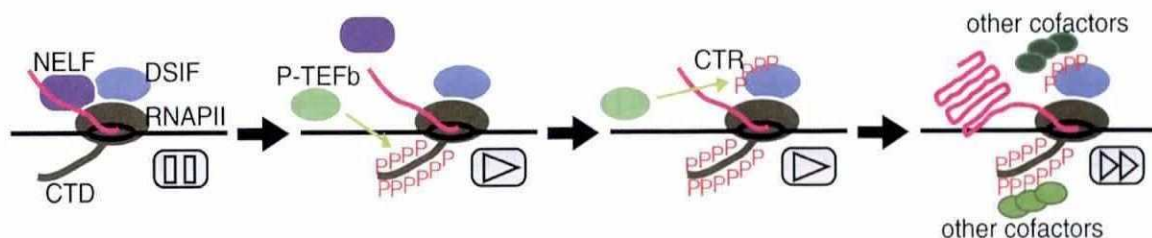


# 転写伸長反応の制御を介した細胞機能発現機構の解明

山口 雄輝

## 1. 研究のねらい

RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) は遺伝情報発現を担う中心酵素である。RNAPII は遺伝子のプロモーター領域に結合し (転写開始前/開始), DNA 上を滑りながら mRNA 前駆体を合成する (転写伸長)。私が転写研究を始めた頃には前者の研究が盛んで、後者は無視されがちだった。私達は RNAPII の転写伸長を制御する基本的因子を探索し、2 つの新規蛋白質複合体 DSIF と NELF を生化学的に精製・同定した (*Genes Dev.* 1998; *Cell* 1999)。私が提唱しているモデル (図) によれば、DSIF と NELF は協調的に働いて転写伸長を抑制する。そして蛋白質キナーゼ P-TEFb は RNAPII の C 末端ドメイン (CTD) をリン酸化することで、この抑制を解除す。さらに DSIF は、NELF 非依存的に転写伸長を促進する能力も併せ持つ。DSIF, NELF, そして P-TEFb は転写伸長段階を制御する新しいクラスの転写因子として現在、一般に認知されている。



上記のモデルは純粹に試験管内の解析結果に基づいている。細胞内でこれら「転写伸長因子」は生化学的に予想されるとおりの機能を果たしているのか。そうだとすると、転写伸長段階の制御は遺伝子発現制御全体の中でどのような位置を占めるのか。これらの疑問に答えるため、私は本さきがけ研究において、ヒト培養細胞やショウジョウバエをモデル系として用いて、転写伸長因子の生理機能の解明に挑んだ。

## 2. 研究成果と考察

<成果 1> ショウジョウバエの熱ショック遺伝子 *hsp70* の発現は転写伸長段階で制御されることが以前から指摘されていた。解析を行なったところ、DSIF, NELF, そして P-TEFb が熱ショックに応答した *hsp70* の発現を *hsp70* の転写開始点の下流近傍において正負に制御して

いることが分かった (*Genes Dev.* 2003)。これは、試験管内の解析結果から導かれたモデルが細胞内に適用可能であることの最初の直接的な例証となった。

<成果 2> DSIF のサブユニット Spt5 にミスセンス変異を持つショウジョウバエ変異体が見つかった。この変異は、初期発生過程の体節形成に異常を引き起こし、*pair-rule* 遺伝子群の発現に影響を及ぼした。この変異はまた、試験管内で DSIF の伸長促進活性にはほとんど影響しなかったが、伸長抑制活性には著しく影響した (*Curr. Biol.* 2004)。これらの結果から、DSIF の伸長抑制活性は分化によって制御される遺伝子の発現制御に重要だと考えられる。

<成果 3> ヒト培養細胞を用いた逆遺伝学的解析から、DSIF と NELF が非誘導時の構成的転写には限定的な影響しか及ぼさないが、様々な生体リガンドに応答した誘導的転写には広範な影響を及ぼすことが分かった。具体的には、TNF $\alpha$  刺激による炎症応答、エストロゲン刺激によるホルモン応答、血清刺激に対する増殖応答といったプロセスを DSIF と NELF が正負に制御することが示された (*Mol. Cell. Biol.* 2004; *Genes Dev.* 2004; 論文発表準備中)。

<成果 4> DSIF による伸長促進のメカニズムはほとんど分かっておらず、この転写伸長制御システムに残る最後の根本的な謎だったが、その手がかりが得られた。DSIF のサブユニット Spt5 が P-TEFb によってリン酸化され、それが DSIF の伸長促進活性に必須であることが分かった。Spt5 の C 末端には G-S-R/Q-T-P という 5 アミノ酸からなる C 末端リピート (CTR) が存在し、そのスレオニン残基がリン酸化の標的である。CTR はリン酸化を受けて、伸長促進活性を有する未知因子と相互作用するのではないかと考えられる (図)。

