

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒストンメチル化酵素ASH1Lと転写伸長因子DSIFならびにNELFの機能解析
Title(English)	
著者(和文)	小森敏治
Author(English)	Toshiharu Komori
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7628号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,半田 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7628号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:.
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

平成 20 年度

ヒストンメチル化酵素 ASH1L と
転写伸長因子 DSIF ならびに NELF の機能解析

東京工業大学大学院

生命理工学研究科 生命情報専攻

平成 18 年度入学 学籍番号 : 06D23077

小森敏治

指導教官

半田 宏

目次

第 1 章 序論	5
1-1 はじめに	5
1-2 RNA ポリメラーゼ	5
1-3 RNAP II による転写制御のメカニズム	6
1-4 転写伸長因子	7
1-5 ヒストンの翻訳後修飾	8
1-6 ポリコム遺伝子群とトリソラックス遺伝子群	9
1-7 本研究の目的	11
1-8 図表	12
第 2 章 ASH1L 変異マウスの解析	18
2-1 緒言	18
2-2 材料と方法	22
2-2-1 プラスミドの構築	22
2-2-2 ノーザンブロッティング	22
2-2-3 フィーダー細胞の作製	23
2-2-4 ターゲッティングベクターの ES 細胞への導入	23
2-2-5 遺伝子導入された ES 細胞の選択	24
2-2-6 floxed-SET マウスならびに <i>ash1ΔSET</i> マウスの作製	25
2-2-7 PCR 解析	25
2-2-8 マウス新生仔の骨格標本の作製	26
2-3 結果	27
2-3-1 <i>ash1ΔSET</i> マウスは正常に繁殖する	27
2-3-2 <i>ash1ΔSET</i> マウスはホメオティック変異を起こす	27
2-4 考察	29
2-5 図表	31

第 3 章 Spt5 ノックダウンアプローチによる DSIF の機能解析	37
.....	37
3-1 緒言	37
3-2 材料と方法	40
3-2-1 プラスミドの構築	40
3-2-2 抗体	41
3-2-3 細胞培養	42
3-2-4 レンチウイルスによるノックダウン実験	42
3-2-5 テトラサイクリン添加によるノックダウン実験	42
3-2-6 FACS による細胞周期の解析	43
3-2-7 マイクロアレイとリアルタイム定量 PCR 解析	43
3-2-8 Spt5 変異体による構造活性相関解析	45
3-3 結果	46
3-3-1 Spt5 は細胞増殖に必須である	46
3-3-2 Spt5 ターゲット遺伝子のゲノムワイドプロファイリング	48
3-3-3 Spt5 のノックダウンは p53 シグナル経路を活性化する	50
3-3-4 Spt5 の C 末端領域は細胞増殖に必要ではない	52
3-4 考察	55
3-5 図表	61
第 4 章 NELF のダイナミクス解析	80
4-1 緒言	80
4-2 材料と方法	83
4-2-1 プラスミドの構築	83
4-2-2 細胞培養	83
4-2-3 抗体	84
4-2-4 免疫染色	84
4-2-5 免疫沈降・イムノブロッティング	84
4-2-6 細胞種間ヘテロカリオン解析	85
4-2-7 蛍光顕微鏡を使った生細胞の観察	85

4-2-8	細胞周期の同調	86
4-2-9	NE のノックダウン実験	86
4-3	結果	87
4-3-1	間期にある細胞内で NELF は核に局在する	87
4-3-2	過剰発現した NELF-B と NELF-C は核と細胞質に局在する	87
4-3-3	NELF は核-細胞質間輸送活性を持つ	88
4-3-4	NELF のサブユニット間の存在比が細胞内局在を決定する	90
4-3-5	生細胞内における NELF body の物質動態	91
4-3-6	NELF-B と NELF-C は有糸分裂終期に midbody に局在する	92
4-3-7	NELF ノックダウンは細胞と核の肥大化、多核化を引き起こす	93
4-4	考察	95
4-5	図表	100
第 5 章 本研究のまとめ		112
参考文献		113
謝辞		127

第 1 章 序論

1-1 はじめに

ヒトは水とタンパク質からできていると世間的に形容されることがあるが、それと同時にヒトはそんな単純な生き物ではないという認識も当たり前のようには持たれている。

タンパク質ができるまでには、まず DNA の一次配列の情報を元にして RNA が合成される転写という段階を経る。そしてさらにその RNA からタンパク質が合成される翻訳という段階を経なくてはならない。この DNA→RNA→タンパク質という一方通行に遺伝情報が伝達されるという概念をセントラルドグマという。このセントラルドグマの最初のステップが転写であり、RNA Polymerase (RNAP) II によって messenger RNA (mRNA) が合成される段階である。転写は遺伝子発現の主要な制御段階であり、これを制御する転写制御因子群は、さまざまな生命現象の根幹を形成していると言っても過言ではない。転写制御因子の異常を起因にして、多くの遺伝病やがんなどが発生することが分かっている。ゆえに、転写制御因子という小さなマシンたちが、生物という大きなものを動かしているという事実を突きとめることは、生物のロマンを追い求めるのと同等のことであると感じている。私は転写制御因子の研究を通じて細胞レベルそして個体レベルにおけるその役割を解明することで、そのロマンを追い求めたいと考えた。

以降、本章では、ヒトを含む真核生物における転写反応の基本メカニズムと、それに関わる転写制御因子の一部について概説する。

1-2 RNA ポリメラーゼ

真核生物の RNAP には RNAP I、II、III の 3 種類が存在し、標的遺伝子によって使い分けられている (図 1-1) (Roeder.1996)。これらはそれぞれ

12-16 個程度のサブユニットから成る巨大な酵素である。RNAP I と RNAP III はそれぞれ ribosomal RNA (rRNA) と transfer RNA (tRNA) の転写という比較的少数の遺伝子の転写を担っている。それに対し、タンパク質をコードする遺伝子は RNAP II によって転写反応が行われ、mRNA が合成される。RNAP II はヒトの場合、約 3 万種類と言われている遺伝子の転写を担っている。

また、RNAP II の最大サブユニットである Rpb1 には、C 末端側に YSPTSPS の 7 アミノ酸配列が数十回繰り返された C-Terminal Domain (CTD) が存在し、他の RNAP にはない特徴のひとつとなっている。この CTD は、多様な遺伝子発現制御、そして mRNA のキャッピングやスプライシングといった RNAP II 特異的な現象に関与していると考えられている。

1-3 RNAP II による転写制御のメカニズム

RNAP II 系の転写反応において、RNAP II 自体にはプロモーター認識能はなく、RNAP II のプロモーターへのリクルートは、基本転写因子群 (TF II A、TF II B、TF II D、TF II E、TF II F、TF II H) と呼ばれる一連の基本転写因子によって行われる (Roeder.1996)。さらに、プロモーター上での基本転写因子の集合は、他の転写因子やメディエーターなどの仲介因子によって遺伝子ごとに調節される。この転写因子は、特有のシス因子を認識し、さらには結合することにより周辺遺伝子の発現に変化を及ぼす。

転写反応の最初のステップとして、基本転写因子と RNAP II がプロモーター上に集結し、開始前複合体が形成される (図 1-1)。これを転写開始前反応という。ここにヌクレオチド 3 リン酸が加わると、プロモーター領域の DNA の巻き戻しが起こり、転写産物の合成とともに RNAP II がプロモーターから離れ、鋳型 DNA 上を 3' 方向に進み始める。これを転写開始反応という。

その後、RNAP II はそのまま転写終結までスムーズに転写反応を行うわけではない。転写開始反応とは単に転写のスタートの段階にすぎない。転写反

応は開始段階から伸長段階に移行され、RNAP II は mRNA の合成のために鋳型 DNA 上を進まなければならない。それが遺伝子によっては数万、数十万塩基という長さの DNA 上を進むことにもなる。そして、その長い旅の間にもさまざまな制御機構が働いていると推測することは自然なことである。

この段階で転写反応の制御に関わるのが転写伸長因子であり、近年、これらの因子が次々同定され、その機能に関しても徐々に解明されてきている（表 1-2）。これらの因子によって、RNAP II は数千、数万塩基といった長さの DNA 上を勝手に進んでいくのではなく、伸長促進という正の方向、そして伸長抑制という負の方向にも制御されている。また、キャッピングやスプライシングといった新生 mRNA への修飾反応も共役して行なわれる（Orphanides *et al.*, 2004）。転写伸長段階を経た後、伸長複合体は RNAP II から解離し、新生 mRNA の 3'末端側にステムループ構造が形成される反応や、ポリ A 配列が付加される反応を経由して転写終結が起こる（図 1-2）。

1-4 転写伸長因子

転写伸長因子は、RNAP II に直接働きかけることによって機能する。そして、転写伸長段階を制御する因子である（Sims *et al.*, 2004）（表 1-2）。これまでに同定された転写伸長因子を表 1-2 に載せた。この中で、伸長抑制をもたらす因子は DRB sensitivity-inducing factor (DSIF) と negative elongation factor (NELF) だけであり、それ以外の因子は伸長促進をもたらす因子である。これらは伸長反応中の RNAP II の伸長の程度が遅くなったり一時停止を起こしたりすることに対応して位置づけられたものである。そして、伸長促進因子はその特徴によっていくつかのグループに分類することができる。TF II F、Elongin、P-TEFb、ELL のように RNAP II の一時停止を解除する機能を持つもの、Spt6、Elongator、FACT のように、ヌクレオソーム構造に働きかけるもの、TF II S のように、転写伸長中に間違われて取り込まれたヌクレオチドを取り除き、RNAP II の転写の正確性を保つものなどである。

1-5 ヒストンの翻訳後修飾

転写制御ネットワークの中でも、重要かつ普遍的なエピジェネティック制御機構としてヒストンの翻訳後修飾が挙げられる (図 1-3)。

ヒストンとは DNA と強く結合し、クロマチンを構成するタンパク質の一群である。ヒストンを構成するタンパク質として、主に 5 種類のヒストン (H1、H2A、H2B、H3、H4) が知られている。このうち、H2A、H2B、H3、H4 の 4 種は、コアヒストンと呼ばれ、それぞれ二分子が集まりヒストン八量体を形成する。ひとつのヒストン八量体は、約 146 bp の DNA を左巻きに約 1.65 回巻き付ける。この構造がヌクレオソームであり、クロマチン構造の最小単位である。H1 はリンカーヒストンと呼ばれ、ヌクレオソーム間の DNA に結合する。つまり、ヒストンは DNA が核内に存在するための土台となっており、転写反応に何かしらの機能を果たしているということは容易に想像することができる。

ヒストンは以前からアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化などのさまざまな翻訳後修飾を受けることが知られていた。ヒストン翻訳後修飾は下等動物や酵母においても保存されていることから、基本的な転写制御機構のひとつと考えられていたが、その役割はほとんどわかっていなかった。しかし、21 世紀に入って特定のアミノ酸修飾のパターンが何らかの遺伝情報をコードするのではないかという仮説 (ヒストンコード仮説) が立てられて以来 (Strahl *et al.*, 2000)、それまでアセチル化によるクロマチン構造の変換一辺倒であったヒストン翻訳後修飾の概念を一新され、現在では多くの被修飾残基が同定され、その修飾酵素も次々に同定されている。また、残基特異的な脱アセチル化酵素や脱メチル化酵素、脱リン酸化酵素も同定されてきており、これらの修飾反応は不可逆的なものだけでなく、可逆的な反応も存在することが近年明らかになってきている (Cole, 2008)。

これらの修飾が組み合わさってヒストンの構造と機能が制御されると示唆されている。ヒストンはその構造から DNA と密に結合しているため、ヒ

ストンの構造と制御は転写反応の制御に大きな役割を果たしていると考えられている。当初はヒストンが修飾されることによるヒストン自体の電荷の変化が生じ、それによって転写制御の効果が発揮されると考えられていたが、現在では修飾された残基特異的にリクルートされる因子の機能によって新たな転写制御イベントが行われると考えるのが通説となっている。

1-6 ポリコーム遺伝子群とトリソラックス遺伝子群

転写制御を行う因子の中で、特に高等真核生物の胚発生に関わり、遺伝子特異的に発現制御をする因子群がある。生体の前後軸ならびに体幹の領域・組織決定に深く関わる Hox 遺伝子群の転写制御因子である (図 1-4)。そして、これらの転写制御因子は Hox 遺伝子群の発現抑制に関わるポリコーム (Polycomb) 遺伝子群 (PcG) と、発現の活性化に関わるトリソラックス (trithorax) 遺伝子群 (trxG) の 2 つのグループに大別される。

PcG/trxG は個々の遺伝子の変異体がホメオティック変異を表すことから同定された因子によって構成されている。ホメオティック変異とは、多細胞生物体の一部の器官が本来の形をとらず、他の相同な器官に転換する変異のことをいう。

PcG タンパク質は主に 2 つの複合体 (PRC1 複合体、PRC2 複合体) を形成することが分かっている。2 つの複合体間で構成因子や作用機序が異なるものの、協調的に機能することが明らかになってきた。PRC1 複合体は Pc、Ph、Pcl、dRing、Psc、Scm、Pho、Phol からなる複合体である。もうひとつの PRC2 複合体は Esc、Su(z)12、E(z)、NURF-55、RPD3 からなる複合体である。PRC2 複合体は PcG/trxG 応答領域 (PRE/TRE) 結合タンパク質である Pho と Phol によって PRE/TRE にリクルートされ、DNA に結合する (Muller ら .2006; Schwartz *et al.*, 2007)。この複合体には RPD3 によるヒストン脱アセチル化活性、および E(z)によるヒストンメチル化活性が含まれることが明らかになっている。E(z)はヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3-K27) をメチル化するが、このメチル化された H3-K27 に、PRC1

複合体に含まれる Pc がそのクロモドメインを介して特異的に結合することが明らかになっている。それによって PRC1 複合体が結合した DNA 近傍のヒストン H3-K9 が Su(var)3-9 によってメチル化され、さらにそこに HP1 タンパク質がリクルートされ結合する。この結果、ヘテロクロマチン化が起こり、転写抑制が誘導されることが分かっている。

そして、PcG と拮抗する働きをするのが trxB である。trxB に属するほとんどの遺伝子は、Hox 遺伝子群の機能を欠損した表現系を示すが、実際には Pc の表現型を抑制する変異から同定された因子群である。

trxB タンパク質も PcG タンパク質と同様に複合体として存在している因子があると言われているが、その複合体を形成しているとされるサブユニットの完全な同定までには至っていない。このグループの遺伝子産物は主としてクロマチンのリモデリングおよび化学修飾を介して Hox 遺伝子群の転写活性化の維持に働く。ただし、trxB 間の相互関係がどのようになっているかはあまり明らかになっていない。

PcG タンパク質と trxB タンパク質に共通する特徴として、一部のタンパク質にヒストンに対するメチル化活性が存在することがある。そして、それはタンパク質内にある SET ドメインが活性中心になっていることが示唆されている。ヒストンメチル化活性はそのターゲット特異性が厳密であり、複数のヒストン残基を同一のタンパク質がメチル化するのはまれであると考えられている。また、ヒストンのどの残基が修飾されるかによって下流の生物学的機能が全く異なる点も合わせて考えると、分子レベルから派生し細胞・生物個体レベルにおいて多様な現象がメチル化酵素ひとつの働きによって生み出されることはとても興味深いことである。そして、同じヒストンメチル化という活性が存在するにもかかわらず、PcG と trxB 間で拮抗する機能が存在することも、とても興味深い事象である。

また、近年の研究報告から、PcG/trxB タンパク質は胚発生期における転写制御ならびにホメオティック変異の誘導にとどまらず、細胞増殖 (Martinez *et al.*, 2006) や、幹細胞同一性 (Sparmann *et al.*, 2006)、さらに植物や哺乳動物におけるゲノムインプリンティング (Delaval *et al.*, 2004) や X 染色体の不活化 (Heard, 2005) にも関連があるということが示

唆されている。

1-7 本研究の目的

転写制御因子とは転写反応の開始、伸長、終結段階にある RNAP II に直接働きかける因子だけにとどまらない。ヒストン翻訳後修飾に関わる因子や、転写反応の鋳型である DNA をメチル化する因子、さらにはクロマチン構造変換に関わる因子などさまざまな機能を持った因子の総称が転写制御因子であり、これらが複雑かつ体系的に活躍することによって、転写制御という結果が生み出されている。すなわち、転写制御を本質的に理解するためにはこれらの因子によって作られる転写制御ネットワークの網羅的な解明が重要になってくる。

そこで私はこの転写制御に関わる因子の中から、3つの因子に着目して研究を行うこととした。

ヒストン翻訳後修飾に関わり、マウスの Hox 遺伝子群の転写制御を担う ASH1L (Absent, Small or Homeotic discs 1 -Like)。RNAP II に直接結合して転写伸長段階の調節を行う DSIF。DSIF と協調し転写伸長を阻害する NELF である。これらについてそれぞれ独立した研究テーマを立ち上げ、*in vivo* における各因子の機能を解明することを本研究の目的とした。

1-8 図表

	RNAポリメラーゼ I (RNAP I)	RNAポリメラーゼ II (RNAP II)	RNAポリメラーゼ III (RNAP III)
サブユニット数	14	12	16
標的遺伝子数	1 (5.8S、18S、28S rRNA)	約30,000 (タンパク質をコードした遺伝子)	100以上 (tRNAs、5S rRNA、 small RNAs)
特徴	rRNAの合成	mRNAの合成 最大サブユニットに繰り返し配列 のCTDドメインを持つ	tRNA、rRNA、 small RNAsの合成

表 1-1 真核生物のRNAポリメラーゼ

真核生物はRNAP I、RNAP II、RNAP IIIと呼ばれる三種類のRNAポリメラーゼが存在する。これらのポリメラーゼは12-16のサブユニットからなり、rRNA、mRNA、tRNA、smallRNAを合成する。RNAP IIの最大サブユニットであるRpb1のC末端側には、CTDと呼ばれる7アミノ酸の繰り返し配列 (YSPTSPS) が存在する。

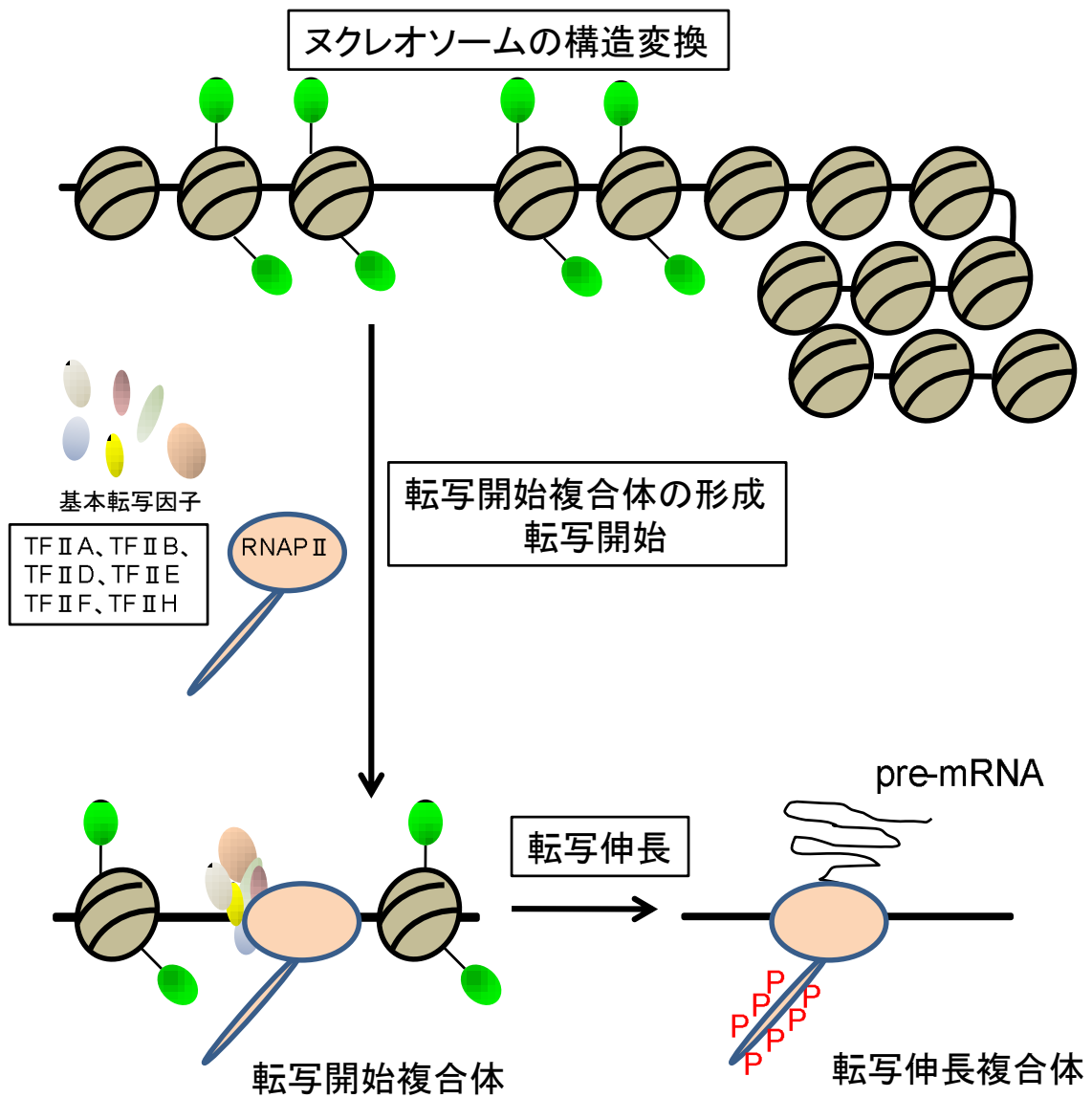


図 1-1 真核生物の転写制御機構

真核生物の転写反応は様々な段階で制御されている。ヌクレオソームの構造変換が行われ、RNAP II が基本転写因子の働きによってDNAのプロモーター領域へリクルートされる。そこで転写開始複合体が形成され転写伸長段階へと移行される。

