

# メディエーターによる発癌プロモーター刺激の機構解明

富山大学大学院 医学薬学研究部 遺伝情報制御学研究室

大熊 芳明

## 1. 目的

真核生物では、転写はクロマチンの活性化を伴う構造変換と連動している。申請者は、細胞核内でこの連動を担う制御コファクター複合体であるメディエーター複合体（以下メディエーター）を研究している。メディエーターは、ヒトでは30個のサブユニットから構成される巨大複合体で、酵母からヒトまで広く保存され機能している。複合体中の2つのキナーゼサブユニット CDK8と CDK19は、転写を司る RNA ポリメラーゼ II (Pol II)リン酸化により転写活性を調節することが明らかになっており、我々は2つの CDK がメディエーターの担う機能制御の要であると考え、解析を進めている。実際、siRNA による CDK8と CDK19各々をノックダウンして生細胞内の転写活性化への影響をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、CDK8が転写活性化、CDK19は転写抑制と全く正反対の機能を示した(Tsutsui *et al.*, *Genes Cells*, **13**, 817-826, 2008)。各々が異なる遺伝子を標的としていると考え、2つの CDK の標的遺伝子を探索したところ、CXCR4というケモカインレセプターの遺伝子が同定され、その機能が癌の転移や癌細胞の血管内への浸潤であることから、メディエーターが CXCR4以外の CDK 標的遺伝子も含め転写を細かく制御することで生体内ホメオスタシス維持に関わるというモデルを提唱した(Tsutsui *et al.* *Genes Cells*, **16**, 1208-1218, 2011)。これに関連して、ドイツの Leutz らのグループから Ras/MAP キナーゼ経路でリン酸化により活性化された C/EBP $\beta$ がメディエーターと結合し、これを抑制型から活性化型へと変換させることが報告されている(Mo *et al.*, *Mol. Cell*, **13**, 241-250, 2004)。一方、2つの CDK に相互作用する因子を、各々の CDK にタグを付けた細胞株を樹立して、メディエーター複合体をアフィニティー精製後、マススペクトル法にて同定すると、ヒストンアルギニンメチル化酵素 PRMT5と WD モチーフタンパク質 WDR77が見いだされた(Tsutsui *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20955-20965, 2013)。この結果は、メディエーター複合体の転写とクロマチン制御への関わりを明確に示している。

大変興味深いことに、最近、メディエーター複合体が細胞分化・脱分化決定の際に、この決定に特異的に作用するマスター転写因子とクロマチン DNA を束ねる機能を持ったコヒーシオンと3者が協調して重要な役割を果たすことが明らかとなり、幹細胞性維持の際には京大の山中先生が見いだした4因子(Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc)と Nanog がマスター転写因子として機能し、メディエーター複合体はこれらと協調的に機能することが示された(Takahashi & Yamanaka, *Cell* **126**, 663-676, 2006; Lee & Young, *Cell* **152**, 1237-1251, 2013)。同時に、メディエーター複合体のこの機能が正常細胞からがん細胞へと移行する際にも用いられることが明らかになり、その際は i)がん原遺伝子の持つ非常に転写活性の強いスーパーエンハンサー領域を破壊するか、ii)そこに結合して機能するメディエーター複合体や関連因子を制御するという、2つのがん治療方策が提唱されている(Lovén *et al.*, *Cell* **153**, 320-334, 2013)。近年、申請者が研究しているメディエーターサブユニット CDK8が結腸癌やメラノーマのがん化に直接関わる報告がなされたことから(Firestein *et al.*, *Nature* **455**, 547-551, 2008; Kapoor *et al.*, *Nature* **468**, 1105-1109, 2010)、本研究は発癌プロモーター PMA が強力に C/EBP $\beta$ を活性化することに注目し、「PMA が細胞核内でホメオスタシス維持に関わるメディエーターの活性にどのように影響するかを調べることで発癌プロモーターによるホメオスタシスの破綻から発癌に至る分子機構を解明すること」を目的とする。

