



Title	メディエーター複合体によるRNAポリメラーゼII制御機構の解析
Author(s)	古元, 義
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46519
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	古元 義 <small>ただし</small>
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20250 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	メディエーター複合体による RNA ポリメラーゼ II 制御機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 前田 正知 教授 中川 晋作 教授 土井 健史

論文内容の要旨

真核生物の mRNA をコードする転写は、全て RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が行っている。Pol II は、それ自身のみでは正確な転写を行うことができず、5 種類の基本転写因子 (TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH) の存在が不可欠である。実際に、Pol II と 5 種の基本転写因子により、試験管内で転写を再構成することができる。しかし、生体内で起こる様々な遺伝子の転写はより複雑で、種々の転写制御因子により厳密に制御されている。試験管内で Pol II と基本転写因子のみで再構成した転写では、これら転写制御因子に対する応答は確認することが出来ない。そのため、転写制御因子と Pol II、基本転写因子の間を介在するための因子が存在すると考えられ、その探索がなされていた。こうして発見されてきた因子が、メディエーター複合体である。

メディエーター複合体は 30 種類程度のサブユニットからなる複合体であり、種々の転写制御因子と結合し、そのシグナルを Pol II および基本転写因子に伝達する。現在では 2 種類のサブ複合体が確認されており、その 2 種類は Cdk8/cyclin C を含むサブモジュールの有無で区別されている。そのサブモジュールを含むと TRAP 型の複合体、含まないと PC2 型の複合体と呼ばれる。このようにメディエーター複合体には Cdk8/cyclin C を含む複合体が存在しているが、Cdk/cyclin 型の転写因子は他にも Cdk7/cyclin H を含む TFIIH と、Cdk9/cyclin T1 からなる P-TEFb が知られている。TFIIH と P-TEFb は、Pol II 最大サブユニットの C 末端領域に存在する CTD をリン酸化することで転写活性化に役割を果たしていると考えられている。しかし、メディエーター複合体に存在する Cdk8/cyclin C は、その具体的な役割は明らかになっていないが、転写活性化ではなく転写抑制に働くと考えられている。その理由は *in vitro* で TRAP 型複合体が転写抑制を起こすことによる。それとは逆に、PC2 型複合体は *in vitro* で転写活性化を引き起こすため、PC2 型は転写活性化に寄与していると考えられている。私は、これら 2 種のサブ複合体、さらにはまだ同定されていない未知のサブ複合体の分離を試みて、いまだ解明されていないそれら複合体による Pol II の制御メカニズムを明らかにするため、特に Cdk8 サブユニットのリン酸化活性に着目し、実験を行った。

まず、*in vitro* でメディエーター複合体の活性を解析するために、ヒト HeLa 細胞からメディエーター複合体の精製を行った。精製を簡便にするために、TRAP 型と PC2 型の区別に重要な Cdk8 と、その両方のサブ複合体に含まれている Med6、Med7 の 3 種のサブユニットの N 末に HA タグと Flag タグをタンデムに融合したメディエーター複合体のサブユニットを HeLa 細胞中に過剰発現した細胞株を樹立した。そして、それらの細胞の核抽出液から Flag 抗体カラムでの精製を行った。その精製画分には、メディエーター複合体のサブユニットが含まれていた。さらに、

我々がマウスメディエーター複合体の構成因子である p28b のヒトホモログとして同定したヒト p28b もその画分に含まれており、ヒトメディエーター複合体の構成因子であることを証明できた。

次に Flag 抗体カラム精製画分をゲルろ過カラムにかけることで、分子サイズの異なる複合体を分離することを試みた。Cdk8、Med7 からは 1~1.5 MDa の TRAP 型と同じサイズの複合体が主に検出されたが、Med6 からは 1~1.5 MDa と 600 kDa の 2 つのピークが検出できた。600 kDa の複合体は PC2 型の複合体と同じサイズであり、PC2 型の複合体と考えられる。

こうして精製したメディエーター複合体を用いて、CTD のリン酸化活性と転写再構成系での活性を調べた。まず、CTD のリン酸化活性は Med6 から精製された 600 kDa の複合体では検出できなかったが、TRAP 型のサイズの複合体からは検出できた。そして、転写再構成系では Cdk8 の 1 つのフラクションでは転写抑制が確認されたが、それ以外のフラクションでは、Cdk8 を含んでいる複合体も転写活性化の促進を示した。これらのことから、CTD のリン酸化能と転写への影響の間に相関性を見出すことはできなかったが、これまで考えられているように Cdk8 を有する TRAP 型複合体が、転写を抑制するとは限らないということが明らかとなった。