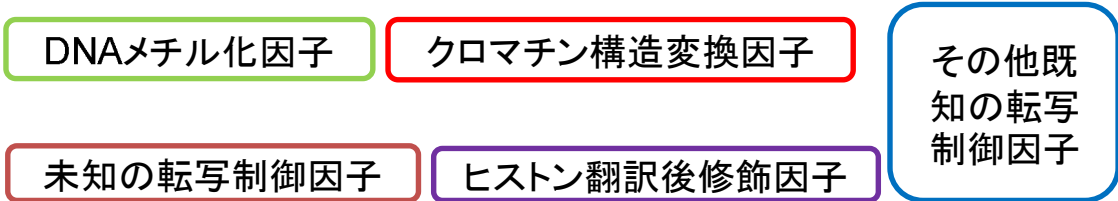
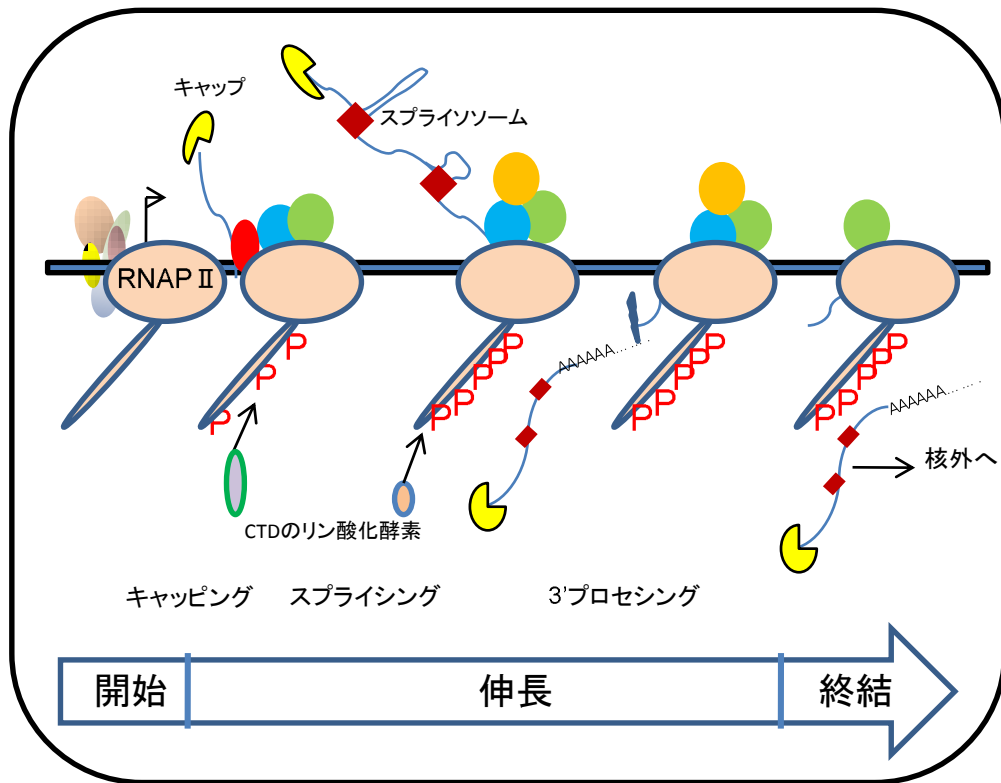


図 1-2 真核生物の転写伸長制御および転写制御因子

転写段階は大きく分けて、開始、伸長、終結の3つの段階に分けられる。伸長段階においては、RNAP II が転写している際に、キャッピング、スプライシング、3'プロセッシングといったmRNAのプロセッシング反応が共役して起きるとされている。完成されたmRNAは核外に移行され、リボソームで翻訳される。これらの反応はRNAP II やmRNAに働きかける因子だけでなく、ヒストン翻訳後修飾因子などのさまざまな転写制御因子によって複雑に制御されている。

転写伸長因子	サブユニット	機能
TF II F	RAP30、RAP74	伸長促進、基本転写因子
Elongin/SIII	A、B、C	伸長促進
ELL		伸長促進
Tat-SF1		伸長促進
P-TEFb	Cdk9、CyclinT1	伸長抑制の解除、タンパク質リン酸化
DSIF	Spt4、Spt5	伸長促進、伸長一時停止の誘導、 mRNAプロセッシング
NELF	A、B、C/D、E	伸長一時停止の誘導、 mRNAプロセッシング
Elongator	Elp1、Elp2、Elp3	伸長促進、ヌクレオソームと相互作用、 ヒストン翻訳後修飾に関与
Paf1複合体	Paf1、Ctr9、Cdc73、 Leo1、Ski8	伸長促進、ヒストン翻訳後修飾に関与
FACT	Spt16、SSRP1	伸長促進、ヌクレオソームと相互作用
Spt6		伸長促進、ヌクレオソームと相互作用
TF II S/S II		アレストの解除、転写忠実度の上昇、 ヌクレオソームと相互作用

表 1-2 ヒトRNAP II の転写伸長因子群

DSIFならびにNELFのみ転写伸長の抑制に関わる因子であり、その他は伸長促進の方向に制御する因子である。

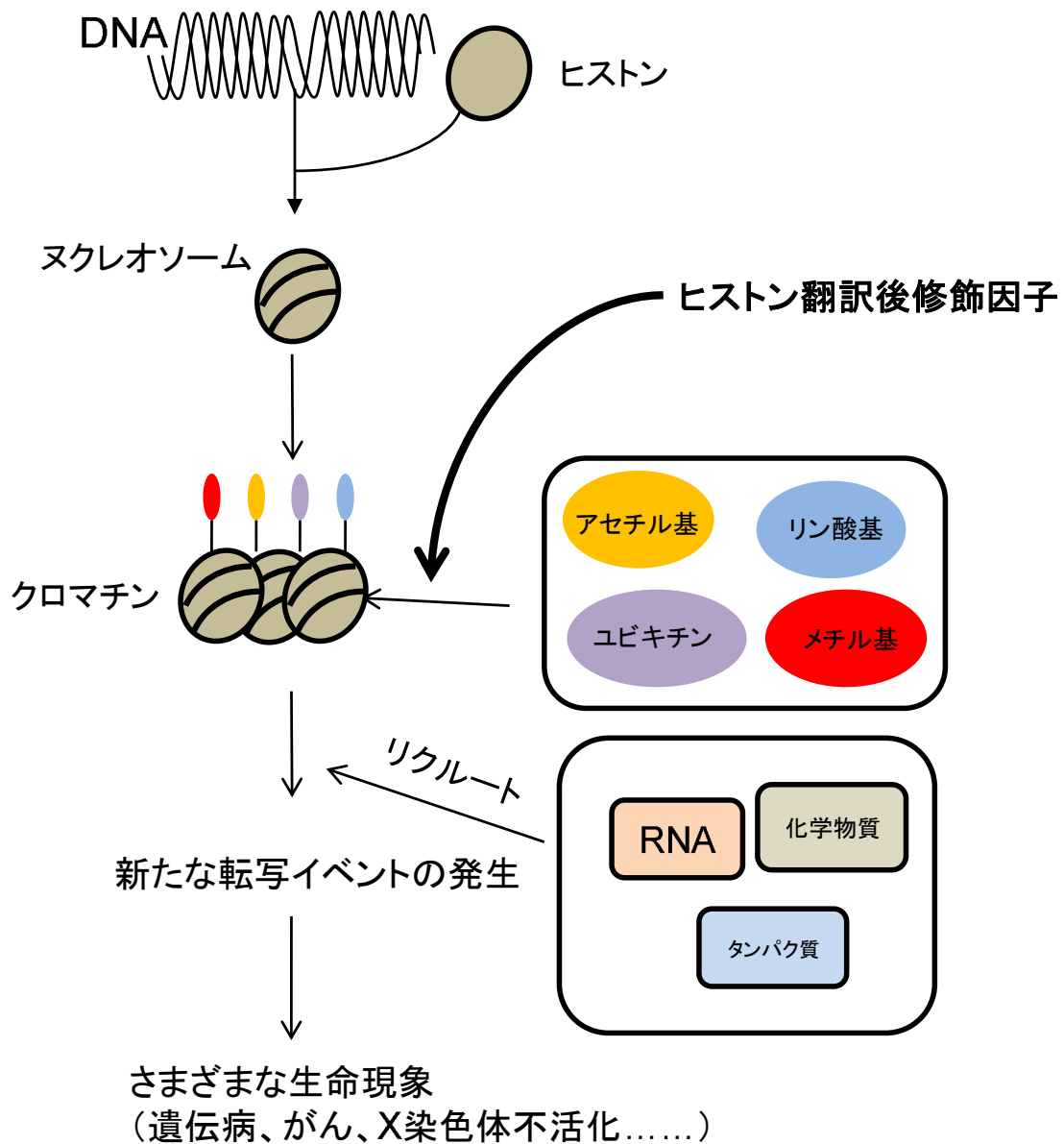
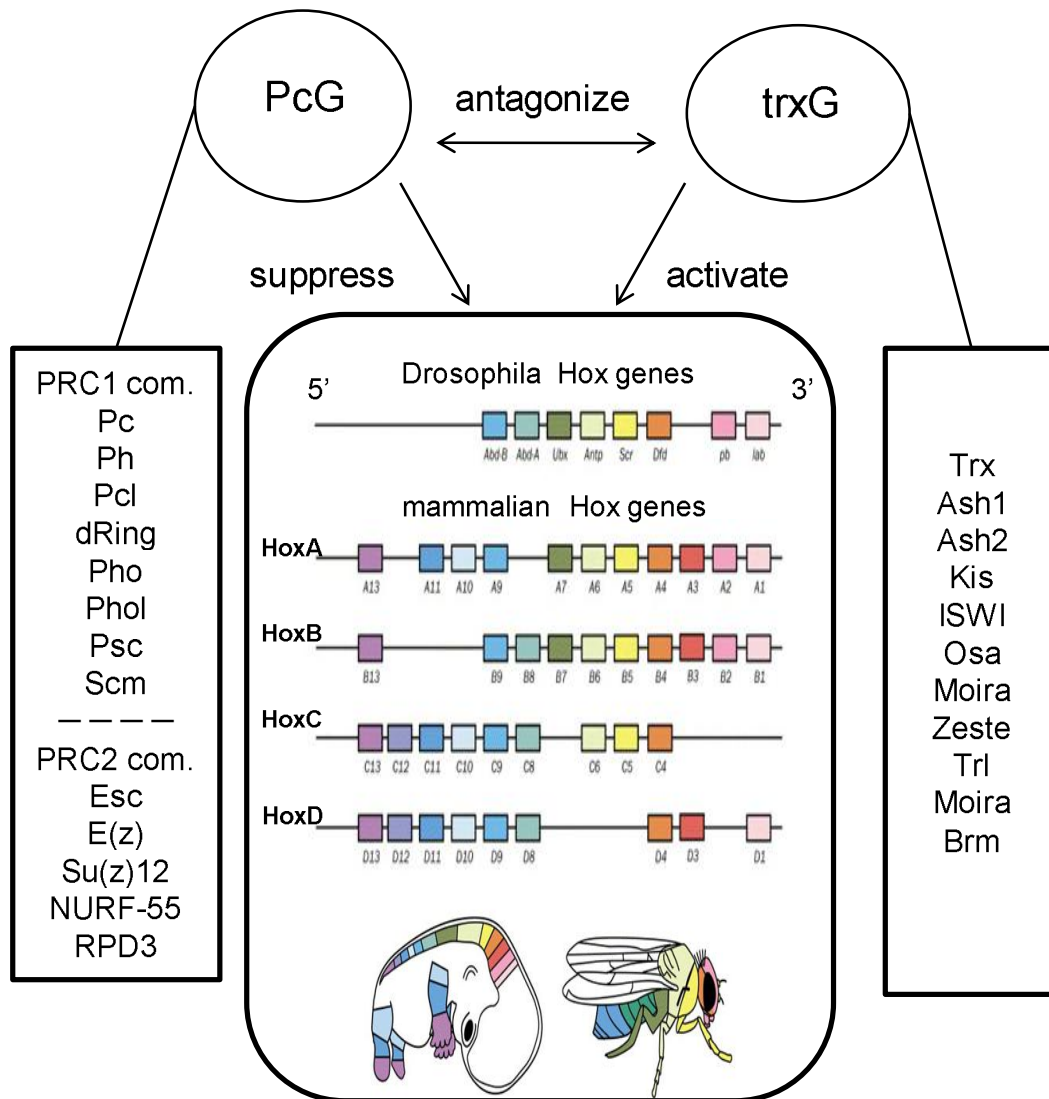


図 1-3 ヒストン翻訳後修飾因子

クロマチンはDNAとヒストン八量体ならびにリンカーヒストンH1から構成されるヌクレオソームを基本単位とした構造体である。このヒストンのアミノ酸残基が様々なヒストン翻訳後修飾因子によってアセチル化やリン酸化、ユビキチン化、そしてメチル化される。この付加された修飾特異的にリクルートされる物質によって、新たな転写イベントが発生する。



THE LANCET Vol362 2003

図 1-4 ポリコム遺伝子群(PcG)とトリソラックス遺伝子群(trxG)
PcGとtrxGは初期発生において生体の前後軸ならびに体幹の領域・組織決定に深く関わるHox遺伝子群の転写制御因子である。PcGはPRC1とPRC2という2つの複合体を形成して機能している。PcGとtrxGは拮抗する形でHox遺伝子群の転写制御を行っており、PcGは転写抑制、trxGは転写活性状態の維持をする機能を担っている。ショウジョウバエのHox遺伝子群は1つのクラスター、マウス・ヒトの場合は4つのクラスターによって構成されている。

第2章 ASH1L 変異マウスの解析

2-1 緒言

ショウジョウバエ *ash1* はその遺伝学的解析から Hox 遺伝子群の転写制御因子である *Pc* 遺伝子の機能低下に拮抗する遺伝子として同定された (Tripoulas *et al.*, 1994; Tripoulas *et al.*, 1996)。また、*ash1* は *trxG* の重要な遺伝子である *trx* と遺伝学的相互作用し、*trx* によるホメオティック変異の表現型を助長することが示されている (Rozovskaia *et al.*, 1999)。ゆえに、*ash1* は *trxG* に属する Hox 遺伝子群の転写制御因子であると考えられている。また、唾腺染色体上では多くの遺伝子座で Ash1 タンパク質と Trx タンパク質とが共局在し、かつ *ash1* 変異体においては、Trx タンパク質のクロマチン上への局在が野生型のものに比べて変化することが示唆されている (Rozovskaia *et al.*, 1999)。さらに、ショウジョウバエの成虫原基を使った解析によると、転写が活発な状態にある遺伝子のコード領域に Ash1 タンパク質は多く分布していることが示唆されている (Rozovskaia *et al.*, 1999)。また、ショウジョウバエ Hox 遺伝子群を構成する *Ubx* 遺伝子のプロモーター近傍に Ash1 タンパク質は局在し、トリメチル化された H3-K4 と共局在していることが示唆されている (Papp *et al.*, 2006)。これは *Ubx* 遺伝子の転写状態が活発なときに特異的に見られる現象である。転写伸長因子であるショウジョウバエ Spt5 も同様に局在していることから、Ash1 が Spt5 と相互作用してプロモーター近傍における転写伸長制御に関与しているということが示唆されている (Schuettengruber *et al.*, 2007)。

マウス ASH1L はショウジョウバエ Ash1 のマウスホモログである (Nakamura *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2007)。細胞レベルでの解析から、ASH1L は Hox 遺伝子群のいくつかの遺伝子上に局在していることが示唆されている (Gregory *et al.*, 2007)。

前述のように、いくつかの PcG/trxG タンパク質には SET ドメインと呼ばれる共通のドメインを持っていることが知られており、ショウジョウバエ Ash1 とマウス ASH1L にも SET ドメインが存在している (Nakamura *et al.*,

2000; Tripoulas *et al.*, 1996) (図 2-1)。そして、その SET ドメインがあるため、Ash1 ならびに ASH1L タンパク質にヒストンメチル化活性があるという仮定の上でこれまで研究が行われてきた。その結果、複数の研究グループが Ash1 ならびに ASH1L が有するヒストンメチル化活性のターゲットを明らかにしているが、これらの解析結果の間で矛盾が生じているのが実状である。Beisel らのグループは 2002 年に初めて Ash1 にヒストンメチル化活性が存在することを示し、そのターゲットがヒストン H3-K4、H3-K9、H4-K20 であると *in vitro* 系および *in vivo* 系の研究により証明した (Beisel *et al.*, 2002)。しかし、Byrd らのグループは 2003 年に *ash1* 変異体のショウジョウバエを使った実験から、Ash1 タンパク質の SET ドメインは *in vitro* ではヒストン H3-K4 のみをメチル化し、*in vivo* でもヒストン H3-K4 のメチル化にのみ Ash1 タンパク質が関与することを示した (Byrd *et al.*, 2003)。その後、この結果を支持するかのように、ヒト由来の培養細胞内では ASH1L タンパク質がヒストン H3-K4 のみメチル化するという報告が出たため (Gregory *et al.*, 2007)、Ash1 ならびに ASH1L のメチル化活性のターゲットはヒストン H3-K4 だけであるということが世界的にコンセンサスな認識となりかけていた。しかし、さらに新たな研究グループの報告から、Ash1 ならびに ASH1L タンパク質の SET ドメインはヒストン H3-K36 のみをメチル化するということが *in vitro* 系の研究から示唆された (Tanaka *et al.*, 2007)。このヒストン H3-K36 が Ash1 ならびに ASH1L タンパク質によってメチル化されるという結果は、SET ドメインを持つ複数のタンパク質間におけるホモロジー解析の結果からも支持される。それは、Ash1 ならびに ASH1L タンパク質の SET ドメインが NSD1 や Set2 といったタンパク質の SET ドメインに高いホモロジーを示しており、NSD1 と Set2 はヒストン H3-K36 をメチル化するタンパク質であることが報告されていることから裏付けられる。(Glaser *et al.*, 2006)。

以上の観点から、ASH1L タンパク質の SET ドメインに *in vitro* でヒストンメチル化活性があることは現在の世界における共通認識であることに疑いの余地はない。しかし、そのメチル化ターゲットについては明確な結果は得られていない。

それでは *in vivo* で、特に個体レベルで ASH1L のヒストンメチル化活性はどのような生理学的意義があるのだろうか。そもそも、生体内で ASH1L によるメチル化は行われているのだろうか。そして、Hox 遺伝子群の発現制御にどのように関わっているのだろうか。これらの疑問については ASH1L の機能解析そのものがあまり行われていないことから、答えはこれまでなかった。

マウスやヒト由来の培養細胞の系にて ASH1L が Hox 遺伝子群の特異的な遺伝子の発現制御に関与する報告はあるが (Gregory *et al.*, 2007)、単一の細胞株を使った Hox 遺伝子群の解析が、そのまま個体の Hox 遺伝子群の発現制御に関わる ASH1L の機能解明につながるには考えにくい。また、ショウジョウバエの個体を用いた Ash1 の機能解析がマウスやヒトの ASH1L の機能解析より先行している。ショウジョウバエ Ash1 の解析からも多少は ASH1L の機能のヒントは得られるかもしれない。しかし、ASH1L は Ash1 の構造にさらに特徴的なドメインが付加された構造をとっているため、ショウジョウバエ Ash1 よりも複雑で多岐にわたる機能を持っている可能性がある。そのため、個体レベルでの ASH1L の機能解析は哺乳動物の Hox 遺伝子群の発現制御と表現型との関連を解析する上でも不可欠なことである。

そこで、私は国立遺伝学研究所の廣瀬進研究室との共同研究として、マウス個体を用いた ASH1L の解析を行うことにした。まず *ash11* ノックアウトマウスを作製し解析することを考えたが、ショウジョウバエ *ash1* のヌル変異体は胚性致死を示すことから (Tripoulas *et al.*, 1996)、マウスのヌル変異体も同様の表現型が見られるのではないかと考えた。ヌル変異体が結果として致死の可能性があっても、どのステージまで生きるかによってその研究のゴール地点の設定や解析の方法をある程度決定することはできる。しかし、ホメオティック変異を個体レベルで解析するとき、生後のマウスの骨形成パターンを観察することが必要であると考えたため、ホメオティック変異は起こすが致死にならないマウスを作製することが望ましいと考えた。そこで *ash11* のアレル特異的な変異マウスを作製することを理想とした。そして、ASH1L のメチル化活性についても解析し、ASH1L がつかさどるホメオティック変異とメチル化活性との関係を解明しようと考えた。以上のことから、

SET ドメイン以外のドメインによる間接的な影響を除き、純粹に ASH1L のメチル化活性の役割を解明するため、内在性全長 ASH1L に代わり、SET ドメインを欠損した変異 ASH1L を発現するマウスを作製することに決めた。そして、ASH1L のメチル化活性とマウスの発生に関わる機能の解明を本研究の目的とした。

2-2 材料と方法

2-2-1 プラスミドの構築

ash11 SET ドメイン欠損マウス(*ash11*ΔSET マウス)を作製するため、胚性幹細胞 (ES 細胞) に導入する DNA コンストラクトを作製した (図 2-2)。*ash11* の DNA は *Mus musculus* BAC clone RP24-394C15 from chromosome 3 (かずさ DNA 研究所 中山学博士から分与) に含まれる配列である。この BAC クローンから *ash11* の全配列を、分割した状態で pT7 ベクターにサブクローニングした。*ash11*ΔSET マウスを作製するにあたって、私は Cre/loxP システムを採用した。これは、loxP 配列という特徴的な DNA 配列に挟まれた DNA 配列を、Cre recombinase の作用により欠損させることができるシステムである。そのため、Cre recombinase を発現しているマウスと交配したときに初めて *ash11* SET ドメインの欠損ができるマウスの作製を目指した。具体的には、ploxFNFDTS-SS ベクター (国立遺伝学研究所 小出剛博士から分与) を用いて、*ash11*SET ドメインに相応する exon10,11 領域、phospho glycerate kinase promoter 制御下で発現する Neomycin (NEO) phosphotransferase 配列、そして FRT 配列を loxP 配列で挟み、その両側に相同組換えを起こすための *ash11* DNA シークエンスを配置したプラスミドを作製した。このプラスミドを制限酵素 Xho I -EcoR I で処理して直線化し、精製した後のサンプルを ES 細胞への遺伝子導入用ターゲティングベクターとした。