## 2. 方法

発癌プロモーターであるホルボールエステル PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)、別名 TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate)は、C キナーゼ(PKC)の下流シグナル伝達経路を活性化する。これに伴い細胞の形質が変化し癌化や細胞分化につながることから、その際の転写やエピゲノム変動を解析することは大変重要と考える。そして PMA 処理により、メディエーターも転写抑制型から活性化型への明確な変動を行うため、メディエーター機能と発癌分子機構を解明する良い系を提供すると考え、本研究に至った。これまで、PMA 処理により Ras/MAP kinase 経

路が活性化される結果、C/EBPβが活性化され、その4つの標的遺伝子 *IL-1β*、*IL-8*、*IL-12A*、*TNFα*はプロモーター領域にC/EBPβやリン酸化 Pol II をリクルートすることが知られている。そこで今回、以下の2つを研究を行った。

### 1) PMA 処理による細胞のエピゲノム変動の同定

上記したように、PMA 処理は細胞の形質を転換する。申請者らはこれまでに、HeLa 細胞を用いてメディエーター複合体による転写やエピゲノム変化に対する役割の解析を行ってきた。今後、PMA 処理を行うことで細胞のエピゲノムがどのように変動する結果として、これまでに観察されたC/EBPβ活性化とそれに伴う転写制御が引き起こされるのかを詳細に明らかにする。

### 2) 転写抑制型の機能を担うメディエーター複合体のサブタイプの同定

1) で明らかにしたエピゲノム変動に連動する転写制御とメディエーター複合体の関連を明らかにし、その際のメディエーター複合体のサブタイプの同定を行う。これまでに申請者は、メディエーター複合体には2個のCDK、CDK8とCDK19が各々、相互排他的にメディエーター複合体を形成しており、これらは生きたHeLa細胞内の転写活性化系において正反対の機能をしていることを明らかにしており(Tsutsui *et al.*, *Genes Cells*, 2008)、転写に抑制的に作用すると考えられる反応を引き起こす場合のメディエーターとCDKモジュールの関係を解析する。さらに別のメディエーターサブユニットで転写抑制を担っているヘッドモジュールサブユニットMED18に関しても解析していく。

## 3. 結果

### 1) PMA 処理による細胞のエピゲノム変動の同定

ヒトHeLa細胞をPMAで37°C 2時間処理し、C/EBPβの2つの標的遺伝子 *IL-8*、*TNFα*の転写を調べると、PMA 依存的に転写活性化された。一方、PMA 不応性遺伝子である *FAM103A1*は、全く転写量が増えなかった。

次にPMA処理前後での *IL-8* と *TNFα* 遺伝子のプロモーター(P)とエキソン(E)領域への転写アクティブなリン酸化されたRNAポリメラーゼII (Pol II)、C/EBPβ、メディエーター複合体CDK8/CDK19サブユニットの結合を、ChIP-qPCRを用いて調べた(図1)。その結果、PMA処理前はC/EBPβもPol IIも遺伝子上には殆どなく、メディエーターの2個のCDKはプロモーター領域に結合していた。次にPMA処理によって、C/EBPβはプロモーター領域に特異的にリクルートされ、またリン酸化Pol IIはプロモーターとエキソンの両方に存在するようになった。一方、CDK8/CDK19は逆にPMA未処理時にはプロモーターとエキソンに結合しているが、PMA処理により逆に脱離していた。以上は、転写活性化とCDK8/CDK19の脱離が関連している可能性を示唆している。

そこで、CDK8/CDK19をsiRNAでノックダウンして転写への影響を調べた。その結果、転写活性化が見られ、このことからCDK8/CDK19のプロモーターからの除去と転写活性化が実際に関連していることが明らかとなった。

最後に、PMA処理によって、*IL-8*と*TNFα*遺伝子のプロモーター領域においてメディエーター複合体のCDK8/CDK19と相互作用していることを見つけたヒストンアルギニンメチルトランスフェラーゼPRMT5や、これによるヒストン修飾H4アルギニン3番目の対称的ジメチル化(H4R3me2s)、この修飾特異的にヒストンに結合するDNAメチル化酵素DNMT3Aのプロモーターとの結合がどう影響されるかをChIP-qPCRにより解析した(図2)。その結果、これらタンパク