本さきがけ研究により、DSIF、NELF、P-TEFb が細胞内で確かに RNAPII の伸長反応制御に関与していることが分かった。その働きには明らかに遺伝子特異性があり、複数の誘導的遺伝子発現経路に重要な役割を果たすことが示された。しかしまだケーススタディを積み重ねていく段階にあり、転写伸長制御の細胞内での役割を統一的に理解するには至らなかった。このことを今後の目標としたい。

Spt5 の CTR と RNAPII の CTD との間の潜在的な類似性は興味深い。RNAPII の CTD は転写伸長過程でリン酸化を受け、mRNA のプロセッシングを含む諸反応に重要な役割を果たすことが知られている。CTD 様の機能が伸長複合体の RNAPII 以外の構成要素である Spt5 上にあることが証明できれば、これは転写制御の新たなパラダイムとなるだろう。

### 3. 成果リスト

#### 論文

1. Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., and Handa, H.: Evidence that FFLP represses transcription elongation through binding to a DSIF/RNA polymerase II complex and RNA. **Mol. Cell. Biol.** 22: 2918-2927, 2002.
2. Yamaguchi, Y., Delehouzee, S., and Handa, H.: HIV and hepatitis delta virus: evolution takes different path to relieve blocks in transcriptional elongation. **Microbes Infect.** 4: 1169-1175, 2002.
3. Kuraoka, I., Endou, M., Yamaguchi, Y., Wada, T., Handa, H., and Tanaka, K.: Effects of endogeneous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II: Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. **J. Biol. Chem.** 278: 7294-7299, 2003.
4. Narita, T.\*, Yamaguchi, Y.\*, Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T., and Handa, H.: Human transcription elongation factor NELF: Identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. **Mol. Cell. Biol.** 23: 1863-1873, 2003 (\*筆頭著者).
5. Wu, C.-H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinski, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., and Gilmour, D.S.: NELF and DSIF are implicated in causing promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in Drosophila. **Genes Dev.** 17: 1402-1414, 2003.
6. Inukai, N., Yamaguchi, Y., Kuraoka, I., Yamada, T., Kamijo, S., Kato, J., Tanaka, K., and Handa, H.: A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. **J. Biol. Chem.** 279: 8190-8195, 2004.
7. Ainbinder, E., Amir-Zilberstein, L., Yamaguchi, Y., Handa, H., and Dikstein, R.: Elongation inhibition by DSIF is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF- $\kappa$ B. **Mol. Cell. Biol.** 24: 2444-2454, 2004.

8. Aiyar, S.E., Sun, J.-L., Blair, A.L., Moskaluk, C.A., Lv, Y., Ye, Q.-N., Yamaguchi, Y., Mukherjee, A., Ren, D.-M., Handa, H., and Li, R.: Attenuation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated transcription through estrogen-stimulated recruitment of a negative elongation factor. **Genes Dev.** 18: 2134-2146.
9. Jennings, B.H., Shah, S., Yamaguchi, Y., Seki, M., Phillips, R.G., Handa, H., and Ish-Horowicz, D.: Locus-specific requirement for Spt5 in transcriptional activation and repression in Drosophila. **Curr. Biol.** 14: 1680-1684, 2004.

#### 口頭発表

1. Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H.: Interplay between positive and negative transcriptional elongation. The 5th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 24-28, 2002.
2. Yamaguchi, Y. and Handa, H.: Molecular mechanism of RNA polymerase II elongation control. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting 2003, Cold Spring Harbor, NY, USA, Aug. 27-31, 2003.
3. Yamaguchi, Y., Mura, T. and Handa, H.: Interaction mapping of the RNAPII/HDAG complex: implications for elongation control and viral escape. The 6th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, Germany, Aug. 28-Sep. 1, 2004.
4. Yamaguchi, Y., Yamada, T., Kamijo, S. and Handa, H.: A role for Spt5 phosphorylation by P-TEFb in transcriptional elongation. Transcriptional Regulation by Chromatin and RNA Polymerase II, Lake Tahoe, CA, USA, Oct. 29-Nov. 1, 2004.

#### 謝辞

本研究の遂行に多大な支援を賜った東京工業大学の半田宏教授と研究室の皆様，そして共同研究に際してご助力を賜ったペンシルバニア州立大学の David S. Gilmour 先生，バージニア大学の Rong Li 先生，英国癌研究所の David Ish-Horowicz 先生に心より感謝いたします。