2-2-2 ノーザンブロッティング

図 2-3 にある組織別の *ash11* の発現プロファイリングは、ノーザンブロッティング法で行った。RNA サンプルは FirstChoice Mouse Total RNA (assorted) (Ambion, AM7800) をそれぞれ 5μg ずつ使用し、アガロースゲル電気泳動を行った。それを Hybond-N+メンブレン (GE healthcare

bioscience) に転写させた。このメンブレンと RNA プローブを反応させた後、さらに anti-DIG (HRP) 抗体 (Roche) を反応させてシグナルを検出した。RNA プローブは、pT7 ベクターに *ash1l* の 3'UTR 配列 (RIKEN FANTOM Consortium から入手) をサブクローニングし、この配列を鋳型にして DIG RNA ラベリングキット (SP6/T7) (Roche Applied Science, 1175025) を使って作製した。

2-2-3 フィーダー細胞の作製

この項の操作は共同研究者に行っていた。

フィーダー細胞は 129sv マウスと B6 マウスを交配し、その F1 世代である E14.5 日胚を 0.05% トリプシンを添加した DMEM 培地 (10% fetal calf serum (FCS) 含有) 内でよくクラッシュした後、その培養上清を線維芽細胞株 (mouse embryonic fibroblast : MEF) とした。この MEF はプライマリー細胞としてストックした。このプライマリー細胞を mitomycin C 処理した細胞をフィーダー細胞として使用した。同時に NEO 耐性をとるフィーダー細胞 (理化学研究所 古関明彦博士から分与) を使用した。

2-2-4 ターゲッティングベクターの ES 細胞への導入

この項の操作は共同研究者に行っていた。

遺伝子導入する ES 細胞は 129sv マウス (国立遺伝学研究所) と C57BL/6J マウス (B6 マウス) (国立遺伝学研究所) を掛け合わせた F1 世代の 3.5 日胚の胚盤胞から採取し、ES 培地 (1xDMEM, 20% FCS, 100 μ M 2-メルカプトエタノール, 1,000 unit/ml Leukemia inhibitory factor, ピルビン酸ナトリウム) で満たし、フィーダー細胞を敷いた ϕ 100mm ディッシュ (IWAKI) 上で培養した。これを ES 細胞とした。

ES 細胞を含んだ培養液とターゲッティングベクターをキュベット内で混

ぜてよく分散させた後、エレクトロポレーション法で ES 細胞にターゲット
ィングベクターを導入した。このエレクトロポレーション後の混合液を、
ES 培地で満たして NEO 耐性フィーダー細胞を敷いた 6well プレート
(IWAKI) に再び播き、培養を続けた。

2-2-5 遺伝子導入された ES 細胞の選択

ES 細胞の培養中、ES 培地は毎日交換した。遺伝子導入後 2 日目からは
200 µg/ml 濃度の G418 (Nacalai) で NEO 耐性の ES 細胞を選択した。14
日目に NEO 耐性株のコロニーを一個ずつ採取し、それぞれを 1.5ml エッペ
ンドルフチューブ内で ES 培地中によく分散させた後、200 µg/ml 濃度の
G418 の入った ES 培地を満たし、NEO 耐性フィーダー細胞を敷いた 24well
プレート (IWAKI) にコロニー由来の細胞を新たに播くと同時に、一部を
ゲノム DNA 抽出用に 1.5ml エッペンドルフチューブに移した。

エッペンドルフチューブに移した ES 細胞からゲノム DNA 抽出し、これ
を鋳型に PCR を行った。そのときに使用したプライマーセットは以下のと
おりである。

Forward primer; (5'→3') gagtcaggcagatctcacaagtttcag

Reverse primer; (5'→3') ctgcagagcatgagagatggtgggc

PCR 産物をアガロースゲルに泳動し、UV イルミネーター (TOYOBO)
で写真撮影した。この PCR 解析によりゲノム上に目的の DNA 配列が組み
込まれたポジティブクローンを選択した。PCR によるシーケンスの確認
も合わせて行った。そして、そのポジティブクローンの ES 細胞を *ash11*/SET
ドメインコンディショナル欠損マウス (floxed-SET マウス) 作製に使用し
た。

2-2-6 floxed-SET マウスならびに *ash1*/ΔSET マウスの作製

この操作は共同研究者に行っていた。

前項で得られたポジティブクローンの ES 細胞を、採取した胚盤胞に注入し、それを受精後 2.5 日の偽妊娠した雌の B6 マウスの子宮内に移植し、飼育した。そこから得られた F1 世代のキメラマウスの毛色からキメラ率の一番良い同腹の雄マウスを選び、それらを別々に雌の B6 マウスと交配させた。その後 NEO 耐性遺伝子を検出する genomic PCR でジャームライントランスミッションの確認を行い、ヘテロ接合体の floxed-SET アレルを持ったマウス (hetero floxed-SET マウス) を作製した。*ash1* の SET ドメインを欠損したマウス (ΔSET マウス) は、homo floxed-SET マウスと、Human cytomegalovirus immediate early enhancer and chicken beta-actin/rabbit beta-globin hybrid promoter 制御下に Cre recombinase のコード配列が挿入されたアレルを持つ B6 マウス (国立遺伝学研究所 相賀裕美子博士から分与) を交配して生まれた雌雄同士をさらに交配して作製した。

2-2-7 PCR 解析

変異アレルを持ったマウスが作製されているかどうかを確認するため、生まれた新生仔の耳を耳パンチで穴を開けて個別化した後、その耳片からゲノム DNA を採取した。このゲノム DNA を鋳型に、SET ドメイン Flanking 領域 (exon9-13) を増幅させるプライマーセットで PCR を行った。プライマーセットは 2-2-5 項と同じものを使用した。

ジャームライントランスミッションの確認も同様のプライマーセットを使用した PCR 解析により行った。

2-2-8 マウス新生仔の骨格標本の作製

B6 マウスとの交配を 6 回行い、血縁係数が 90%を超えた hetero *ash11*ΔSET マウス同士を掛け合わせ、そこから生まれたマウスの生後 3 日目の新生仔の耳片からゲノム DNA を抽出し、それを使ってジェノタイプピングすることで、変異アレルをもつマウスを同定した。そして、これらのマウスの骨格標本を以下の手順で作製した。

生後 3 日目の新生仔を炭酸ガスで安楽死させ、70% エタノールの入ったメディウム瓶に入れ、1 日室温に置き、組織を固定した。ここまでの操作は共同研究者に行っていた。その後マウスを凍結し、解凍しながら表皮、内臓、四肢を取り除き、95% エタノールの入ったメディウム瓶に入れ、1 週間室温に置き、組織を固定した。さらに、100% アセトンの入ったメディウム瓶に移し入れ、1 週間室温に置くことで脱脂をした。次に、アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色液（70% エタノール、0.03% アルシアンブルー（ストックの上清のみ使用）、0.15% アリザリンレッド（ストックの上清のみ使用）、5% 酢酸）に浸し、37°C 下に 2 週間静置して染色を行った。染色を行った標本を 70% エタノールで軽く洗浄した後、1% KOH の入ったメディウム瓶に移し入れ、1 日室温に置くことで組織の透過を行った。さらに、標本を透過液（35% エタノール、25% ベンジルアルコール、25% グリセリン）の入ったメディウム瓶に移し入れ、1 か月室温に置くことで組織の透過を行った。その後、実体顕微鏡で観察し、DSE-330-A (Olympus) で写真を撮影した。標本は 100% グリセリン中で保存した。

2-3 結果

2-3-1 *ash1*ΔSET マウスは正常に繁殖する

ASH1L の SET ドメインの機能解析をするにあたって、まず ASH1L の SET ドメインを欠損したマウスの作製を行った。ジャームライントランスミッションを確認した後、ホモ接合体の floxed-SET (homo floxed-SET) マウスと Cre recombinase をユビキタスに発現する B6 マウス (Cre マウス) を掛け合わせ、hetero *ash1*ΔSET マウスを作製した。そして、この世代の hetero *ash1*ΔSET マウス同士を交配し、homo *ash1*ΔSET マウスの繁殖が野生型マウスの繁殖に比べてどのような変化・異常が見られるか観察した。すると、分娩時期が受精後平均 18.5 日後と、野生型マウスと比較して胚にある状態の日数の異常は見られなかった。また、生まれてきたマウスのジェノタイピングを行ったところ、変異アレルの伝達もメンデル率に従い正常であった (図 2-4)。そして、その後の繁殖も正常に行われた。これより、ASH1L の SET ドメインにマウスの正常な繁殖を支持する機能がないことが示唆された。homo *ash1*ΔSET マウスが致死ではなかったため、floxed-SET マウスを継代していく必要性がなくなり、この時点から *ash1*ΔSET マウスを継代していくこととした。

2-3-2 *ash1*ΔSET マウスはホメオティック変異を起こす

次に、ASH1L が Hox 遺伝子群の発現に関与しているかを調べた。Hox 遺伝子群の発現が前後軸に沿った体の領域決定に重要であることはすでに知られていた。マウスの場合、後頭部-頸椎-胸椎-腰椎-仙椎-尾椎にかけての骨形成パターンが Hox 遺伝子群の発現に対応している。そこで私は、hetero *ash1*ΔSET マウス同士を掛け合わせ、その F1 世代の生後 3 日目の homo *ash1*ΔSET マウスならびに野生型マウスの新生仔から骨格標本作製した。そして、骨の形状を観察することにより、*ash1*ΔSET マウス特異的なホメ

オティック変異の表現型が見られるかどうか調べた。

2 系統のクローンから作製した *homo ash1/ΔSET* マウスならびに野生型マウスの骨形成パターンの変化を観察した (図 2-5)。そして、変化が見られたマウスの数の統計をとってみると、約半数の *homo ash1/ΔSET* マウスは頸椎の C2 (第 2 頸椎) 領域の骨の形が C1 (第 1 頸椎) 領域の骨の形へと変化していることが分かった (図 2-6)。つまり C2 領域から C1 領域へ前方化していることが分かった。

また、少数ではあったが頸椎の C7 (隆椎) 領域から胸椎の T1 (第 1 胸椎) 領域への後方化も見られた。野生型マウスに骨形成パターンの異常は見られなかった。

2-4 考察

本研究より、*ash1*ΔSET マウスは致死にならず正常に繁殖することが分かった。さらに、このマウスは第 2 頸椎の第 1 頸椎化、ならびに第 7 頸椎の第 1 胸椎化というホメオティック変異を引き起こすことが分かった。この結果を分子レベルの観点から裏づけするための遺伝子発現解析を現在実行中であるが、世界中で過去に出された実験データから考えると、この 2 種類の骨形成パターンの変化は、Hox 遺伝子群の *Hoxa4*, *Hoxb4*, *Hoxd4*, *Hoxa6*, *Hoxc6* 遺伝子発現の変化が起こったことに起因すると推測される (図 2-6)。

この結果はショウジョウバエ *Ash1* の解析結果と対応するところがあると考えられる。*Ash1* タンパク質は Hox 遺伝子群の *Antp*, *Scr*, *Ubx*, *Dfd* 遺伝子のシス領域に局在し、各遺伝子の活性化状態の維持に関与しているとすでに報告されている (Adamson *et al.*, 1996; Lopez *et al.*, 2001; Klymenko *et al.*, 2004; Sanchez-Elsner *et al.*, 2006)。*Ash1* と *ASH1L* のターゲット遺伝子が完全に対応しているのであれば、今回の結果から示されたターゲット遺伝子は限定的であったため、*ASH1L* がつかさどる Hox 遺伝子群の発現制御には他のドメインの役割も合わせて考える必要がある。

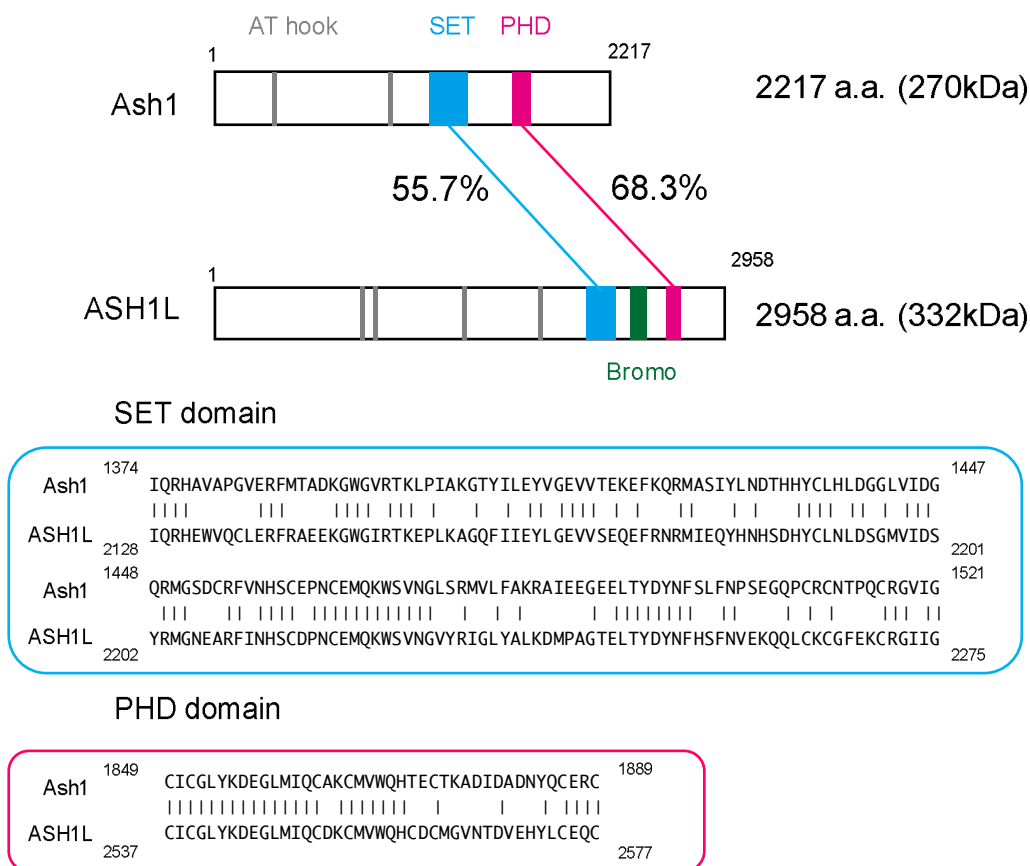
しかし、私は *Ash1* ならびに *ASH1L* のターゲット遺伝子は Hox 遺伝子群だけにとどまらず、もっと広範囲に存在すると考えている。過去のショウジョウバエの研究から *ash1* 変異体ショウジョウバエが多く単離されていることが知られているが、それぞれが違う表現型を示しており、中には胚性致死を起こす変異体も存在していることが報告されている (Tripoulas *et al.*, 1996; Beisel *et al.*, 2002)。

また近年、脳下垂体のトランスクリプトームを研究しているチームにより *ash1l* のヌル変異体マウスが作製され、そのマウスは脳の形成に障害を起こし、その結果致死してしまうという報告が学会発表でなされた (Camper *et al.*, 21th International Mammalian Genome Conference)。実際に我々が行った臓器別 *ash1l* の発現プロファイリングの結果より、脳に *ash1l* は多く発現していることが示唆されたことから (図 2-3)、脳で *ASH1L* が何か

しらの役割を果たしている可能性も考えられる。

本研究から得られた結果から、ASH1Lの欠損が脳の形成異常に関与する可能性について考察する。後頭骨の形成異常が頸椎の形成異常による間接的な影響によって発生し、それに付随して脳の形成異常をもたらすのではないかと考えられる。本研究で行った Δ SET マウスの解析により、頸椎の後頭骨に近い領域である C2 領域の骨形成パターンの変異が見られた。つまり、この変異が後頭骨の形成にも何らかの影響を及ぼし、さらには脳の形成異常が観察されたという可能性も考えられる。第 1 頸椎と第 2 頸椎の間にある環軸関節は、体軸に垂直な回転軸を形成し、頭部を回旋させる働きを持つ。*ash1*/ Δ SET マウスの観察によって見られた、第 2 頸椎の第 1 頸椎化によって、この環軸関節を回旋させる働きがなくなることで、頭部を含めた頸椎から上の部分で流動的な動きが阻害されている可能性もある。そのため脳の形成・発育に異常が生じているかもしれない。以上の考察から、Ash1 ならびに ASH1L が Hox 遺伝子群の発現制御だけにとどまらず、組織特異的な機能を持っているのではないかと考えている。また、*ash1* の SET ドメインだけを欠損させることで前述のようなホメオティック変異が見られたことを考えると、もし生体内で ASH1L にヒストンメチル化活性が本当にあるとしたら、ASH1L によるヒストンのメチル化がもたらす発生レベルでの生理学的意義は比較的大きいかもしれない。

2-5 図表



AT hook ; AT-rich DNA 結合配列

SET domain ; ヒストンリジンメチル化活性、タンパク質間相互作用配列

Bromo domain; アセチル化リジン結合配列

PHD finger; メチル化ヒストン結合配列、タンパク質間相互作用配列

図 2-1 ショウジョウバエAsh1とマウスASH1L

Ash1とASH1Lには共通のドメインが存在する。DNAとの結合活性があるAT-hook、ヒストンのリジン残基をメチル化する活性を持つと言われるSETドメイン(Ash1とASH1Lとの相同性は55.7%)、そして、メチル化ヒストンに結合する活性を持つPHD finger(Ash1とASH1Lとの相同性は68.3%)である。さらにASH1Lはアセチル化されたリジンに結合する活性を持つBromoドメインを持つ。

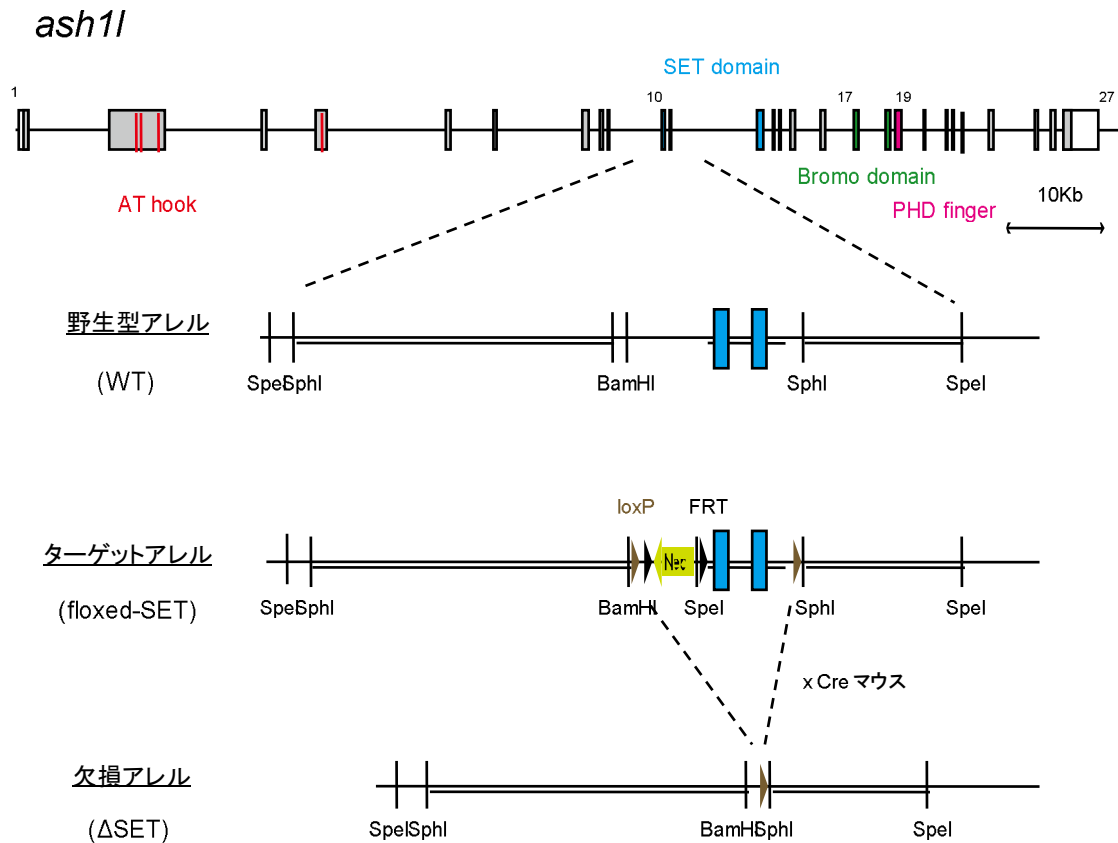


図 2-2 *ash1l* SETドメイン欠損マウスの作製

*ash1l*のSETドメインを欠損したマウスを作製するために、SETドメインをloxP配列で挟み、さらにネオマイシン耐性遺伝子(NEO)を組み込んだターゲティングベクター(floxed-SET)を作製した。このアレルを持ったマウスを作製し、Creリコンビナーゼを発現するマウスと交配することで欠損アレル(ΔSET)を創出することができる。