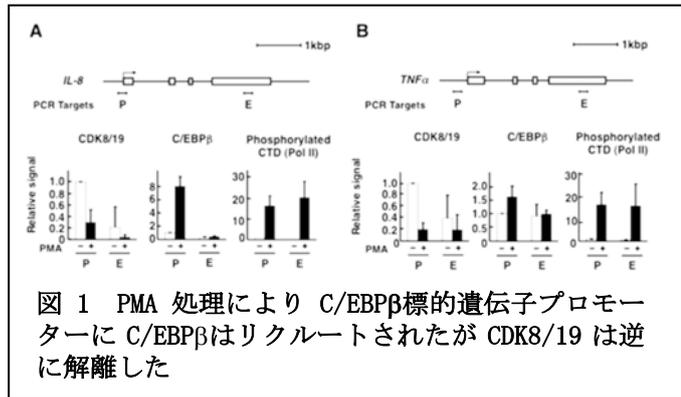


図1 PMA 処理により C/EBPβ標的遺伝子プロモーターに C/EBPβはリクルートされたが CDK8/19 は逆に解離した

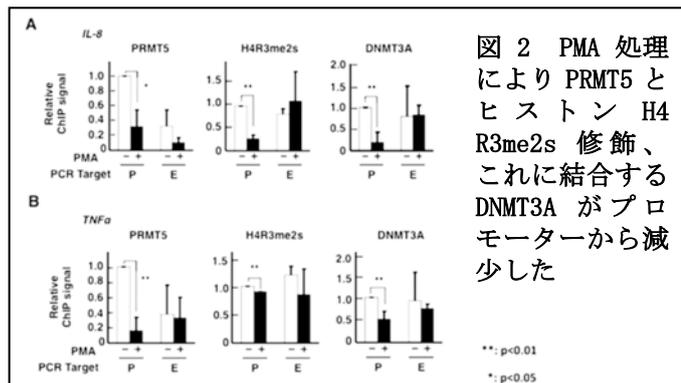


図2 PMA 処理により PRMT5 とヒストン H4 R3me2s 修飾、これに結合する DNMT3A がプロモーターから減少した

質やヒストン修飾もプロモーター領域で減少したことが明らかになった。

以上の結果から、PMA 処理による転写活性化のモデルを提唱した(図3)。PMA 処理前は、CDK サブユニットを持つメディエーター複合体がプロモーターに結合して転写を抑制しているが、その際に PRMT5 がヒストン H4R3me2 修飾をして DNA メチル化酵素 DNMT3A も近傍に結合させている。PMA 処理で CDK サブユニットはメディエーターから解離させられ、これに伴い PRMT5 や DNMT3A も解離して転写が活性化されるというものである(Tsutsui *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20955-20965, 2013)。

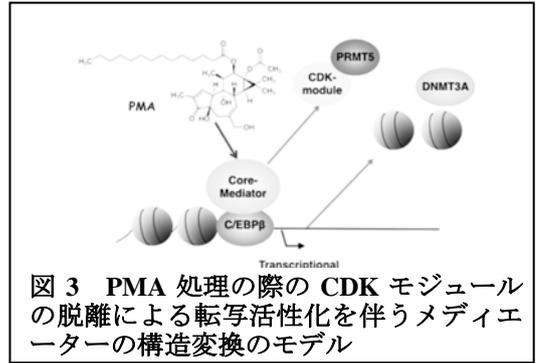


図3 PMA 処理の際の CDK モジュールの脱離による転写活性化を伴うメディエーターの構造変換のモデル

## 2) 転写抑制型の機能を担うメディエーター複合体のサブタイプの同定

1) の結果は、CDK8/CDK19を含むメディエーター複合体内の CDK モジュールが転写において抑制的に機能しているというものであるが、近年メディエーター複合体のヘッドモジュールの MED17サブユニットが転写活性化、MED18サブユニットが転写抑制に関わるという酵母の遺伝学を用いた解析結果が報告されてきている。また、MED18が CDK モジュールの制御の下流であるという報告もされている。そこでヒト MED18 (hMED18)を解析する目的で siRNA により hMED18をノックダウンしたところ、細胞内で転写活性化因子 Gal4-VP16依存的転写活性化の促進が見られた。これはつまり hMED18が転写の抑制に関わることを意味している。