Cdk8 がこれまでの報告と異なる役割を果たしている可能性が考えられたため、Cdk8 の細胞内での機能を検討していくことにした。Cdk8 の機能解析にあたって、まず HeLa 細胞中で siRNA によるノックダウンを試みた。Cdk8 をターゲットとした siRNA をトランスフェクションし、2 日後には Cdk8 の減少が確認できた。そこで、Cdk8 をノックダウンした細胞中で、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性の変化を検討したところ、転写活性の大幅な減少が確認できた。このことから Cdk8 は転写活性化に重要な役割を果たす因子であると考えられる。さらに、リン酸化活性を欠損させた Cdk8 の変異体は転写活性化を引き起こすことができなかったことから、Cdk8 のリン酸化活性の重要性が示唆された。また、我々がメディエーター複合体のサブユニットの 1 つと同定した p28b についても、Cdk8 と同様に siRNA とルシフェラーゼアッセイの解析を行った。そして、p28b は Cdk8 とは逆に転写に抑制的に働くサブユニットであることを見出した。p28b の具体的な機能ははまだ未知のままであるが、この解析がメディエーター複合体の転写抑制機構の解明の糸口になる可能性が考えられる。

本論文ではこれまでの他の研究グループからの報告とは異なり、Cdk8 は転写活性化に重要な因子であり、そのリン酸化活性の必要性を示すことができた。Cdk8 の有するリン酸化活性の具体的な役割は現段階では不明であるが、転写活性化に働くメディエーター複合体の中で重要な役割を果たしていることは明らかである。そのため、Cdk8 の解析からメディエーター複合体による転写制御機構が解明できる可能性が考えられ、今後の展開に期待がもたれる。

論文審査の結果の要旨

メディエーター複合体は、30 種類程度のサブユニットからなる複合体で、種々の転写制御因子と結合し、そのシグナルを RNA ポリメラーゼ II (Pol II) および基本転写因子に伝達する。これまでに Cdk8/cyclin C を含む TRAP 型とそれを含まない PC2 型の少なくとも二種類のメディエーター複合体が知られているが、そこにおける Cdk8/cyclin C の具体的な役割は明らかではなかった。そこで本論文では、いまだ解明されていないそれらの複合体による Pol II の制御メカニズムを明らかにするため、特に Cdk8 のリン酸化活性に着目して実験を行い、以下のような結果を得た。

1) Cdk8 を含む数種類のサブユニットにタグをつけた形で HeLa 細胞で過剰発現させ、メディエーター複合体を精製した。ゲルろ過の結果、Cdk8 を含む分子量 1-1.5 MDa の TRAP 型複合体ならびに分子量 600 kDa の PC2 型複合体が得られた。

2) こうして精製したメディエーター複合体を用いて、Pol II 最大サブユニットの C 末端領域に存在する CTD のリン酸化活性を調べたところ、PC2 型複合体はその活性を示さず、TRAP 型複合体は活性を有していた。

3) 一方、転写の再構成系では、Cdk8 を含む画分の一部では転写抑制が見られたが、Cdk8 を含む複合体も転写活性化の促進を示した。すなわち CTD のリン酸化能と転写への影響の間に必ずしも相関性があるわけではないことが示された。

4) Cdk8 の細胞内での機能を検討するため、HeLa 細胞での siRNA による Cdk8 のノックダウン実験を行ったところ

ろ、Cdk8 の減少と転写活性の減少との間に相関性が見られた。またリン酸化活性を欠損させた Cdk8 の変異体は転写活性化を引き起こすことが出来なかったことから、Cdk8 のリン酸化活性は転写を正に制御していると結論した。

5) われわれがメディエーター複合体のサブユニットの一つと同定した p28b についても siRNA などにより調べたところ、Cdk8 とは逆に転写の抑制に働く因子であることを見出した。

以上のように、本論文はメディエーター複合体による転写制御機構に関して新たな知見を明らかにしており、博士(薬学)の学位を授与するに相応しいものと考えます。