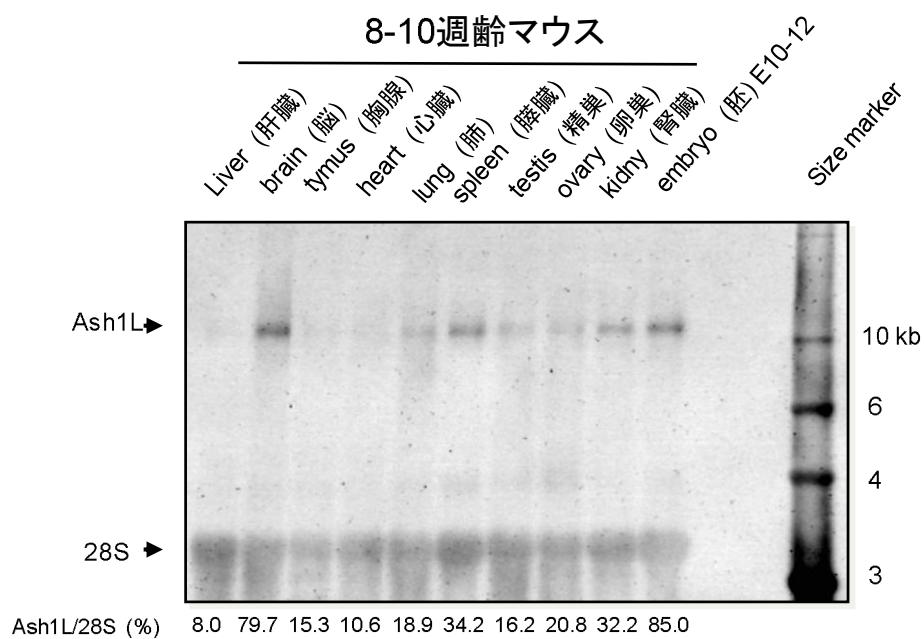
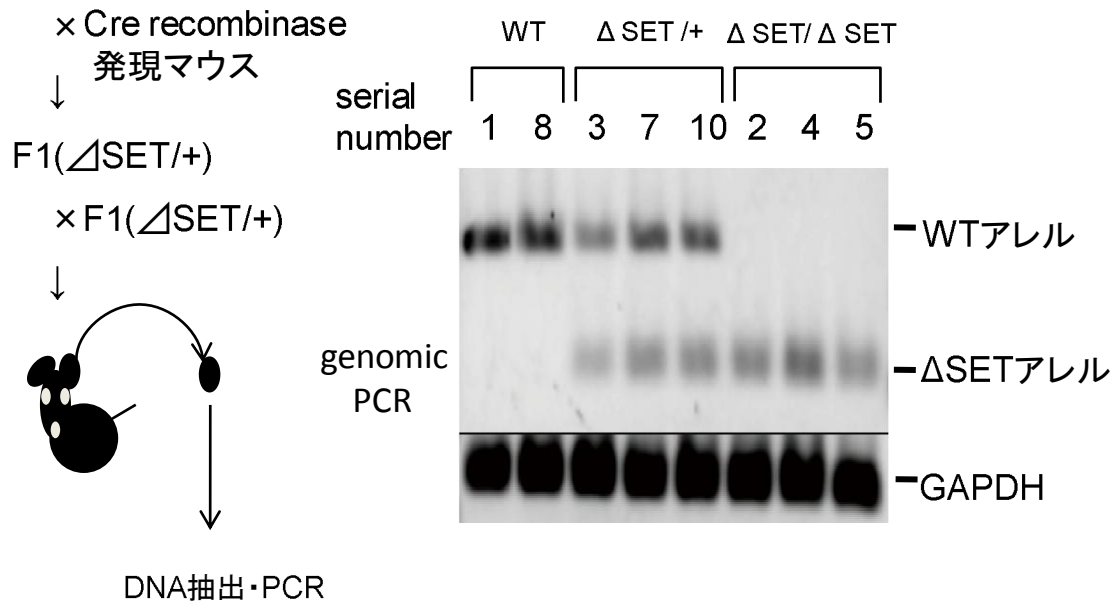


図 2-3 臓器別のASH1L発現プロファイリング

生後8-10週齢のマウスにてASH1L mRNAがどれくらい発現しているのかをノーザンブロットィング法で確認した。同時に受精後10-12日の胚における発現量も調べた。

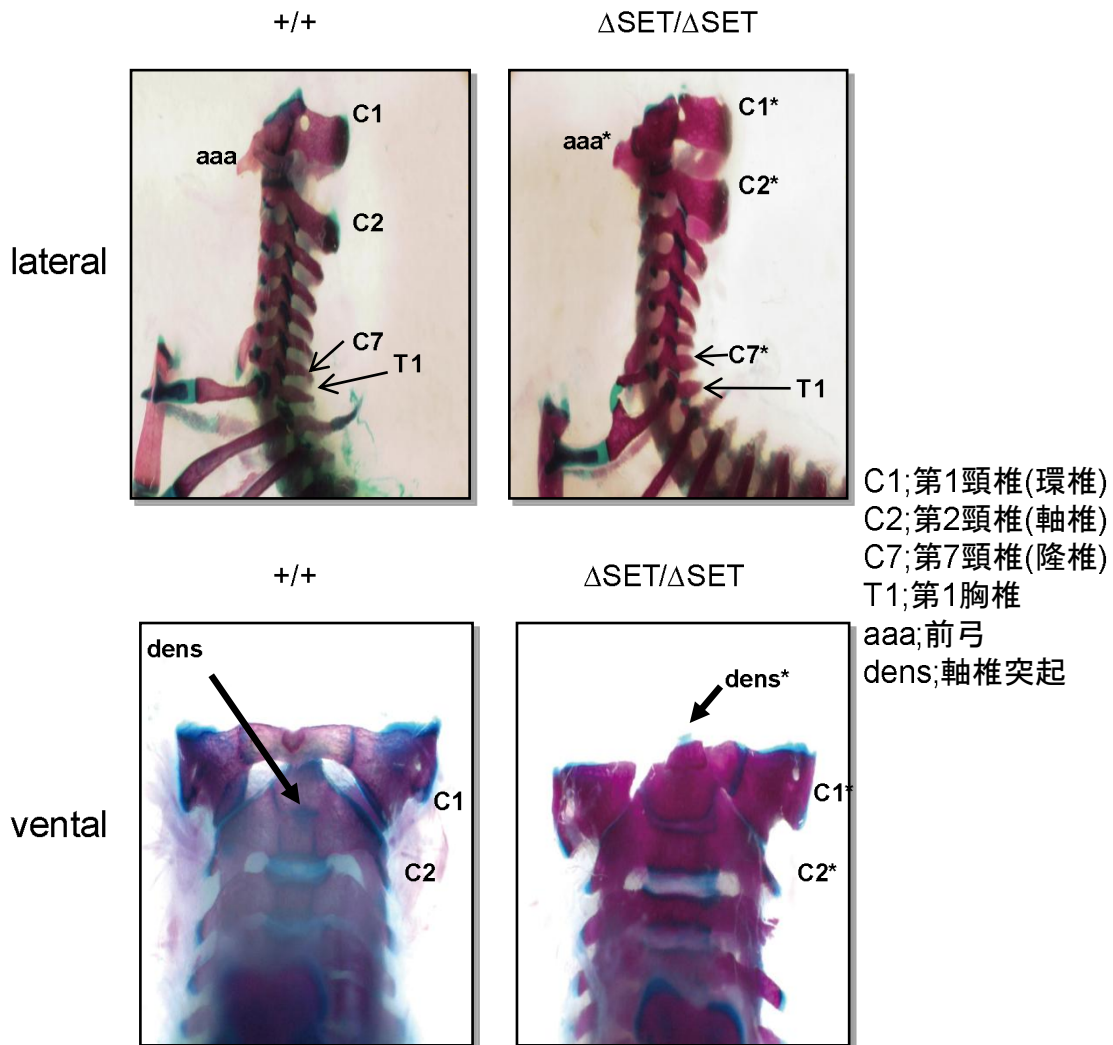
homo floxed-SET マウス



line	total (σ , ρ)	WT	Δ SET/+	Δ SET/ Δ SET
#1	39 (22,17)	7 (3,4)	24 (15,9)	8 (4,4)
#2	20 (11,9)	2 (2,0)	11(6,5)	7 (3,4)

図 2-4 homo *ash1*/ Δ SETマウスは正常に繁殖する

ジャームライトランスミッションを確認済みのhomo floxed-SETマウスとCreリコンビナーゼ発現マウスを交配し、そのF1世代同士を掛け合わせた。そこから生まれてきたマウスのジェノタイプングを行い、さらに繁殖能力の確認を行った。表は2つのクローンから生まれてきたマウスの個体数を雌雄別に計測したものである。



C1;第1頸椎(環椎)
 C2;第2頸椎(軸椎)
 C7;第7頸椎(隆椎)
 T1;第1胸椎
 aaa;前弓
 dens;軸椎突起

図 2-5 homo *ash1*/ Δ SETマウス新生仔の骨形成パターン(1)
 Δ SETマウスがホメオティック変異を起こしているかどうかを確認するため、アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色法を用いて生後3日目の新生仔から骨格標本を作製した。*はホメオティック変異を示した骨の部分を示している。

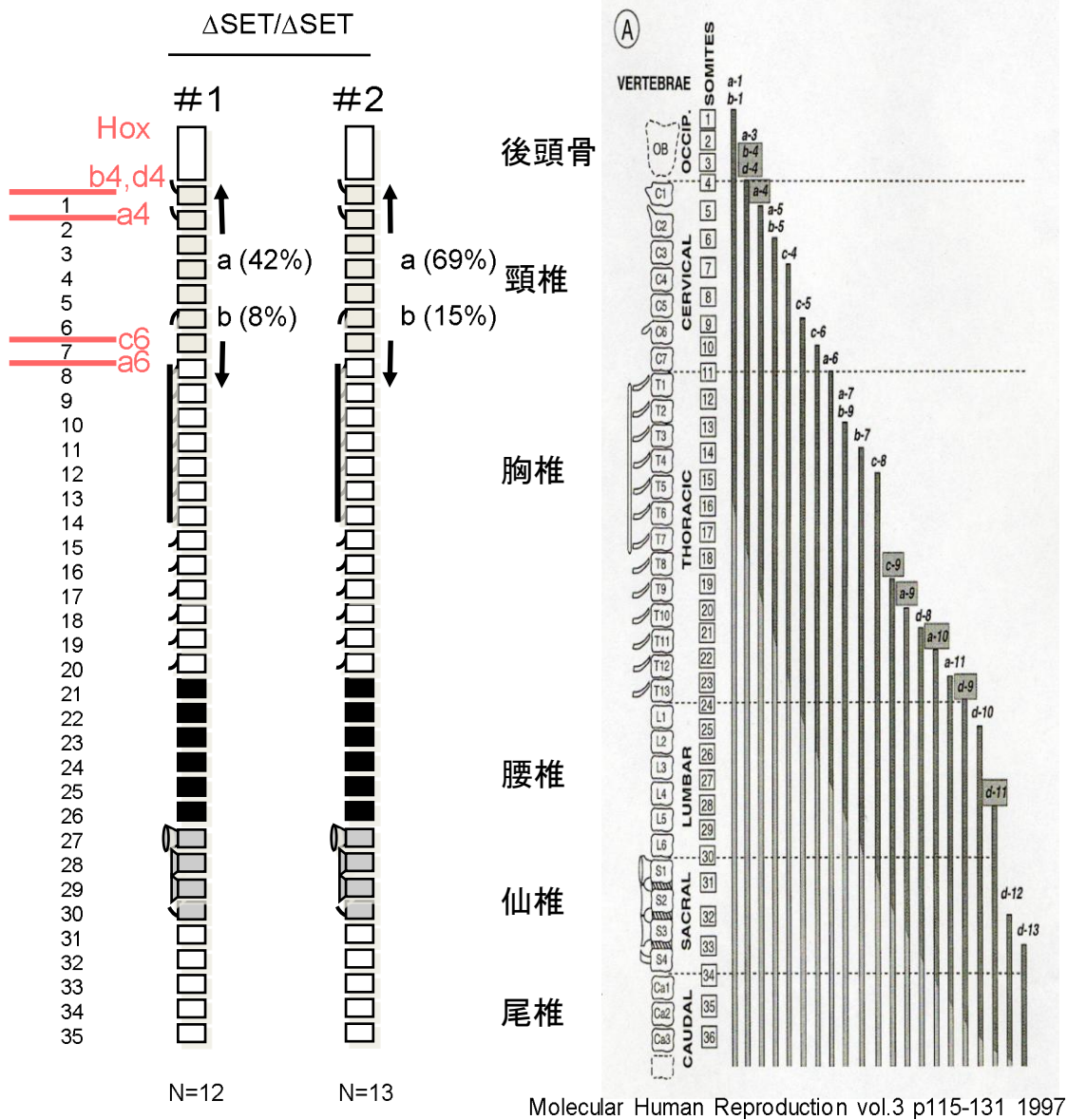


図 2-6 *homo ash1*ΔSETマウス新生仔の骨形成パターン(2)
 図2-5で見られたホメオティック変異が生じた*ash1*ΔSETマウスの統計をとった。そして、そのホメオティック変異に対応するHox遺伝子候補を右図の資料を参考にして抽出した。

第3章 Spt5 ノックダウンアプローチによる DSIF の機能解析

3-1 緒言

DSIF は進化的に広く保存され、生体内の広範囲で発現しているタンパク質である (図 3-1)。その構造はヒト Spt4、Spt5 からなるヘテロダイマーであり、真核生物の RNAP II による転写伸長反応を制御する。Spt4、Spt5 は、元来出芽酵母において主に代謝に関係する遺伝子のプロモーター領域に Ty エlement が挿入されるのを抑制する株を用いた遺伝子スクリーニングから単離・同定された因子である (Swanson *et al.*, 1991; Swanson *et al.*, 1992)。その後の生化学的解析から、ヒト Spt4、Spt5 は複合体として DSIF を形成し、転写伸長制御をすることが明らかになった (Wada *et al.*, 1998a, 1998b)。また同時期に、酵母 Spt4、Spt5 もヒトと同様に複合体を形成して転写伸長制御をすることが明らかになった (Hartzog *et al.*, 1998)。Spt5 が細菌や古細菌に見られる抗転写終結タンパク質 NusG のモチーフを含んでいることも DSIF が転写制御機能を持っていることを支持する。

さらに近年の一連の生化学的研究から、DSIF が他のタンパク質因子と協調して RNAP II による転写伸長反応を促進方向にも抑制方向にも制御することが明らかになってきた。具体的には、DSIF は転写伸長抑制因子である NELF と協調して転写開始点直後の領域で RNAP II による転写伸長をブレーキまたは一時停止させる (図 3-2)。この現象は promoter-proximal pausing という現象として知られている (Gilmour *et al.*, 1984; Yamaguchi *et al.*, 1999a; Cheng *et al.*, 2007)。promoter-proximal pausing は、転写伸長促進因子である P-TEFb が RNAP II の CTD をリン酸化して NELF が転写伸長複合体から外れることで解除される。また、P-TEFb は DSIF のサブユニットである Spt5 の CTR 領域もリン酸化することで、伸長反応を促進することが示唆されている (Ivanov *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 2006; 未発表データ)。

DSIF はその名が表すとおり、生化学的解析から転写反応阻害剤である DRB に感受して働く転写因子であると同定された (Wada *et al.*, 1998a)。DRB は P-TEFb のリン酸化活性を阻害し、それによって DSIF と NELF による転写伸長阻害活性を強調すると考えられている。DRB 含有培地で育てた培養細胞内では RNAP II による mRNA 合成が抑制されることから、これらの転写伸長因子による転写反応の抑制また抑制解除は転写サイクルにおけるチェックポイントのひとつを担っているのではないかと考えられる (Sehgal *et al.*, 1976)。実際に、3rd larvae ステージのショウジョウバエから単離された唾腺染色体の免疫染色実験より、DSIF がタンパク質をコードする多くの遺伝子上で RNAP II と共局在することが示唆されている (Andrulis *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2003)。さらに、anti-Spt5 抗体を使って、熱ショックによって発現誘導がかかるショウジョウバエ *hsp70* 遺伝子や IL-6 によって発現誘導がかかるヒト *JunB* 遺伝子のような DSIF の標的として知られている遺伝子のクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行うと、RNAP II と DSIF は遺伝子発現誘導前では転写開始点直後の領域で留まっているが、誘導をかけるとその局在が遺伝子コード領域から 3'領域にまで広がることが分かった (Aida *et al.*, 2006; Andrulis *et al.*, 2000)。つまり、発現誘導の前後に関わらず転写伸長反応中に DSIF と RNAP II は一緒に DNA 上を動いていることが示唆された。

これらの知見から、DSIF は RNAP II に結合して転写伸長制御に関与する普遍的な転写伸長因子であると位置づけられる。また、DSIF が組織または遺伝子特異的な機能を発揮しているという報告もある。近年の研究では、線虫、ショウジョウバエ、そしてゼブラフィッシュといったさまざまなモデル生物を使い、DSIF の機能が次々と解明されている (Andrulis *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2000; Keegan *et al.*, 2002; Shim *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 2004)。とりわけショウジョウバエを用いた研究によると、*spt5* 遺伝子にミスセンス変異を持つショウジョウバエでは初期発生段階における分節遺伝子であるペア・ルール遺伝子の発現に異常が見られることが示唆されている (Jennings *et al.*, 2004) (図 3-3 (A))。また、ゼブラフィッシュを用いた研究から、*SPT5* 遺伝子の点変異が視床下部でドーパ

ミン作動性ニューロンの減少やそれに付随したセロトニン作動性ニューロンの増加という神経分化の異常を引き起こすことが分かっている (Guo *et al.*, 2000) (図 3-3 (B))。これらの表現型は *SPT5* のアレル特異的に出てきたものである。*SPT5* 遺伝子ヌルのゼブラフィッシュでは、さらに程度の高い異常が見られていることが報告されている (Keegan *et al.*, 2002)。

以上の結果から、DSIF の生理学的機能が普遍的なものなのか、組織や遺伝子特異的なものなのかという疑問が生じた。

私はこの疑問を解決するために、DSIF のターゲット遺伝子の探索を行うことにした。そのためには、DSIF の機能をなくした細胞内で定常状態の時と比較して発現量に変化した遺伝子を同定すればよいと考えた。そこで、*Spt5* ノックダウンアプローチによって、細胞内における *spt5* 遺伝子の発現を後天的に抑制し、そこから得られた細胞内の転写産物を使ってさまざまな遺伝子の発現量の変化をマイクロアレイ解析によって探索し、DSIF のターゲット遺伝子候補の同定を行うことにした。

3-2 材料と方法

3-2-1 プラスミドの構築

Spt5 ノックダウン用の shRNA 発現コンストラクトをパッケージングしたレンチウイルスを作製するため、pLenti6-V5/GW/lacZ (invitrogen) を制限酵素 EcoRV 処理によって lacZ 配列を抜いたベクターに psiRNA/U6-Spt5 から U6 promoter-Spt5 shRNA オリゴを乗せ換え、pLenti6/U6-Spt5 RNAi を作製した。

p53 ノックダウン用のレンチウイルスも Spt5 と同様に、U6 promoter-p53 shRNA オリゴを乗せ換え、pLenti6/U6-p53 RNAi を作製した。

Spt5 と p53 への shRNA のターゲット配列はそれぞれ以下の通りである。

Spt5 (5'→3') ; gaactgggcgagtattacatt

p53 (5'→3') ; gactccagtggtaatctactt

Spt5 shRNA に耐性をとる Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体を発現するプラスミドは、それぞれ pLenti4/V5-GW/lacZ (invitrogen) を制限酵素 EcoRV 処理して lacZ の配列を抜いたベクターにサブクローニングした。pLenti4-Flag-Spt5 (RNAi^r) WT は pcDNA3-Flag-Spt5 (RNAi^r) WT を経由してサブクローニングした (Yamada *et al.*, 2006)。Δacidic (1-175 番目のアミノ酸欠損)、ΔSpt4BD (176-313 番目のアミノ酸欠損)、ΔKOW1/2 (314-516 番目のアミノ酸欠損)、Δrepeat (758-936 番目のアミノ酸欠損) はそれぞれ pET-14b ベクターに組み込まれているもの (Yamaguchi *et al.*, 1999b) から pcDNA3-Flag-Spt5 (RNAi^r) WT を経由して RNAi 耐性のコンストラクトを作製し、さらに pLenti4 ベクターにサブクローニングした。ΔKOW3/4 (517-758 番目のアミノ酸欠損) は pET-Spt5 (RNAi^r) WT を制限酵素 Sma I -Sma I で処理し、その DNA 断片を除去した後にフレームが合うようにセルフ・リライゲーションした (pET-Spt5 (RNAi^r) ΔKOW3/4)。

その挿入された DNA 断片を pLenti4 ベクターにサブクローニングし、pLenti4-Flag-Spt5 (RNAir) ΔKOW3/4 とした。ΔCT (937-1087 番目のアミノ酸欠損) は変異が入るように作製したプライマーを使い、PCR によって作製した。プライマーセットは以下のとおりである。

Forward primer; (5'→3') cttccgaagcttcgccttcc

Reverse primer; (5'→3') ccaagcttgaattctcagggcgacggtgtag

3-2-2 抗体

イムノブロッティング実験には以下の抗体を使用した。

anti-Flag 抗体 (Sigma, F3165)、anti-topoisomerase I (TOPO I) 抗体 (Santa Cruz, sc-10783)、anti-poly ADP-ribose polymerase (PARP) 抗体 (Affinity Bioreagents, MA3-950)、anti-p53 抗体 (Oncogene, OP03)、anti-p21 抗体 (PharMingen, 65951A)、anti-actin 抗体 (Chemicon, MAB1501)、anti-Spt5 抗体 (Wada *et al.*, 1998a)。

イムノブロッティングに使う細胞抽出液は High-salt lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1% NP-40) で調製した。PBS で洗浄した細胞を High-salt lysis buffer で懸濁した後、氷上で細胞破碎を起こした。この懸濁液を 20,000 x g、4°C 下で遠心し、その上清をイムノブロッティングに使った。

蛍光顕微鏡を使った細胞の免疫染色の観察は、4% ホルムアルデヒドを固定化した細胞を 1% TritonX-100 で透過処理し、1 次抗体に anti-Flag 抗体、2 次抗体に Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Molecular Probes, A11029) を使用した。そして、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) と共染色を行い、ORCA-ER デジタルカメラ (Hamamatsu) を搭載した BX51 fluorescence micro scope (Olympus) で観察し、写真撮影を行った。