そこで、この hMED18が転写を抑制する標的遺伝子の同定を DNA マイクロアレイを用いて行ったところ、思ったより標的遺伝子の数は少なく、50個程度であった。その中で qPCR により確認された2つの遺伝子(*FAM103A1/RAM* と *SLC11A2/DMT1*)に関して、その遺伝子上の転写関連因子の分布を定量的 ChIP-qPCR で調べると、両遺伝子共にプロモーター領域に全てのモジュールを備えたホロメディエーター複合体が結合していた。これを hMED18の siRNA で処理すると、驚いたことにメディエーターの CDK モジュールだけはプロモーター上に留まっていることが分った(図4)。これは、CDK モジュールが単独で転写活性化に機能する初めての発見となりうる重要な知見と考えている。

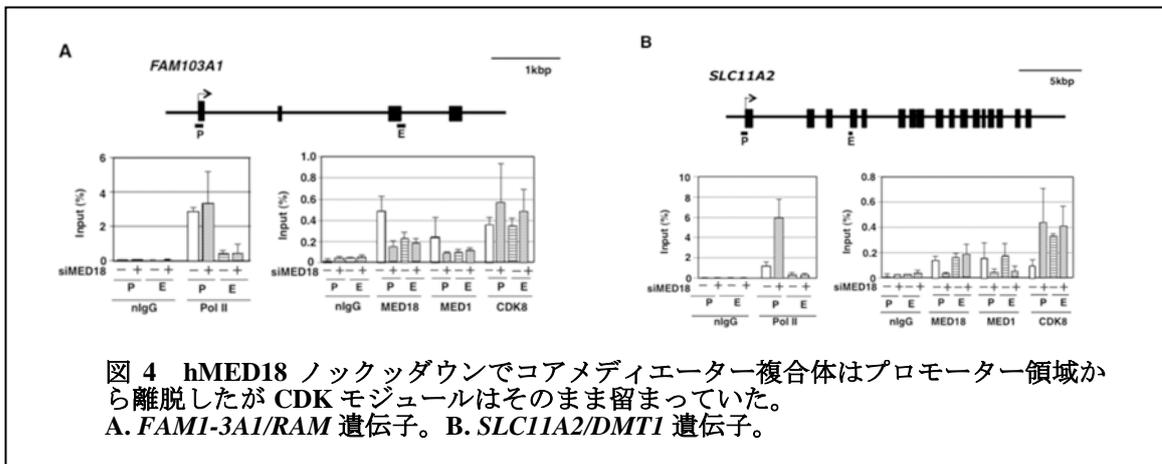


図4 hMED18 ノックダウンでコアメディエーター複合体はプロモーター領域から離脱したが CDK モジュールはそのまま留まっていた。  
A. *FAM103A1/RAM* 遺伝子。 B. *SLC11A2/DMT1* 遺伝子。