3-2-3 細胞培養

HeLa、MCF7、293FT、IMR-90 細胞は 10% 濃度の FCS 含有の DMEM 培地で培養した。NCI-H1299 細胞（アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）から分与）は、添付された説明書通りに培養した。生細胞数計測は live cellcounting reagent SF（Nacalai）を使用し行った。しかし、Spt5 変異体による相補実験では、0.03% トリパンブルー/PBS で細胞を染色し、血球計算盤を使用して生細胞数を計測した。

培養細胞は全て 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。

3-2-4 レンチウイルスによるノックダウン実験

ターゲットの遺伝子をノックダウンするための shRNA をパッケージングしたレンチウイルスの作製には 293FT 細胞（invitrogen）を利用した。この細胞に、ViraPower packaging mix（invitrogen）と、前述の pLenti6/U6-spt5-RNAi、または pLenti6/U6-p53-RNAi をコトランスフェクションし、その 48 時間に培養上清を回収してこれをウイルス液（Spt5-RNAi ウイルス、p53-RNAi ウイルス）とした。同時に、U6 プロモーター配列のみが挿入された pLenti6/U6-control からウイルス（Control ウイルス）液を調製した。

これらのウイルス液を使って各 RNAi ウイルスを細胞内に形質導入した。

3-2-5 テトラサイクリン添加によるノックダウン実験

テトラサイクリン制御による Spt5 ノックダウン実験には HeLa/Flag-Spt5 (RNAi^r) 細胞を用いた (Yamada *et al.*, 2006)。この細胞株は、テトラサイクリンによって発現抑制のかかるプロモーターの制御下に

Flag タグを融合させた Spt5 (RNAi^r) を発現させる HeLa 細胞 (HeLa/Flag-Spt5 (RNAi^r) 細胞) である (図 3-4)。さらに、Flag-Spt5 (RNAi^r) は、shRNA のターゲット配列とは異なるが、タンパク質レベルでは内在性 Spt5 と配列が変わらないように核酸レベルで改変している (図 3-4 (*))。ゆえに、HeLa/Flag-Spt5 (RNAi^r) 細胞に Spt5-RNAi ウイルスを形質導入し、さらに 4 µg/ml blastcidin (invitrogen) によってウイルス感染陽性細胞をすることによって、内在性の Spt5 の発現を特異的に抑制できるようになっている。これにより、この細胞 (F-WT 細胞) 株は外来性 Flag-Spt5 (RNAi^r) が内在性 Spt5 に代わって発現している細胞株となっている。そして、培地にテトラサイクリンを添加することで、外来性 Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現抑制を簡便に行うことができるのが、本研究に用いたシステムである。

3-2-6 FACS による細胞周期の解析

F-WT 細胞にテトラサイクリンを添加し、添加後 0,1,2,3,4,5,6 日の細胞を回収した。回収した細胞を PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100 で懸濁した。RNase を 0.5% になるように加えた後、Propidium Iodide を 50 µg/ml になるように添加した。最後にナイロンメッシュでろ過し、FACSCalibur flow cytometer と Cell Quest software (Becton Dickinson) で測定した。

3-2-7 マイクロアレイとリアルタイム定量 PCR 解析

マイクロアレイは Affymetrix Human Genome Focus Array (Affymetrix) を使用した。

F-WT 細胞にテトラサイクリンを添加し、添加後 0 日、2 日目、4 日目の全 RNA を Sepasol I (Nacalai) を使って抽出した。この全 RNA 5 µg を使用し、Poly-A RNA control kit、One-Cycle cDNA Synthesis kit (ともに

Affymetrix) によって、ポリ A 付加された mRNA を鋳型にして逆転写反応を行い、1 本鎖 cDNA を調製し、さらにこれを鋳型にして相補する cDNA を合成し、それにより 2 本鎖 cDNA を合成した。この 2 本鎖 cDNA を sample Cleanup Module (Affymetrix) によって精製し IVT Labeling Kit (Affymetrix) によってビオチンが付加したアンチセンス cRNA を合成した。この cRNA を Sample Cleanup Module を使って精製、そして 35-200bp の cRNA に断片化した。この断片化された cRNA を Hybridization Control Kit (Affymetrix) を用いてアレイに流して相補する RNA とハイブリダイゼーションさせ、洗浄後、Streptavidin-phycoerythrin Biotinylated anti-streptavidin antibody をアレイに流した。その後洗浄しスキャンした。

アレイ解析は独立して 3 回行った。テトラサイクリン添加後 0 日目のサンプルから得られた結果をバックグラウンドとして標準化し、3 回のアレイ解析すべてにおいて、少なくとも 40 ユニットのシグナル強度と、コントロールに比べて 1.5 倍以上のシグナル強度を得られた遺伝子のみ抽出した。そして、抽出された遺伝子の 3 回のシグナルの値を平均化し、発現量の変化を数値化した。解析には dChip software (Li, C *et al.*, 2001) と L2L ツール (Newman *et al.*, 2005) を使用して行った。

リアルタイム定量 PCR 解析は、細胞から抽出し精製した全 RNA を鋳型に QuantiTest SYBR Green RT-PCR master mix (Qiagen) を使用して行なった。リアルタイム定量 PCR に使用したプライマーセットは以下のとおりである。

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>CDKN1A/p21</i>	cgccatgctcagaaccggetg	gattagggttctctcttggag
<i>MAP1LC3B</i>	atgccgtcggagaagaccttc	tttcatcccgaacgtctctctg
<i>NXF1</i>	cctgctagcaattcagggcta	tcacttcatgaatgccacttc
<i>DDB2</i>	gcagaagatgtgactcagactgc	ccaatccctttgatgaagggtggg
<i>HIST2H2AA3</i>	tgctgggcaaagtcaccatcg	gctccaggttcgctattcacta
<i>TRIM16</i>	atggtggcctgacctgcaaagg	ccagatctacaatccggatggc
<i>SF3B3</i>	cttgacagaagaccacgctgatc	ctcgagtttcttggacacttcg

<i>CCNA2</i>	cagcagcctgcaaactgcaaag	cagatttagtgtctctgggtggg
<i>RCC1</i>	actaccatcagcttggaactcc	tgtttgcccatcatctccacag
<i>ATF4</i>	tggcatctgtatgagcccagag	gtactggatctccttggccag

3-2-8 Spt5 変異体による構造活性相関解析

前述した RNAi 耐性を持つ Spt5 変異体をレンチウイルス発現システムによって細胞内で発現させるため、pLenti4/Flag-Spt5(RNAi^r)ならびにコントロールプラスミド (pLenti4/CMV-promoter) から 3-2-4 項と同様の操作でレンチウイルス液を調製した。このウイルス液を HeLa 細胞に感染させて形質導入させた。そして、感染 72 時間後から 75 µg/ml zeocin (invitrogen) 含有培地で 2 週間、感染陽性細胞の選択を行った。細胞培地は 3 日に 1 回交換した。2 週間後に生き残った細胞を継代してさらに増殖させ、6 well plate (IWAKI) に 5x10⁴ 個の細胞を播きなおし、一晩かけてプレートに設置させた。その後コントロールウイルスならびに Spt5-RNAi ウイルス感染させ (Day0)、24 時間後 (Day1) に培地交換し、さらに 24 時間後 (Day2) に継代した細胞を、新たに 5x10⁴ 個ずつ φ35mm ディッシュ (IWAKI) 播いた。そして、この時間から 1 µg/ml blastcidin と 75 µg/ml zeocin で選択をかけながら培養した。Day3,5,7,9 に細胞を回収し生細胞数を計測した。

3-3 結果

3-3-1 Spt5 は細胞増殖に必須である

当研究室では以前、ヒト子宮頸癌細胞である HeLa 細胞を使ってテトラサイクリン誘導型の Spt5 ノックダウンシステムを用いた細胞株を樹立した経緯がある (Yamada *et al.*, 2006)。

そこでまず、F-WT 細胞に 2 µg/ml テトラサイクリンで外来性 Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現誘導をかけ、その後の Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現抑制効果を時間を追って調べた (図 3-5)。Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現は、誘導開始 1 日目ですでにかなりの程度まで抑制されており、誘導開始 3 日目には 5%以下のレベルまで抑制されていた。内在性の Spt5 をノックダウンさせていない HeLa/Flag-Spt5 (RNAi^r) 細胞でも同様の実験を行ったところ、内在性 Spt5 はノックダウンされず、テトラサイクリンによる発現誘導により外来性 Flag-Spt5 (RNAi^r) がノックダウンされることから、全 Spt5 のタンパク質レベルが低下している結果となった。テトラサイクリン無添加の F-WT 細胞では、外来性 Flag-Spt5 (RNAi^r) タンパク質のみが蓄積されていた。そして、F-WT 細胞にテトラサイクリンを添加することによって、全体の Spt5 タンパク質レベルが著しく低下することがわかった。

さらに細胞増殖を観察すると、HeLa/Flag-Spt5 (RNAi^r) 細胞ではテトラサイクリン添加の有無に関わらず、増殖は正常に行われた。また、F-WT 細胞はテトラサイクリンを添加していないと正常な増殖することが観察された。これは Flag-Spt5 (RNAi^r) が内在性 Spt5 のノックダウンによる効果を相補する結果を示唆している。しかし、テトラサイクリンを添加した F-WT 細胞は、内在性ならびに外来性の Spt5 がともにノックダウンされた状態になり、添加後 5 日目には明らかな増殖遅延が見られ、最終的には完全に死んでしまった。この結果、Spt5 が 1 細胞単位で細胞増殖に必須であるということが示唆された。

次に、細胞培地中のテトラサイクリン濃度を変化させて、細胞増殖に必要な Flag-Spt5 (RNAi^r) タンパク質レベルを調べることにした (図 3-6)。前

述の実験は 2 μ g/ml 濃度のテトラサイクリン存在下で行っていたが、16 ng/ml 濃度であっても Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現と細胞増殖に抑制がかかった。しかし、3 ng/ml 濃度では Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現には細胞増殖に明らかな変化が見られなかった。細胞増殖に影響するテトラサイクリンの最低濃度の確定はできなかったが、これらの結果は Spt5 の発現レベルと細胞増殖との関係を示すものとなった。

さらに、Flag-Spt5 (RNAi^r) のノックダウンを一過性に行ったときにそのノックダウンが F-WT 細胞の細胞増殖に与える影響を調べた (図 3-7)。以後の細胞へのテトラサイクリン処理はすべて 2 μ g/ml の濃度で行った。F-WT 細胞をテトラサイクリンで 2 日間処理し、その後テトラサイクリン無添加の状態 で培養すると、一過的に Spt5 のレベルが低下するが、テトラサイクリン処理の前後期にかかわらず細胞は正常に増殖した。テトラサイクリン処理を 3 日間行くと、さらに Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現に抑制がかかり、今度は Flag-Spt5 (RNAi^r) の発現レベルが回復する前に細胞死を起こすことが分かった。これは、常にテトラサイクリンを添加した培地で細胞を培養したときと同じ動態を示した。以上の結果より、Spt5 の発現が一定時間、あるレベルまで制限されると、細胞は正常に増殖できないことが分かった。

そこで、Spt5 の発現が抑制された時の HeLa 細胞の動態をさらに注意深く観察した。FACS を用いて細胞周期の解析を行うと、Spt5 のノックダウンが細胞の G1 アレストを引き起こすことがわかった (図 3-8)。定常状態にある F-WT 細胞の細胞周期別割合分布と比べて、テトラサイクリンの添加をした F-WT 細胞は、S 期ならびに G2/M 期 (P4,P5) にある細胞数の割合が少なくなり、同時に G1 期 (P3) に存在する割合が多くなることが分かった。

さらに、Spt5 のノックダウンによってもたらされた細胞死がどのような表現型をとっているかを調べた (図 3-9)。テトラサイクリンを添加後 6 日目の F-WT 細胞を可視光ならびに蛍光顕微鏡で観察すると、細胞膜の小疱形成や核の細分化という、アポトーシスを起こした時に見られる特徴的な現象が観察された。アポトーシスの際には、カスパーゼ 3,7 の活性化が起こり、それによってポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) の切断が見られる

ことが知られているので、Spt5 のノックダウンによって PARP の切断が見られるかどうかをイムノブロット解析で調べた (図 3-10)。すると、テトラサイクリン添加後 3 日目以降の F-WT 細胞で PARP の切断が見られた。以上の結果から、HeLa 細胞で Spt5 をノックダウンすると、細胞の G1 アレストとアポトーシスが引き起こされることが分かった。

3-3-2 Spt5 ターゲット遺伝子のゲノムワイドプロファイリング

Spt5 のノックダウンにより細胞増殖の停止ならびにアポトーシスが引き起こされたが、これらの現象の直接的な原因は何なのだろうかという疑問が出てきた。さらに、過去の研究から DSIF がターゲットとする遺伝子が多く同定されてきたが、私の知る限り、ゲノムワイドな DSIF のターゲット遺伝子探索は本研究を始めた時点では行われていなかった。以上の理由から、これまでの DSIF に関する知見に加え、さらに DSIF の *in vivo* でのターゲットを知るため、また、Spt5 のノックダウンによって引き起こされるアポトーシスの根底にある原因を探るために、Spt5 が細胞内でノックダウンされてからアポトーシスを起こすまでの細胞内でのゲノムワイドな遺伝子発現量変化を調べた。テトラサイクリン添加後 0,2,4 日目の F-WT 細胞から全 RNA を 3 回の独立した実験操作により抽出し、さまざまな遺伝子の発現量変化を調べるためにマイクロアレイ解析を行った (図 3-11)。解析には過去の研究から注釈のついた 8,500 遺伝子が提示されている Affymetrix Human Genome Focus Array を使った。テトラサイクリン添加後 4 日目のサンプルを用いた解析より、Spt5 のノックダウンによって 8,500 遺伝子中、65 遺伝子に 1.5 倍以上の発現誘導が見られた。その内訳は、34 遺伝子が発現量の上昇、31 遺伝子が発現量の低下であった。発現量の変化が見られた遺伝子の中で、Spt5 に最も大きな変化が見られた。テトラサイクリン添加後 2 日目のサンプルを用いた解析では、Spt5 だけに発現量の著しい低下が見られた。ゆえに、他の転写量の変化が見られた遺伝子は、テトラサイクリン添加後 2 日目と 4 日目の間で発現誘導が起こったものと考えられる。こ

のマイクロアレイ解析の結果は、DSIF の直接的または非直接的両方での機能によって起こった結果であると推測できるが、Spt5 のノックダウン誘導後 2-4 日目に一様に遺伝子の発現量変化が表れていたことを考えると、Spt5 を除いた 64 の遺伝子のうち、多くの遺伝子は DSIF の直接的なターゲットなのではないかと推測した。

続いて、前述のマイクロアレイ解析で抽出された Spt5 ターゲット遺伝子のジーンオントロジー (GO) 分類を行った (表 3-1)。すると、RNA プロセシングに関わる遺伝子の発現量変化が最も大きく、これらの遺伝子は Spt5 のノックダウンにより発現量が上昇するものよりも低下するものが多かった (図 3-11 c)。さらに、細胞周期の制御に関わる遺伝子は発現量低下 (図 3-11 d)、4 つのヒストン遺伝子は発現量上昇 (図 3-11 b)、そして、転写制御に関わる遺伝子は上昇・低下の両方に発現量変化が見られた (図 3-11 a)。また、*CDKN1A/p21* (*p21*) や *DDB2* といった p53 誘導型遺伝子の発現量は上昇の傾向を示した (図 3-11 e)。

さらに、マイクロアレイ解析の結果を裏付けるために、マイクロアレイ解析で得られた Spt5 のターゲット遺伝子の中から、2 倍以上の発現量の変化が見られた 10 個の遺伝子を抽出して解析を行った。F-WT 細胞へのテトラサイクリン添加前後における 10 個の遺伝子の発現量変化を、リアルタイム定量 PCR 解析で調べた (図 3-12)。その結果、PCR 解析を行ったすべての遺伝子でマイクロアレイ解析と同等の上昇・低下傾向を示す結果となった。とりわけ、*p21* と *CCNA2* 遺伝子の発現は、テトラサイクリン添加後 2 日目で統計学的にも有意な変化が見られた。しかし、マイクロアレイ解析によると *p21* と *CCNA2* はテトラサイクリン添加後 4 日目になって初めて発現量の変化が見られた。このリアルタイム定量 PCR 解析結果とマイクロアレイ解析結果の間で、有意差が表れるのに時間差が生じた理由として、小さな転写量の変化に関してマイクロアレイ解析よりもリアルタイム定量 PCR 解析を用いたほうが、感度良く検出できるために起こったものであるからと推測できる。また、発現量が上昇した遺伝子の中には 4 日目や 5 日目に上昇のピークが見られたものや、6 日目まで上昇し続けているものなど、さまざまな動態を示すものがあつた。これには Spt5 による役割だけではなく、各遺伝子

の mRNA の安定性の違いによる影響もあると考えられる。

3-3-3 Spt5 のノックダウンは p53 シグナル経路を活性化する

3-3-2 項の結果から、p53 誘導型遺伝子に発現量の上昇傾向が見られたため、Spt5 のノックダウンにより p53 シグナル経路が活性化されたのではないかと考えた。そして、p53 シグナル経路の活性化によって発現量の変化が起こった遺伝子が存在するのではないかと考えた。さらに、Spt5 のノックダウンによって誘導された p53 シグナル経路が活性化し、このことがアポトーシスの起因となったのではないかと考えた。

p53 シグナル経路の活性化は p53 タンパク質の安定化に起因することがある。そこで、HeLa 細胞に Spt5-RNAi ウイルスを形質導入して Spt5 をノックダウンし、そのときの HeLa 細胞における p53 タンパク質の発現量をイムノブロッティング法で調べた (図 3-14 (A))。HeLa 細胞では、p53 タンパク質は内在性ヒトパピローマウイルスの E6 タンパク質によってユビキチン化され、その多くが分解されていることから、野生型 p53 タンパク質の量は非常に低く抑制されていると考えられる。そこで Spt5 をノックダウンすると、p53 タンパク質レベルが上昇し、同時に p53 関連遺伝子として知られている p21 のタンパク質レベルも上昇することがわかった。前述のマイクロレイ解析の結果より、p53 の mRNA レベルでの発現量の変化は見られなかったことと、細胞抽出液を精製した時の p53 mRNA レベルに変化は見られなかったこと (未発表データ) を考慮すると、p53 タンパク質自身が安定化したゆえにそのタンパク質レベルの上昇が見られたと考えられる。

それでは、Spt5 のノックダウンによって p53 シグナル経路が活性化され、この活性化依存的に発現量の変化が見られた遺伝子もあるのではないかと考えた。そこで、HeLa 細胞に比べて p53 が正常レベルで発現している乳腺癌由来 MCF7 細胞を用い、Spt5 ならびに p53 をノックダウンしたときの細胞内における遺伝子発現量の変化を調べた (図 3-14 (B))。MCF7 細胞に

Spt5-RNAi ウイルスならびに p53-RNAi ウイルスを形質導入し、1 細胞内で Spt5 と p53 を別個ならびに同時にノックダウンさせた。そして細胞から全 RNA を抽出して定量 PCR 解析を行った。PCR 解析する遺伝子として、前項のマイクロアレイ解析から Spt5 のノックダウンによって発現量変化が見られた遺伝子を採用した。具体的には p53 関連遺伝子とされている p21 と DDB2、そして p53 とは関連がないとされている MAP1LC3B (MAP1) を採用した。その結果、MCF7 細胞で Spt5 をノックダウンしても p53 の mRNA 量に変化はほとんど見られず、DDB2、p21、MAP1 の発現量はそれぞれ上昇した。これは、HeLa 細胞を使ってノックダウン実験を行ったときと同じ傾向であった。次に、MCF7 細胞で p53 をノックダウンすると、DDB2 と p21 の発現が抑制された。MAP1 は発現量に変化は見られなかった。そして、同一細胞内で Spt5 と p53 を同時にノックダウンすると、p21 と DDB2 の発現量は p53 を単独でノックダウンさせたときと同様に減少し、MAP1 の発現量は Spt5 単独でノックダウンさせたときと同様に上昇した。以上の結果から、Spt5 のノックダウンによって起こった p21 と DDB2 の発現量変化は、p53 シグナル経路の活性化依存的な効果によるものであると示唆された。そして、Spt5 ノックダウンによる MAP1 の発現量変化は p53 非依存的な効果によるものであると示唆された。

MCF7 細胞ならびに HeLa 細胞は双方とも癌由来の細胞であり、増殖能力が強く、細胞増殖の停止やアポトーシスを誘導するための p53 シグナル経路が正常に作動していない可能性も完全には否定できない。そのため、MCF7 細胞で Spt5 ならびに p53 のノックダウンによって誘導された p21、DDB2 の発現量の変化は、p53 シグナル経路の活性化によって引き起こされたものであるとは必ずしも断定できない。また、ノックダウンアプローチでは、発現抑制が 100%にはならない。そこで、前述の解析結果をさらに拡張し確かなものにするため、染色体数が正常で野生型 p53 遺伝子が発現しているヒト胎児由来線維芽細胞の IMR-90 細胞と、p53 遺伝子を欠損しているヒト肺非小細胞癌由来細胞の NCI-H1299 細胞を用いて解析を行った (図 3-14 (C))。Spt5-RNAi ウイルスを用いて IMR-90 細胞で Spt5 をノックダウンすると、p53 および p21 タンパク質レベルが上昇した。そして、

NCI-H1299 細胞で Spt5 をノックダウンすると、p53 および p21 タンパク質の発現レベルに変化は見られなかった。これにより、Spt5 のノックダウンによって p53 シグナル経路が活性化され、それにより p53 関連遺伝子の p21 の発現量が上昇することが示唆された。

また、Spt5 のノックダウンをすると IMR-90 細胞と NCI-H1299 細胞ともに HeLa 細胞と同じ時間経過をとりながら増殖し、結果として細胞死することがわかった（未発表データ）。

以上の結果から、p53 が Spt5 のノックダウンによって起こったいくつかの遺伝子の発現量変化に関係することが分かった。そして Spt5 のノックダウンによるアポトーシスは p53 が存在しない細胞にも起こることから、Spt5 のノックダウンは p53 シグナル経路の活性化に起因するアポトーシスを誘導するだけでなく、別経路に起因したアポトーシスも誘導することが示唆された。

3-3-4 Spt5 の C 末端領域は細胞増殖に必要ではない

3-3-3 項の結果から、p53 が存在しない細胞でも Spt5 のノックダウンによってアポトーシスが誘導されるがわかった。それでは Spt5 のノックダウンによって誘導されるアポトーシスは何が真の原因なのであろうか。Spt5 をノックダウンすることで全体の 1%弱の遺伝子にだけ発現量の変化が見られなかったにもかかわらず、アポトーシスという重度な生理的現象が誘導された。そしてこれは DSIF の未知の機能によるものなのか。それとも既知の機能によるものなのかという疑問が浮かび上がってきた。

この問題を解決する手掛かりを探るため、アポトーシスに関わる Spt5 の構造活性相関を調べることにした。

Spt5 の一部の領域は *in vitro* の実験によって特徴づけや機能解析はすでに行われている（Yamada *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 1999）。これらの結果を参考に Spt5 タンパク質の一連の欠損変異体（Flag-Spt5 (RNAi)^r 変異体）を細胞内で発現するプラスミドを作製した（図 3-15）。N 末端側の

酸性領域を欠損した変異体 (Δ acidic)、Spt4 と結合する領域を欠損した変異体 (Δ Spt4BD)、RNAP II と結合する領域を欠損した変異体 (Δ KOW1/2, Δ KOW3/4)、P-TEFb によってリン酸化されることによって転写伸長を促進することに関与する領域 (CTR) を欠損した変異体 (Δ repeat)、そして C 末端を欠損した変異体 (Δ CT) である。これらの Spt5 変異体を発現する DNA コンストラクトと、Flag-全長 Spt5 (RNAi^r) (WT) を発現する DNA コンストラクトをレンチウイルス発現システムによってゲノム DNA 上に組み込み、細胞内で安定的にかつ内在性 Spt5 と同等レベルに発現させるようにした。ネガティブコントロールとして、抗生物質に耐性をとるプラスミド (None) を上記と同様にレンチウイルス発現システムによって細胞内に導入した。

まず、Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体の細胞内での局在を調べた (図 3-16(A))。すると、N 末端側の acidic 領域を欠損した Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体 (Δ acidic) は主に細胞質に局在し、他の Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体は核内に局在していた。これより、N 末端側 174 アミノ酸の中に Spt5 の核移行シグナル配列が含まれていると推測できる。実際にオンライン・データベースを用いてシーケンス解析を行った結果、N 末端側から 66 番目から 72 番目のアミノ酸 (PPKKPRH) が、核移行シグナルであることが示唆された。

次に内在性 Spt5 のノックダウンによって誘導されるアポトーシスを相補する Spt5 変異体を同定するための実験を行った。各 Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体は 3-3-1 項のテトラサイクリン誘導システムの際に用いたサイレント変異を持っているため、Spt5 shRNA に耐性を取る。そこで、Spt5 shRNA を発現させる Spt5-RNAi ウイルスを各 Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体を発現する HeLa 細胞に形質導入して内在性 Spt5 をノックダウンし、それぞれのレンチウイルスにパッケージングされている選択マーカー存在下で培養した。ノックダウン誘導後 4 日目の細胞から細胞抽出液をとり、Spt5 のノックダウン効果ならびに Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体タンパク質レベルをイムノブロッティングによって確認した (図 3-17 (A))。そして、内在性の Spt5 に代わって Spt5 のどの領域が正常な細胞増殖に必要なのか調べるため、各細胞株の生細胞数を計測することにより、それぞれの細胞株の増殖曲線を作

製した (図 3-18 (A))。

その結果、Spt5-RNAi ウイルスの代わりに control ウイルスを形質導入し、内在性 Spt5 を発現させたままの各細胞株は、すべて同じような増殖曲線を示した (図 3-18 (A) 左図)。この結果は Flag-Spt5 (RNAi^r) 変異体による細胞増殖へのドミナント・ネガティブ効果はないことを示している。そして、Spt5-RNAi ウイルスを形質導入し、内在性 Spt5 をノックダウンした各細胞株では、Flag-Spt5 (RNAi^r) WT、 Δ repeat、 Δ CT を発現させている細胞株は正常に増殖し、残りの細胞株は増殖停止ならびに細胞死を起こした (図 3-18 (A) 右図)。これらの結果より、Spt5 の C 末端約 300 アミノ酸残基は細胞増殖に必要でないが示唆された。

3-4 考察

過去に行われた実験結果より、DSIF が RNAP II の転写の伸長段階に普遍的に働いていることがすでに示唆されていた。また、背景の項で述べた既知の結果に加え、当研究室で行った他の研究結果も DSIF が転写伸長因子として普遍的に働いていることを支持する。具体的に述べると、ランダムに選んだタンパク質をコードしている 11 個の遺伝子について anti-Spt5 抗体を用いて ChIP 解析を行ったところ、11 個すべての遺伝子上で DSIF は RNAP II と似ている局在パターンを示した（未発表データ）。また、ChIP 解析とマイクロアレイ解析を組み合わせた ChIP-chip 解析により、DSIF はタンパク質をコードしている遺伝子上に広く局在していることも示されている（未発表データ）。

しかし、今回のゲノムワイドのマイクロアレイの結果では、Spt5 のノックダウンによって、アレイにのっていた遺伝子中の約 1% の遺伝子にだけ転写量の変化が起こった（図 3-11）。これはマイクロアレイチップ上に乗っている 8,500 遺伝子中 64 個の遺伝子にすぎない。さまざまなエラーが生じていたとしても、1% の遺伝子しか転写量の変化が起こらなかったことは予想外であった。

この結果と DSIF が普遍的な転写制御因子であるという位置づけとの間で矛盾が生じた理由として、私は 3 つの可能性を考えた。

1 つめは、Spt5 のノックダウン操作を行っても 100% の効率にはならないことである。それゆえ、細胞内でノックダウンされずに残った内在性 Spt5 がターゲット遺伝子に働いている可能性がある。その結果、本来 Spt5 のノックダウンによって生じるはずの表現型が弱まり、ターゲット遺伝子の転写量に変化が見られなかったということが考えられる。

2 つめは、DSIF が他の因子と重複する機能を持っていることである。それゆえ、Spt5 をノックダウンしても Spt5 の機能を相補する因子が存在するため、限られた遺伝子の転写量変化しか見られなかったこと考えられる。これまでに多くの転写伸長因子が同定されており、その多くは直接 RNAP II と結合し、伸長段階を制御していることが *in vitro* での研究を通してわか

っている。しかし、これらの因子の生理学的機能はわかっていないことが多い。また、これらの因子がそれぞれ別の機能を持っているのか、また、何かしら重複する機能を持っているのかもあまりわかっていない。それゆえ、DSIF のノックダウンによる一部の影響は他の転写伸長因子によって相補されるという可能性もある。

3 つ目は、転写伸長因子による制御が mRNA の合成における全段階の中で律速ではない場合があるということ。mRNA の合成は多様のステップによって制御されている。それは、クロマチンリモデリングや転写開始、転写伸長、転写終結、そして mRNA のプロセッシング、ヒストンの翻訳後修飾といったものである。それゆえ、転写伸長段階は一部の遺伝子に対してのみ律速段階なのかもしれない。確かに、すべての段階が mRNA 合成には重要であるという意見はある。そして、転写伸長因子による制御が律速である遺伝子の存在も報告されている。例えば、ショウジョウバエ *hsp70* 遺伝子は熱ショックによりすぐに転写反応が開始され、一連の転写伸長複合体が形成されて転写伸長反応が進んでいく (Wu *et al.*, 2003)。つまり、このような遺伝子の発現は転写伸長因子の機能に対して非常に敏感であると考えられる。実際に、*hsp70* や *c-fos*、*junB* といった外部刺激によって発現の誘導がかかる前初期遺伝子と呼ばれる遺伝子は、DSIF のターゲット遺伝子として知られている (Aida *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006)。しかし、これらの遺伝子の発現量の変化が、今回のマイクロアレイ解析によって検出されなかった。それは、今回採用した実験では外部刺激を行っていなかったことが理由であると考えている。外部刺激をかけて遺伝子上への DSIF のリクルートを誘導させたものではないことを考えると、これらの遺伝子の発現量に有意差が見られなかったことはとりわけ不思議なことではない。

今回のマイクロアレイ解析によって選ばれなかった遺伝子の中にも、発現量の変化が状況特異的な DSIF の機能に依存する遺伝子があると考ええると、DSIF のターゲット遺伝子はずっとあると考えられる。

さらに、Spt5 のノックダウンによってそのターゲット遺伝子の発現量変化が起こる機構について考えた。

1 つ目は、DSIF の直接的なターゲット遺伝子の転写量変化である。DSIF

は転写伸長を促進と抑制の両面の制御を行うため、Spt5 のノックダウンによって転写量の上昇もしくは低下が誘導された遺伝子すべてが DSIF の直接的なターゲットである可能性は大いにあったと考えた。

具体的には、図 3-11 に示されている遺伝子の中にはヒストン遺伝子がある。複製依存的ヒストン遺伝子の発現は通常 polyA 配列を含まない mRNA に転写される。そして、この現象は細胞周期の S 期特異的に発現がかかることがわかっている。このようなヒストン遺伝子の mRNA の 3'プロセッシングは、本来ステムループ構造の形成による転写終結が行われるが、この転写終結が NELF のノックダウンによって異常が起こり、その結果としてステムループ構造をとる RNA 配列の下流に存在する polyA 配列が付加した mRNA に転写されることがわかっている (Narita *et al.*, 2007)。NELF は DSIF と一緒に転写伸長因子として働いている。そのため、Spt5 のノックダウンによって、ヒストン遺伝子の発現量が NELF のノックダウンのときと同様の変化を示したことは興味深い現象である。私は、今回の結果から NELF だけでなく DSIF も一緒にヒストン遺伝子特異的な mRNA の 3'プロセッシングに関与しているのではないかと推測している。今回のマイクロアレイ解析は polyA が付加された転写産物のみ解析用サンプルとして使用した。それゆえ、Spt5 のノックダウンが 3'プロセッシング異常の起こったヒストン遺伝子の発現上昇を誘導したのではないかと推測している。

2 つ目は、Spt5 のノックダウンによって起こった細胞の生理的な変化によって誘導された転写量の変化である。マイクロアレイ解析によってリストアップされた遺伝子のいくつかはこのメカニズムによって転写量変化が生じた遺伝子であると考えている。例えば、*p21* や *DDB2* といった p53 のターゲット遺伝子は、Spt5 のノックダウンにより p53 シグナル経路が活性化されたことによって、発現量の増加が起こったと考えられる。これは Spt5 の直接的な転写制御の結果であるとは考えられない。さらに、Spt5 のノックダウンによって転写量の低下が見られた *CCNA2* もこのカテゴリーに入る遺伝子であると考えられる。*CCNA2* は細胞周期 S 期と G2 期で発現量が高く、G1 期で発現量が低い (Whitfield *et al.*, 2002)。Spt5 のノックダウンによって G1 アレストが起こるが、*CCNA2* の発現量の低下はこの G1 ア

レストによって誘導されたものではないかと考えられる。

3 つ目は、**Spt5** のノックダウンによって誘導された異常現象を正常な方向に向かわせる細胞機能によって起こった発現量の変化である。mRNA の転写やプロセッシングのような mRNA の代謝に関係のある遺伝子はこのカテゴリーに入る遺伝子であると考えられる。例えば、**Spt5** のノックダウンによって、mRNA の核外輸送因子である *NXF1* 遺伝子の発現量が上昇した。これは、**Spt5** のノックダウンによって誘導された、mRNA 合成や mRNA の核外輸送に異常が生じたとき、その異常を補正する細胞の反応によるものであると考えられる。また、*Spt4* を欠損した出芽酵母では、mRNA の核外輸送が行われなことが分かっている (Burckin *et al.*, 2005) ことも、この考えを支持する結果である。

それでは **Spt5** のノックダウンによって誘導される細胞老化やアポトーシスは何が直接的な原因になるのであろうか。私は **Spt5** のノックダウン操作後に観察された、**Spt5** のタンパク質レベルが減少する時期とアポトーシスが開始する時期にギャップが生じていることに着目した。**Spt5** タンパク質レベルはノックダウン後すぐに減少を始め、2,3 日後には著しい減少が観察された (図 3-5)。それに対し、アポトーシスは 5 日後以降に観察された (図 3-5)。また、このギャップが生じる現象とは異なり、RNAP II のサブユニットである **Rpb1** をノックダウンしたときはアポトーシスと **Rpb1** タンパク質レベルの低下が同時発生的な現象であった (未発表データ)。**Spt5** タンパク質レベルの低下とアポトーシスの発生とでタイミングが違うのは、**Spt5** のノックダウンによって誘導された細胞老化とアポトーシスが確率的そして累積的な現象によることから生じるからであると推測している。

そこで、そもそもなぜ、そしてどのように **p53** シグナル経路は活性化されたのか考えた。**p53** が活性化された理由として、DNA 損傷が原因のひとつではないかと考えている。RNAP II が転写反応を行う際、二本鎖 DNA は解離して一本鎖の状態になり、その一本鎖 DNA を鋳型に RNAP II は転写を行う。そして、**Spt5** がノックダウンされたことにより、停止した RNAP II の量が増加して転写バブルが残った状態になり、その結果一本鎖 DNA に損傷が生じているのではないかと考えている。

この考えを支持する実験結果として、出芽酵母を使った遺伝学的解析の結果がある。これは、転写伸長因子として似たような機能を持っている酵母 Spt4 と酵母 Spt6 の変異株では、ゲノムの組換えが高頻度で起こっているという結果である (Basrai *et al.*, 1996; Malagon *et al.*, 1996)。このゲノムの組換えは R-loop 構造の形成が生じたことによって起こっていると示唆されている。R-loop とは、二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に解離したときに、RNA 分子がその一本鎖 DNA とハイブリダイズした構造であり、その結果、もう一方の一本鎖 DNA がそのまま残ってしまう現象が生じる。転写バブルの中には 8-9 残基の DNA:RNA ハイブリッドが生じていることがよく知られているが、ある条件下では転写反応中に広範囲の R-loop 構造が見られる。例えば、転写伸長複合体のコンポーネントの欠損によって R-loop 構造が多く形成される (Li,X *et al.*, 2006)。一本鎖 DNA は二本鎖 DNA よりも変異が入りやすいことが知られているため、転写反応中に生じる R-loop 構造の形成はゲノム構造の不安定化を引き起こすと考えられる (Li,X *et al.*, 2006)。

以上の考えから、Spt5 は転写中に生じる R-loop 構造の形成を阻害し、染色体構造の安定化に一役買っているのではないかと考えている。

また、Spt5 タンパク質の C 末端側約 300 残基は正常な細胞増殖に必要でないことが示唆された。他方、 Δ acidic、 Δ Spt4BD、 Δ KOW1/2、 Δ KOW3/4 は、野生型 Spt5 のノックダウンによる細胞老化ならびにアポトーシスをレスキューすることはできなかった。これらの結果から、Spt5 が核に局在し、Spt4 ならびに RNAP II と結合して機能することが、正常な細胞増殖に必要であることが示唆された (図 3-17)。このことは前述の染色体構造の安定化に Spt5 が関与している可能性を支持するかもしれない。

当研究室では、過去に P-TEFb による Spt5 のリン酸化が転写伸長反応の促進活性に重要であることを示したが (Yamada *et al.*, 2006)、このリン酸化が起こる Spt5 のドメインが正常な細胞増殖のサポートに関与しないことは驚きであった。この結果より、Spt5 の N 末端側、約 750 残基が Spt5 のコアな機能を持っており、C 末端の約 300 残基はその制御をする役割を担っており、かつ、この C 末端領域が *in vivo* のある条件下では必要ではないのかもしれないと考えている。

以上、さまざまな推測が挙げられるが、本研究において DSIF の細胞生物学的意義と転写伸長反応の制御に関する新たな重要な知見を提示することができた。

3-5 図表

DSIF



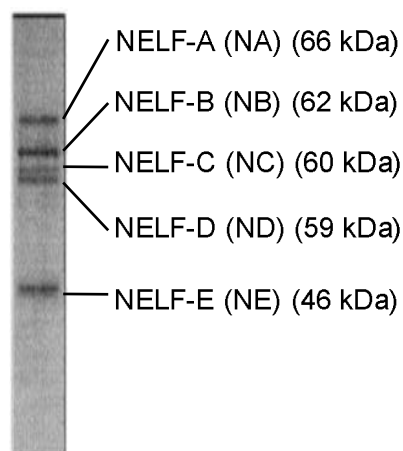
特徴

- ・Spt5とSpt4のヘテロ二量体を形成する

機能

- ・NELFと協調してRNAP IIの転写伸長反応を抑制する
- ・RNAP IIに結合する
- ・単独でRNAP IIに作用し、転写伸長反応を促進する

NELF



特徴

- ・NELF-A,-B,-C/D,-Eのポリペプチドで構成されるヘテロ四量体を形成する
- ・NELF-DはNELF-Cの翻訳バリエーションである

機能

- ・DSIFと協調してRNAP IIの転写伸長反応を抑制する
- ・DSIFを含む転写伸長複合体ならびにRNAと結合する

図 3-1 DSIF とNELF の特徴と機能

上: DSIFはヒトSpt5とヒトSpt4からなるヘテロ二量体である。左の写真はDSIFをヒト細胞から精製し、銀染色した写真である。下: NELFはNELF-A,-B,-Cまたは-D,-Eによって構成されるヘテロ四量体である。NELF-CとNELF-Dは翻訳レベルのバリエーションである。左の写真はNELF複合体をヒト細胞から精製し、銀染色した写真である。

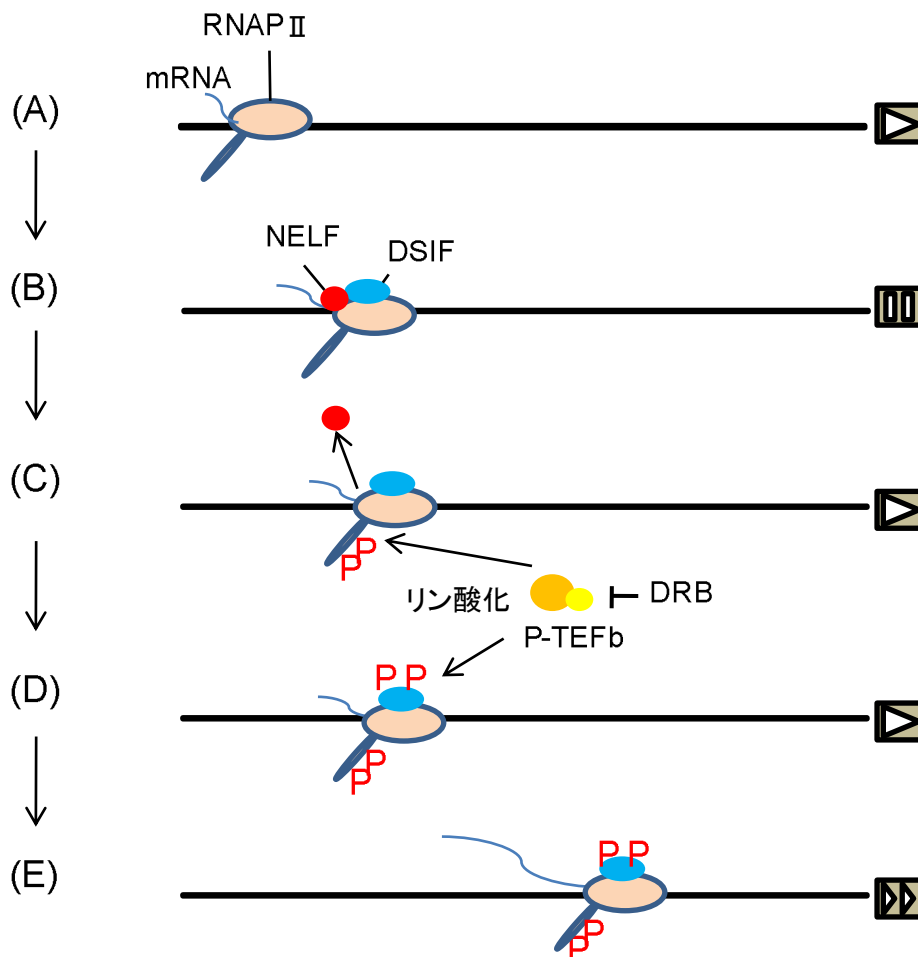
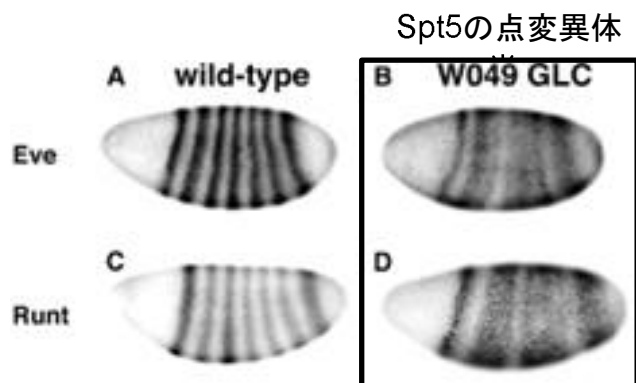


図 3-2 *in vitro*でのDSIF、NELFによる転写伸長制御機構

(A) 転写伸長中のRNAP IIに、(B)DSIFとNELFは協調して作用し、転写伸長を一時停止させる。(C)一時停止はP-TEFbがRNAP IIの最大サブユニットにあるCTDの繰り返し配列(YSPTSPS)の2番目のセリンをリン酸化することで解除される。(D)この後、NELFは離れ、DSIFはP-TEFbによってリン酸化されると単独で転写伸長を促進する(E)。DRBはP-TEFbのリン酸化活性を阻害することで、DSIFとNELFによるRNAP IIの一時停止を解除できなくする。