## 4. 考察

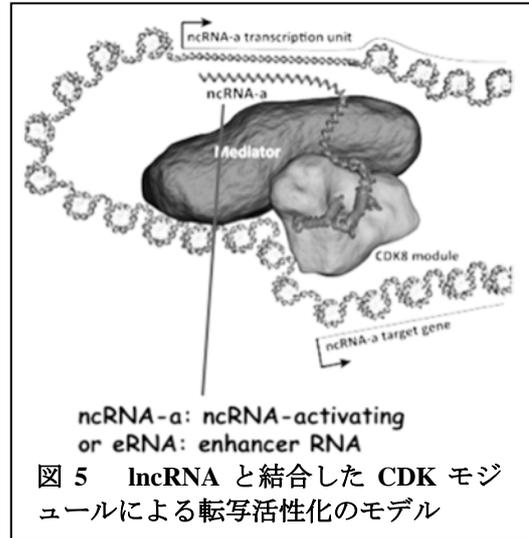
上記した様に、最近になってメディエーター複合体の役割として、細胞分化・脱分化とがん化の細胞運命決定において、マスター転写因子、コヒーシンと共に重要な役割を果たすことが明らかになっている。その際に重要な役割を担っていると考えられるのが、メディエーター複合体内で唯一の酵素活性であるキナーゼ活性を担っている CDK8と CDK19モジュールである。生体内の複合体はこれら2つの CDK のうち、どちらか1つだけが含まれていることを我々は明らかにしているが、この活性の制御が細胞分化やがん化の際にも決定的な役割を果たしていると考えている。

結果の1) では、PMA 処理により CDK モジュールが複合体から解離して、これが転写の活性化状態に結びつくという、オーソドックスな機能のメカニズムを解析したが、その結果はクリアーでプロモーター近傍のクロマチン状態が活性型ユークロマチンになることに CDK が大きく寄与していることが明らかになった。このモデルは、図5に示した通りである。PMA などの

発癌プロモーターにより転写が活性化されると CDK に結合していた抑制性のヒストン修飾酵素 PRMT5や、その近傍に存在することが示されている DNA メチル化酵素 DNMT3A がコアメディエーター複合体から離れることで、プロモーター近傍は転写の開始できるように裸の DNA が開裂する状態になれると考えられる。

一方、2) の結果はより興味深く、ホロメディエーター複合体から解離したフリーの CDK モジュールが転写活性化に関与している可能性を示している。フリーの CDK8や CDK19モジュールは、Pol II の C 末端 CTD 領域の繰返し配列(YSPTSPS)の5番目セリン(Ser5)でリン酸化

しうることが示されており、これらと転写活性化の関係は未だ解明が進んでいない。ところが最近 CDK モジュールの MED12サブユニットが、eRNA (エンハンサーRNA)とか活性型ノンコーディング RNA (ncRNA-activating)と呼ばれる一群の長鎖ノンコーディング RNA (lnc RNA)と結合して転写活性化に関わることが報告された(図5) (Carlsten *et al.*, *TIBS*, 38, 531-537, 2013)。未だ、この lnc RNA が結合した CDK モジュールはメディエーター複合体内に結合している時に機能しているというモデルが考えられているが、我々が見いだした、フリーの CDK モジュールが転写活性化に機能している時にこれら lnc RNA と結合していることが明らかになった際には、世界で始めてこの CDK モジュールによる転写活性化制御のメカニズムを明らかにすることができると考える。また、実際に CDK8の変異による結腸がんやメラノーマの発症や MED12の変異による子宮平滑筋腫や前立腺がんの発症例が数多く報告もされてきている (Firestein *et al.*, *Nature* 455, 547-551, 2008; Kapoor *et al.*, *Nature* 468, 1105-1109, 2010; Mäkinen *et al.*, *Science* 334, 252-255, 2011; Barbieri *et al.*, *Nat. Genet.* 44, 685-689, 2012)。そこで今後は、さらに細胞癌化の運命決定の際のメディエーター複合体の果たす役割と、これに対する薬物治療法の確立につながるような研究に進めていきたいと考えている。



## 5. 発表論文

1. Tsutsui, T., Fukasawa, R., Shinmyozu, K., Nakagawa, R., Tobe, K., Tanaka, A., and **Ohkuma, Y.** (2013) Mediator complex recruits epigenetic regulators through its two CDK subunits to repress transcription of immune response genes. *J. Biol. Chem.* 288, 20955-20965.
2. Fukasawa, R., Tsutsui, T., Hirose, Y., Tanaka, A., and **Ohkuma, Y.** (2012) Mediator CDK Subunits Are Platforms for Interactions with Various Chromatin Regulatory Complexes. *J. Biochem.* 152, 241-249.