(A)



(B)

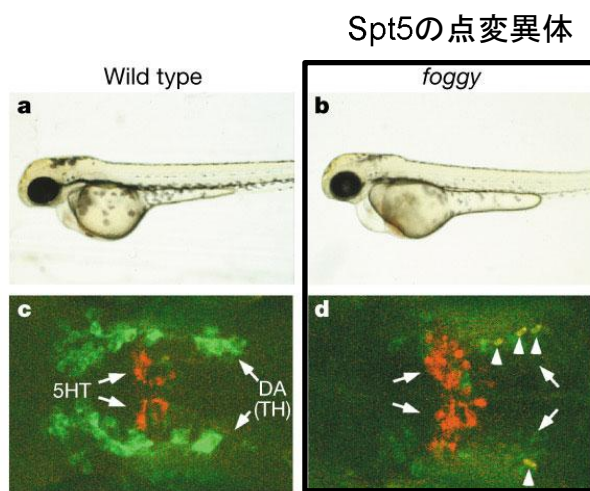


図 3-3 組織ならびにアレル特異的に機能するDSIF

(A)ミスセンス変異を持つショウジョウバエW049 GLCでは、初期発生段階における分節遺伝子であるペア・ルール遺伝子の発現に異常が見られる(jennings *et al.*, 2004)。(B)ゼブラフィッシュのSpt5点変異体*foggy*は、視床下部でドーパミン作動性ニューロン(DA(TH))の減少やそれに付随したセロトニン作動性ニューロン(5HT)の増加といった神経分化の異常を引き起こす(Guo *et al.*, 2000)。

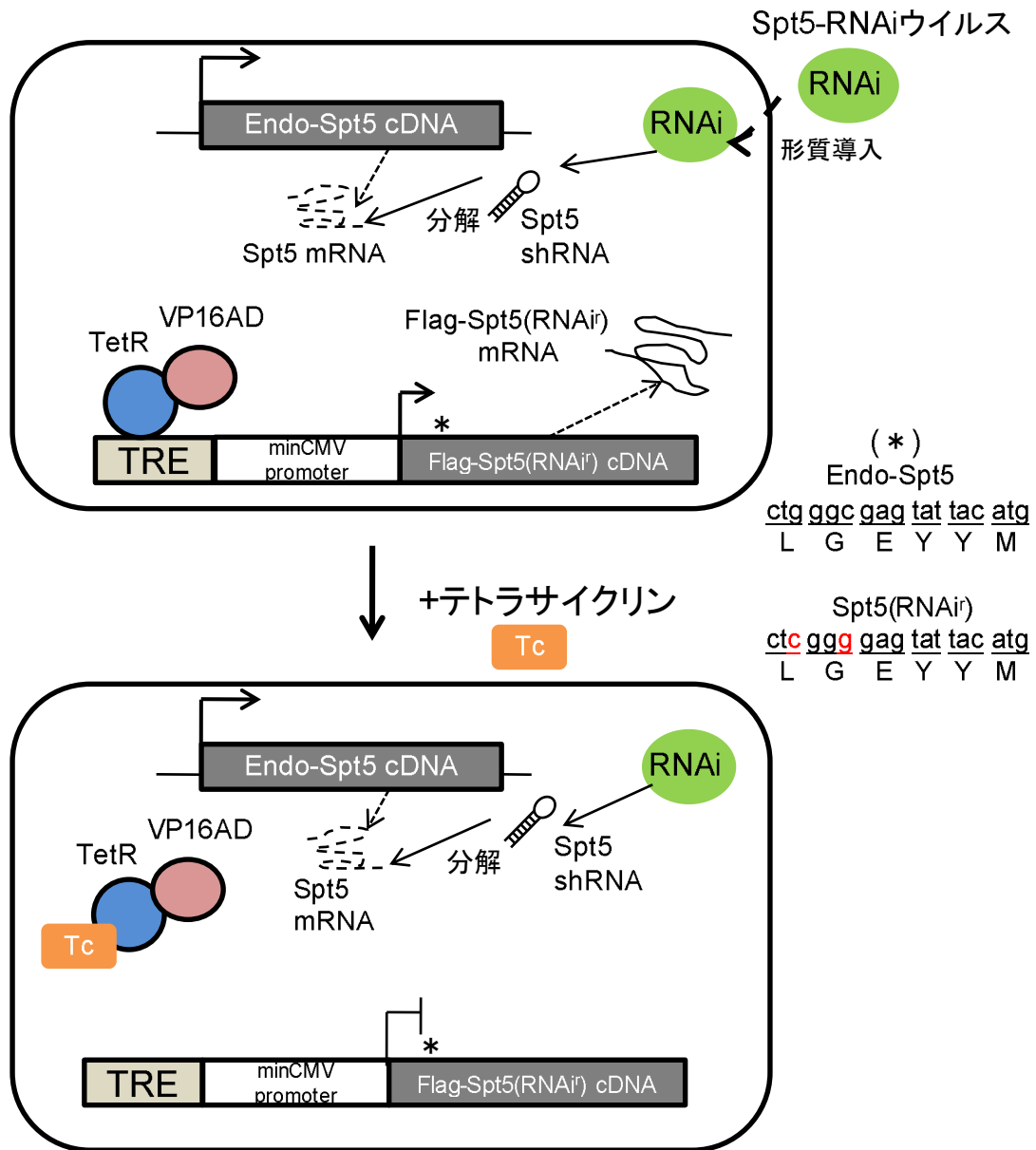


図 3-4 テトラサイクリン誘導発現システム

細胞にRNAiウイルスを形質導入することで、Spt5 shRNAを恒常的に産出し、内在性Spt5をノックダウンさせることができる。さらに、外来性Flag-Spt5(RNAi)の発現は、テトラサイクリンを細胞培地に添加することによって抑制することができる。TREはテトラサイクリン応答配列を、tetRは野生型テトラサイクリンレセプターを、VP16ADはVP16 転写活性化ドメインを示す。
 (*): Flag-Spt5(RNAi)はSpt5 shRNAに対して耐性をとる配列を持つ。

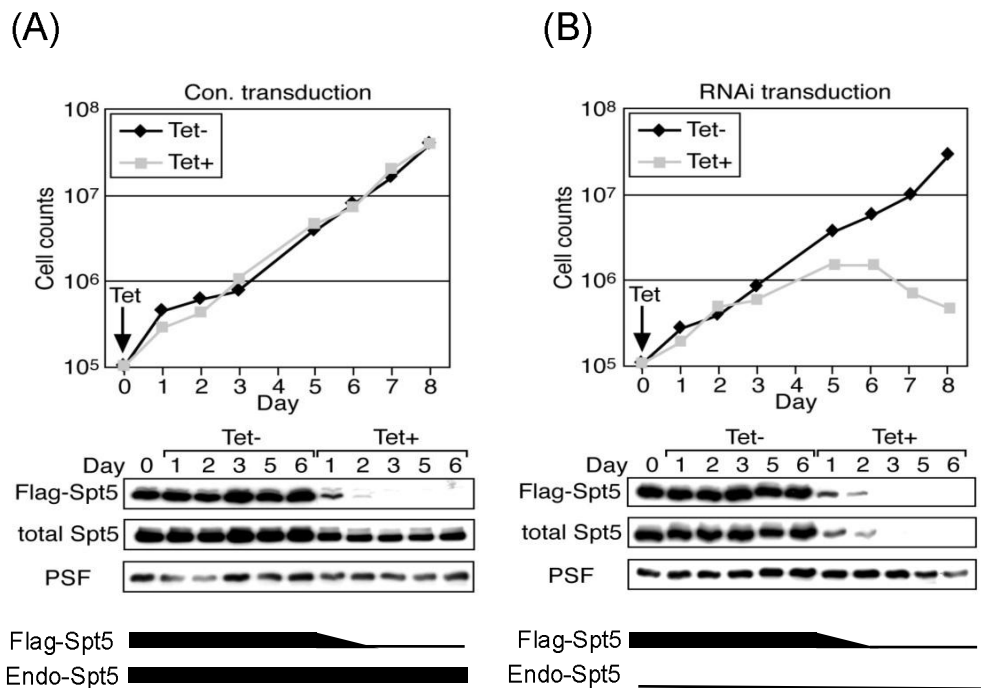


図 3-5 Spt5はHeLa細胞の増殖に必須である(1)

(A)コントロールウイルスを形質導入したHeLa/Flag-Spt5(RNAi)細胞。(B)Spt5-RNAiウイルスを形質導入したHeLa/Flag-Spt5(RNAi)細胞(F-WT細胞)。それぞれの細胞株にテトラサイクリン(Tet) (2 µg/ml) を添加して、その後の各々の日数におけるSpt5の発現量の確認と、生細胞数の計測を行った。PSFはローディングコントロールである。

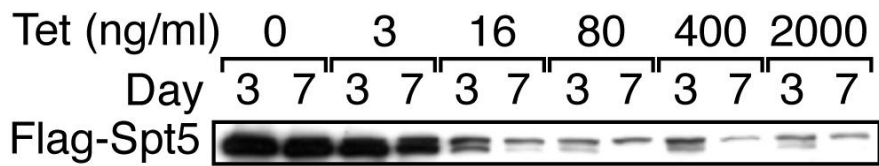
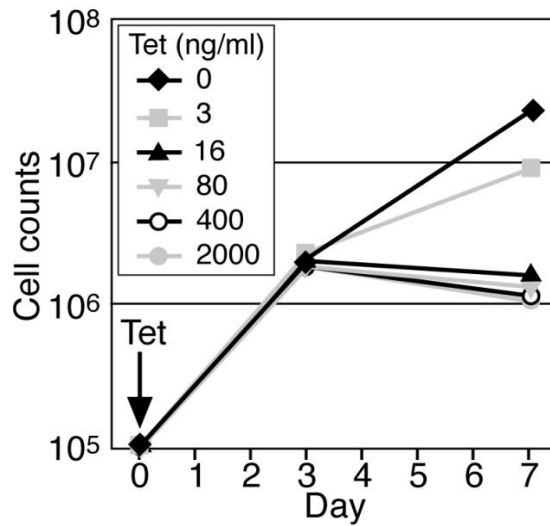


図 3-6 Spt5はHeLa細胞の増殖に必須である(2)

F-WT細胞にさまざまな濃度でテトラサイクリン(Tet)を添加後、各日数におけるSpt5の発現量の確認ならびに生細胞数を計測した。上図は細胞の増殖曲線、下図は細胞内でのFlag-Spt5の発現量を示している。

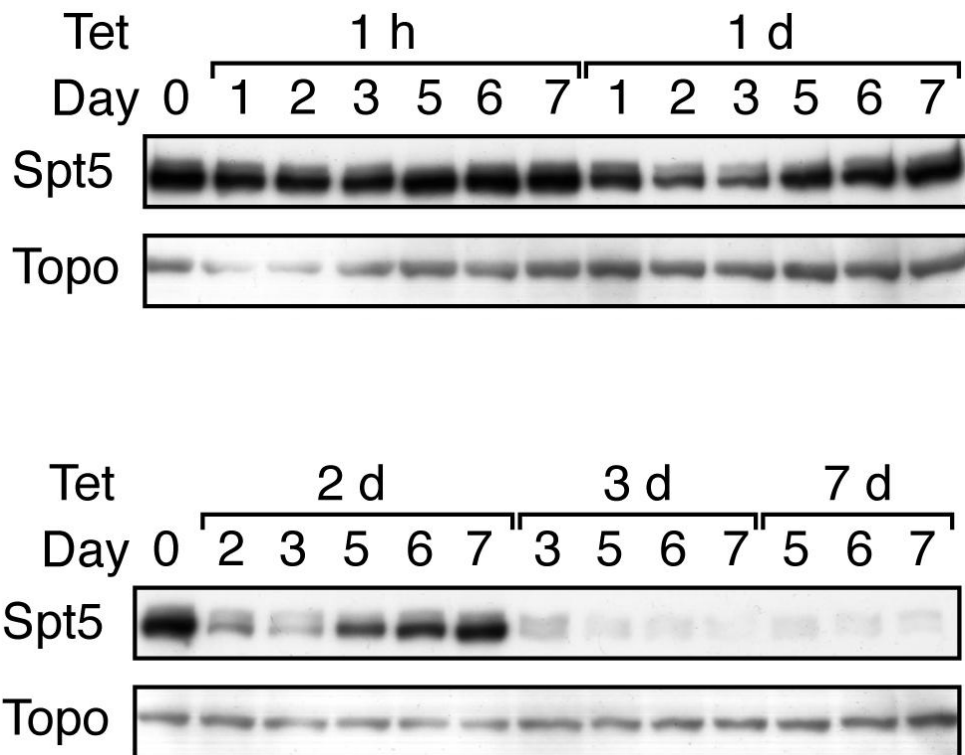
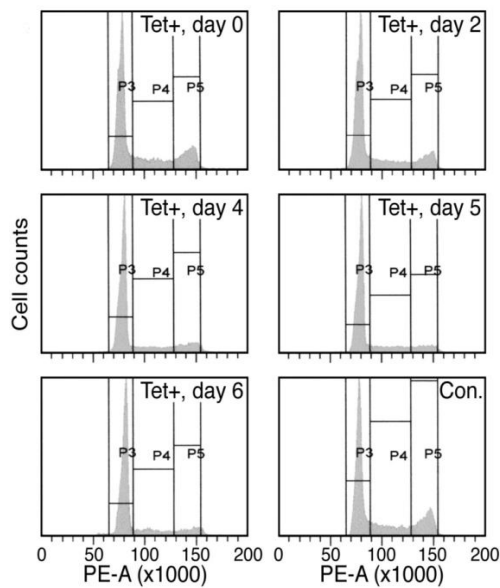


図 3-7 Spt5はHeLa細胞の増殖に必須である(3)

Spt5-RNAiウイルスを形質導入したHeLa/Flag-Spt5(RNAi)細胞にテトラサイクリン(Tet) (2 $\mu\text{g/ml}$) を添加後、“Tet”が示す日数でテトラサイクリン無しの培地に交換し、“Day”が示す日数におけるSpt5の発現量を確認した。Topoはローディングコントロールである。

(A)



(B)

Sample	P3	P4	P5 (%)
Tet+, day 0	60	19	20
Tet+, day 2	66	17	16
Tet+, day 4	70	14	14
Tet+, day 5	72	16	11
Tet+, day 6	73	13	10
Con.	58	19	22

図 3-8 Spt5のノックダウンはG1アレストを誘導する

(A) HeLa/Flag-Spt5(RNAi)細胞ならびにF-WT細胞を、0,2,4,5,6日テトラサイクリン(2 $\mu\text{g/ml}$) (Tet) 添加培地で培養し、その後回収した細胞をpromidium iodideで染色し、FACSを用いて細胞周期の解析を行った。(B)細胞周期の解析結果を定量化したものである。P3、P4、P5はそれぞれG1期、S期、G2/M期を示す。

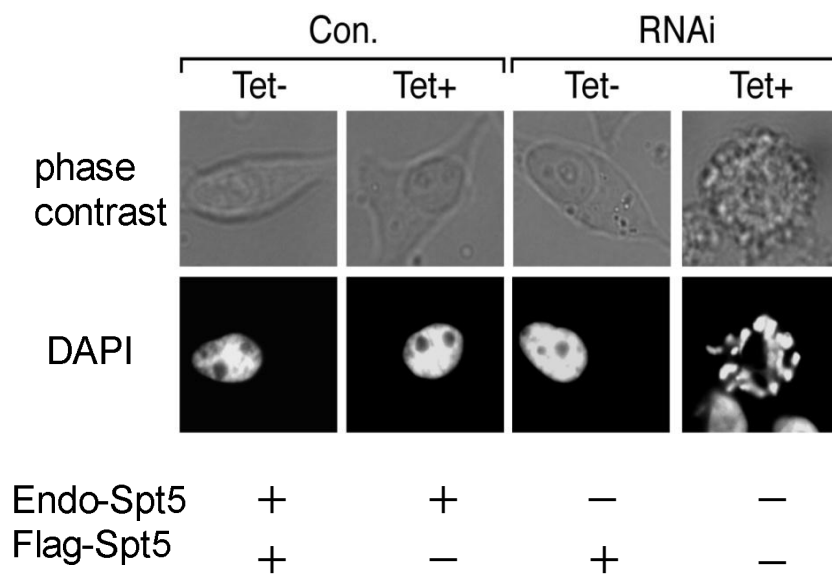


図 3-9 Spt5のノックダウンはアポトーシスを誘導する(1)

HeLa/Flag-Spt5(RNAi)細胞ならびにF-WT細胞をテトラサイクリン(Tet) (2 µg/ml)含有の培地で6日間培養し、その細胞をDAPIで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。Phase contrast(可視光)観察も同時に行った。

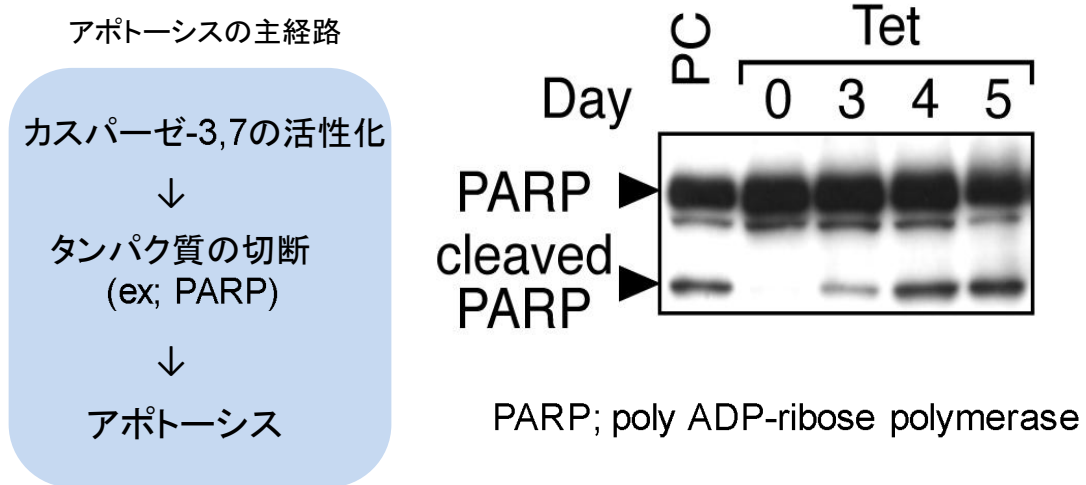


図 3-10 Spt5のノックダウンはアポトーシスを誘導する(2)
 示した日数(Day)だけテトラサイクリン(Tet) (2 µg/ml)で処理したF-WT細胞から細胞抽出液を調製し、anti-PARP抗体でイムノブロッティングを行った。テトラサイクリンの代わりにanti-Ras抗体で処理したものを、PARPの切断を示すポジティブコントロール(PC)とした。

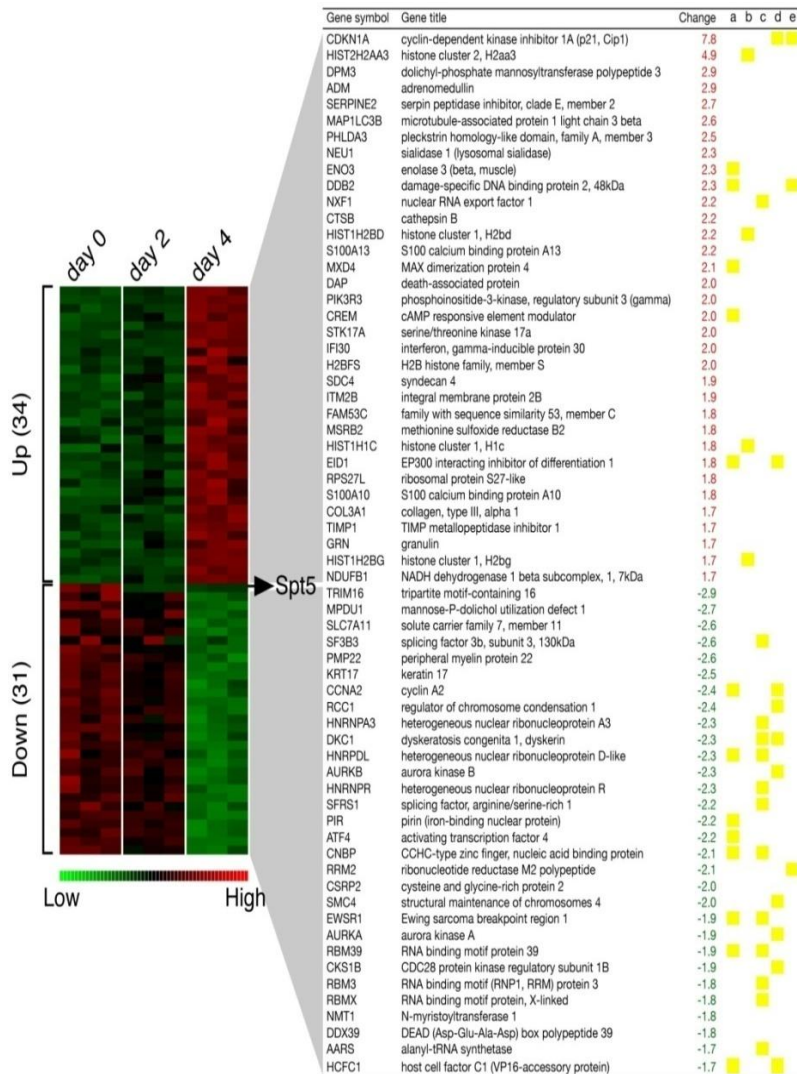


図 3-11 Spt5ノックダウンの影響を受けた転写産物

Spt5のノックダウンによって転写量が1.5倍以上見られた遺伝子を抽出した。赤は転写量が増加したもの、緑は転写量が減少したものを示している。黄色の四角は以下のような特徴ならびに機能のある遺伝子を分類したものを示す。a: 転写制御、b: ヒストン遺伝子、c: RNAプロセッシング、d: 細胞周期制御、e: p53誘導遺伝子

ID	Description	Gene count	P-value
GO:0006396	RNA processing	10	2.2E-05
GO:0008380	RNA splicing	6	8.8E-04
GO:0006397	mRNA processing	6	1.6E-03
GO:0030162	regulation of proteolysis	2	2.9E-03
GO:0000079	regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	3	2.9E-03
GO:0016071	mRNA metabolic process	6	3.5E-03
GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	27	4.1E-03
GO:0006406	mRNA export from nucleus	2	4.2E-03
GO:0006334	nucleosome assembly	3	5.3E-03
GO:0048522	positive regulation of cellular process	12	7.0E-03
GO:0007001	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota)	6	8.1E-03
GO:0006405	RNA export from nucleus	2	8.4E-03
GO:0031497	chromatin assembly	3	9.0E-03
GO:0051276	chromosome organization and biogenesis	6	9.4E-03
GO:0051028	mRNA transport	2	1.5E-02
GO:0048518	positive regulation of biological process	12	1.5E-02
GO:0007067	mitosis	4	1.6E-02
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	4	1.6E-02
GO:0006497	protein amino acid lipidation	2	1.6E-02

表 3-1 Spt5ノックダウンの影響を受けた転写産物のGene Ontologyによる分類

図3-11で示された64個の遺伝子についてGene Ontologyによる分類を行った。表にはその分類によって抽出された集団の中で、有意差が大きかった上位20を示している。

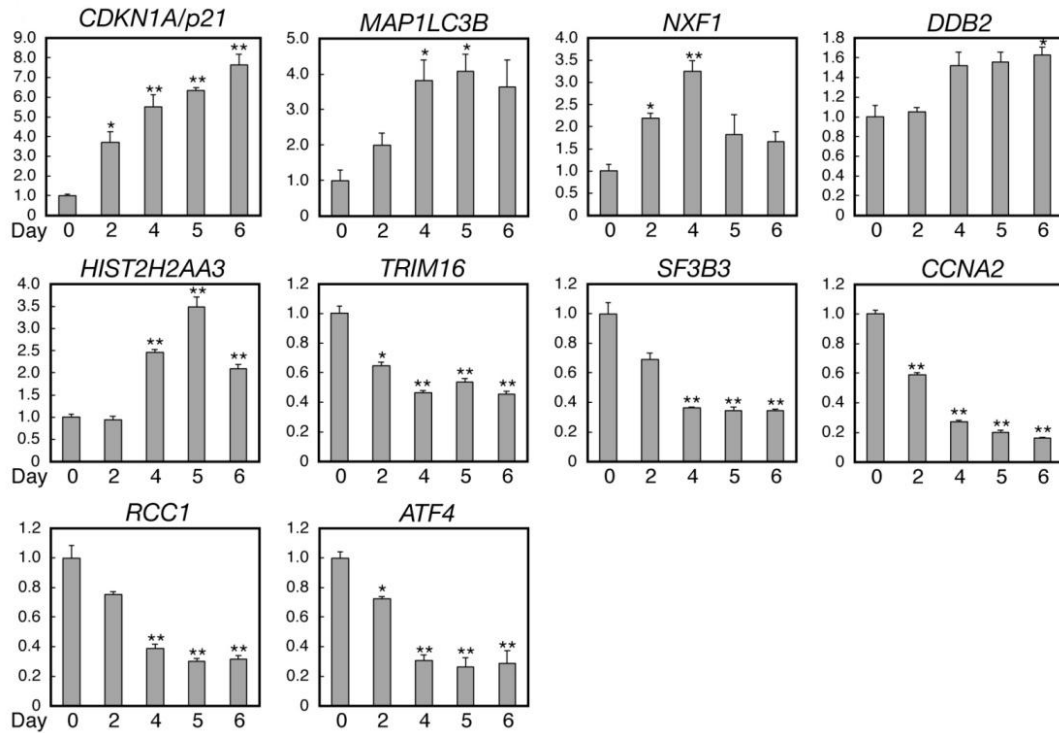


図 3-12 Spt5ターゲット候補遺伝子のリアルタイム定量PCR解析
 マイクロアレイによって抽出された64の遺伝子のうちから10の遺伝子を選び、Spt5ノックダウンの
 によって起こった転写量の変化をリアルタイム定量PCR解析によって確認した。数値は3
 回の独立した解析により求めた。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

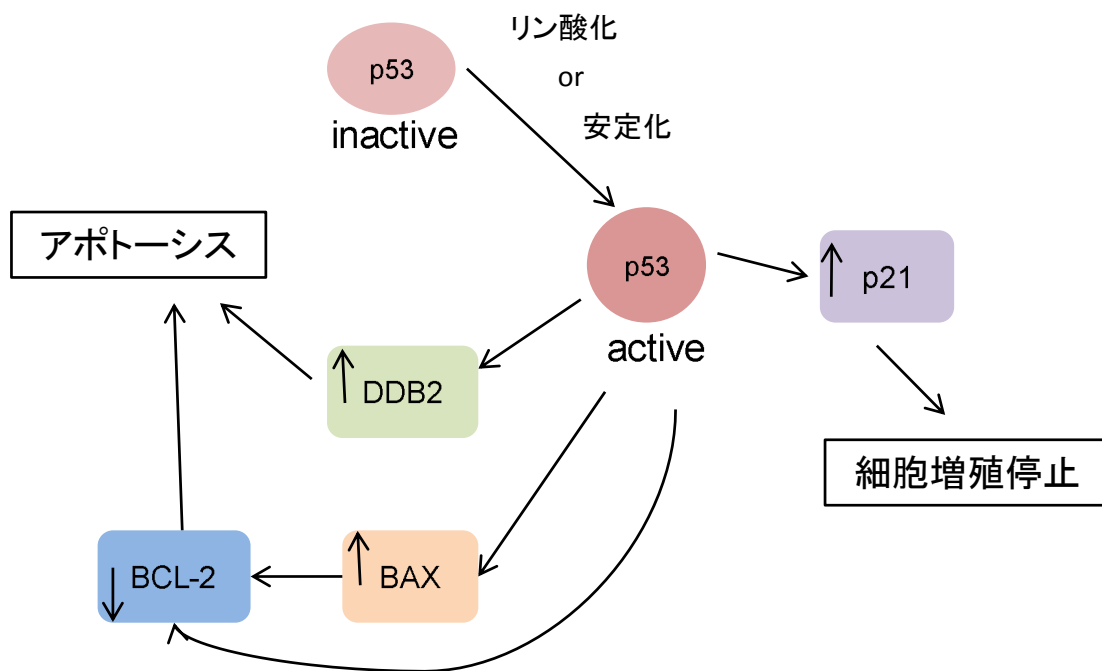


図 3-13 p53シグナル経路の概略図

本研究において着目した部分だけ抜粋した。p53タンパク質がリン酸化もしくは安定化されることによりp21が活性化され細胞増殖が停止する。また、DDB2やBAXといった因子も活性化され、最終的にアポトーシスが誘導される。DDB2はDNA修復に関わることによりアポトーシスを回避する役割もあるが、それと同時に、重度のDNA損傷が起こった際にはアポトーシスの修飾因子として機能することが報告されている。

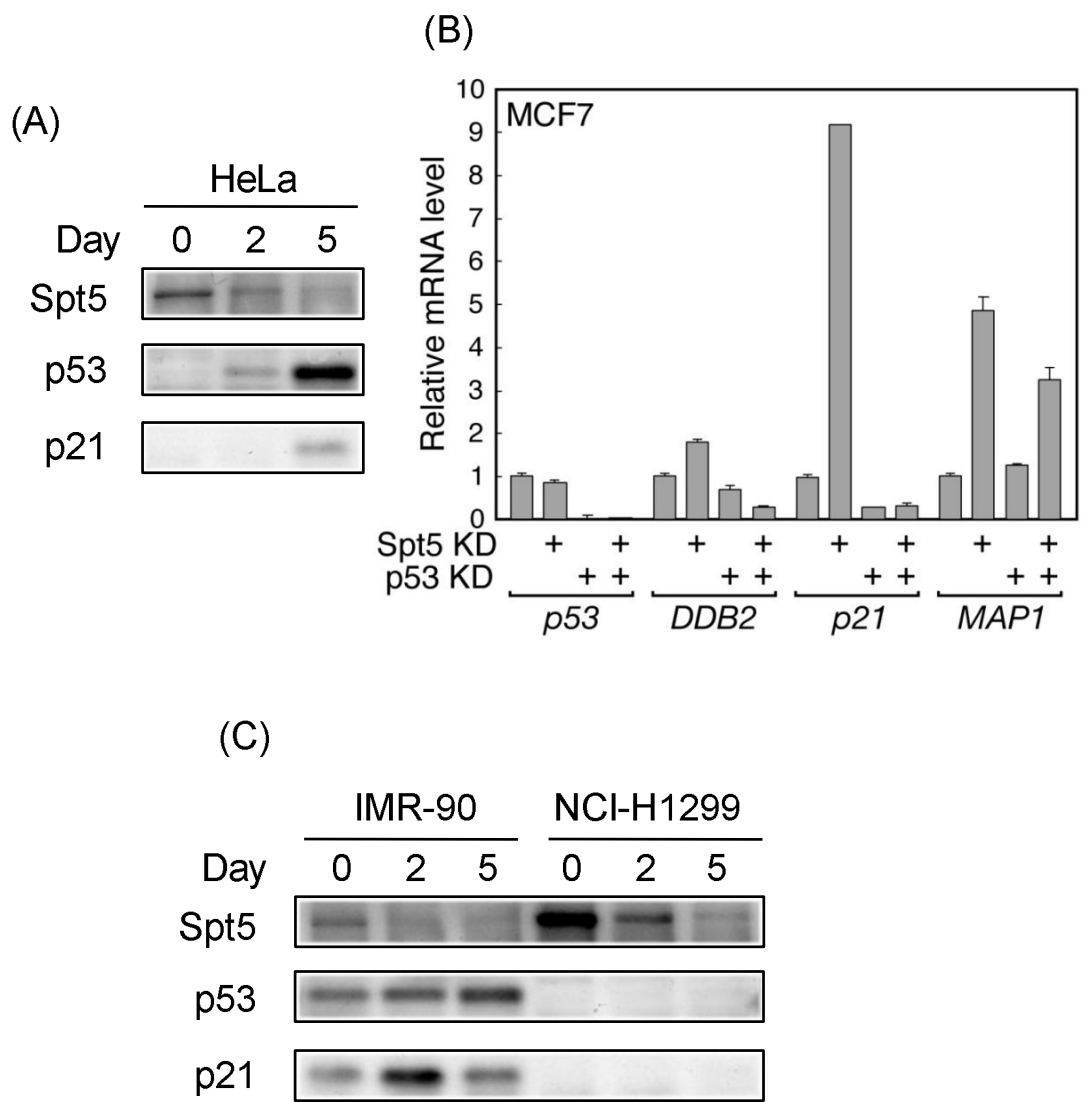


図 3-14 Spt5ノックダウンにより、p53シグナル経路が活性化する
 (A) HeLa細胞でSpt5を0,2,5日ノックダウンしたときのSpt5、p53、p21の発現をタンパク質レベルで解析した。(B) MCF7細胞でSpt5ならびにp53をノックダウンしたときの転写量の変化を調べた。ノックダウン誘導後4日目の細胞から全RNAを回収し、定量PCR解析を行った。(C) IMR-90細胞、NCI-H1299細胞Spt5を0,2,5日ノックダウンしたときのSpt5、p53、p21の発現をタンパク質レベルで解析した。(A),(C)それぞれイムノブロットングによって確認した。

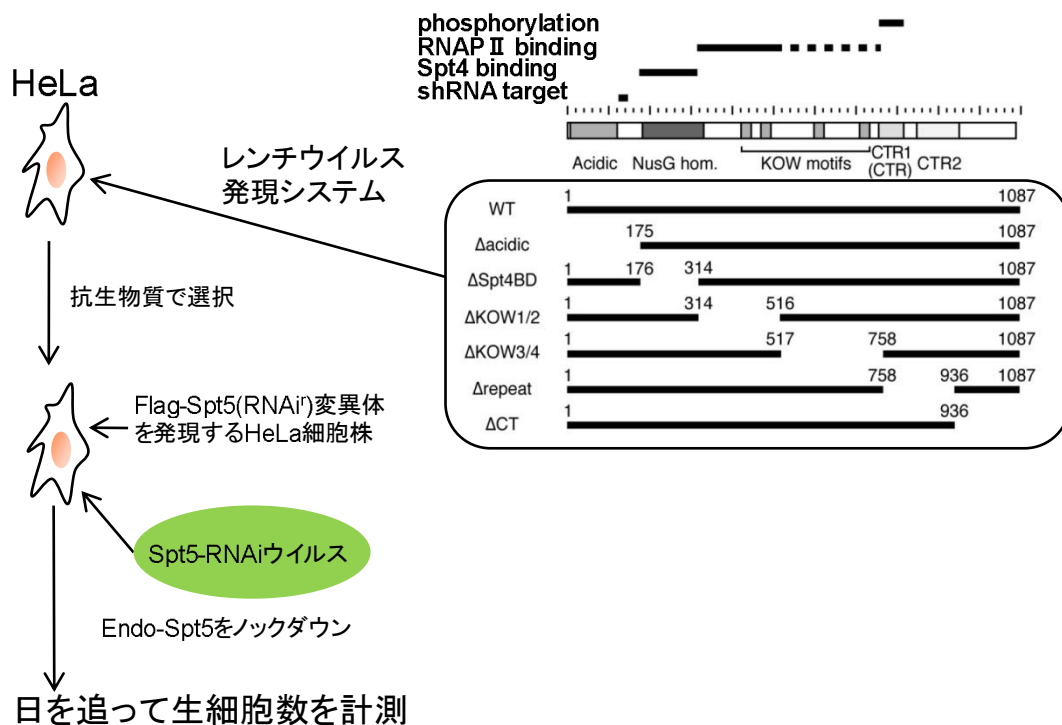


図 3-15 Spt5変異体を発現するHeLa細胞を用いた、内在性Spt5ノックダウンによる細胞死の相補実験(1)

Spt5 shRNAに耐性な各Spt5変異体を恒常的に発現するHeLa細胞株を樹立し、そこにSpt5-RNAiウイルスを形質導入することによって、どのSpt5変異体が細胞増殖を支持するかを調べることにした。変異体は、右図に示す7つ(WT, Δacidic, ΔSpt4BD, ΔKOW1/2, ΔKOW3/4, Δrepeat, ΔCT)を作製した。それぞれの変異体はN末端側にFlagタグが融合されている。

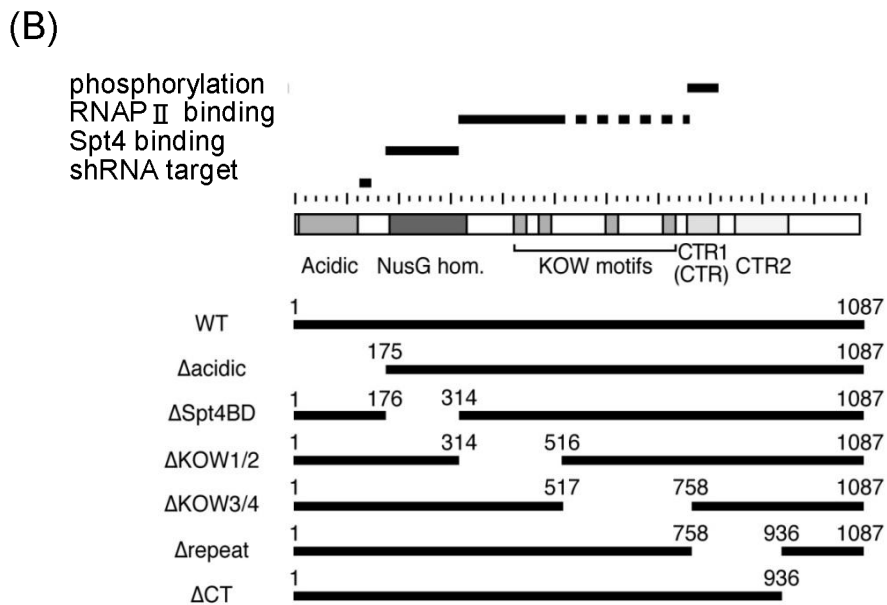
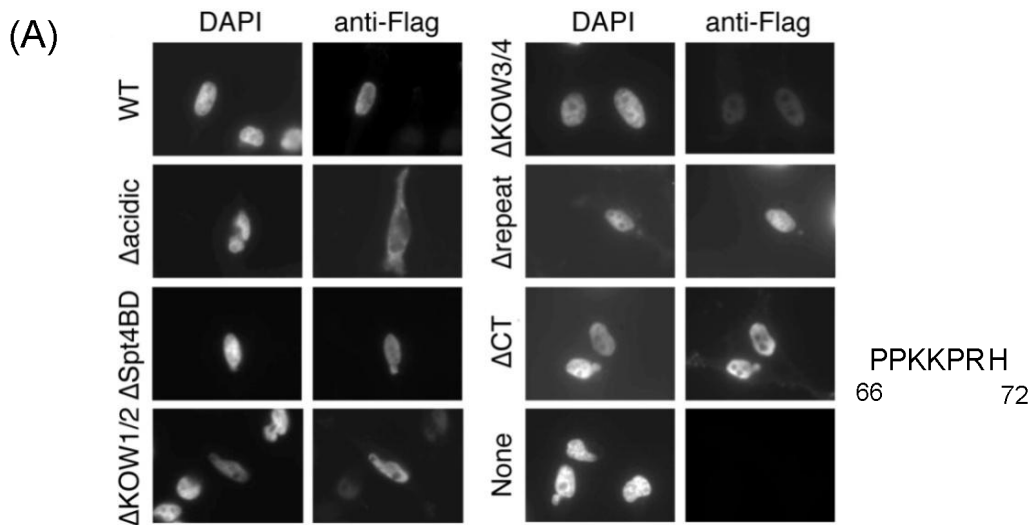


図 3-16 Spt5変異体を発現するHeLa細胞を用いた、内在性Spt5ノックダウンによる細胞死の相補実験(2)

(A) 各Spt5変異体を発現する細胞をDAPIならびにanti-Flag抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。Noneは抗生物質耐性マーカーのみを持つウイルスを形質導入した細胞である。右に示すのはSpt5の核移行シグナルである。(B) 用いた各Spt5変異体の構造を示している。

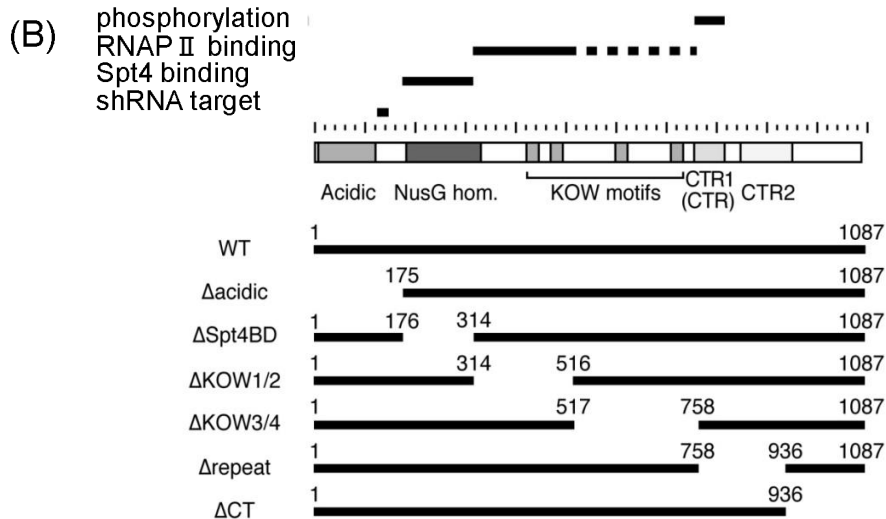
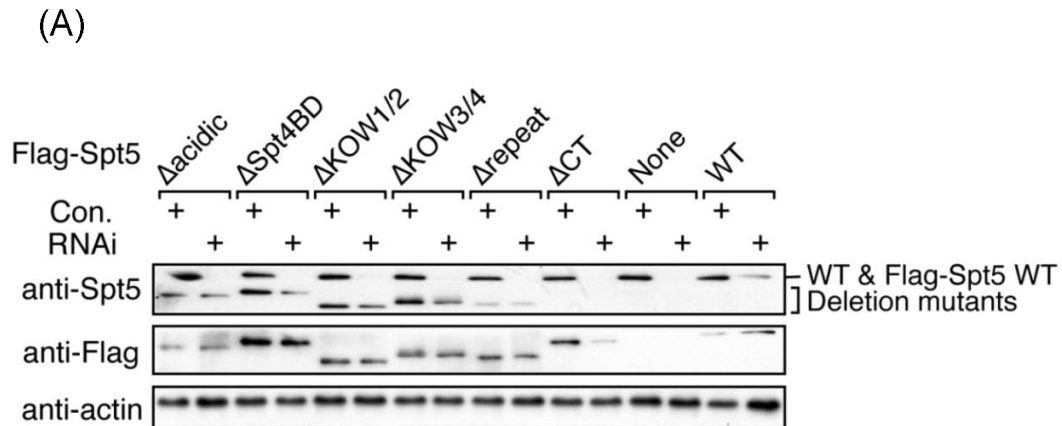


図 3-17 Spt5変異体を発現するHeLa細胞を用いた、内在性Spt5ノックダウンによる細胞死の相補実験(3)

(A) 各Spt5変異体を恒常的に発現するHeLa細胞にコントロールウイルス(Con.)ならびにSpt5-RNAiウイルス(RNAi)を形質導入した細胞から細胞抽出液を精製し、イムノブロッティングを行った。ΔCTにおいてanti-Spt5抗体によるシグナルが観察されていない。この変異体は抗体のエピトープを欠いていることがその理由である。anti-actinはローディングコントロールを示す。(B) 用いた各Spt5変異体の構造を示している。

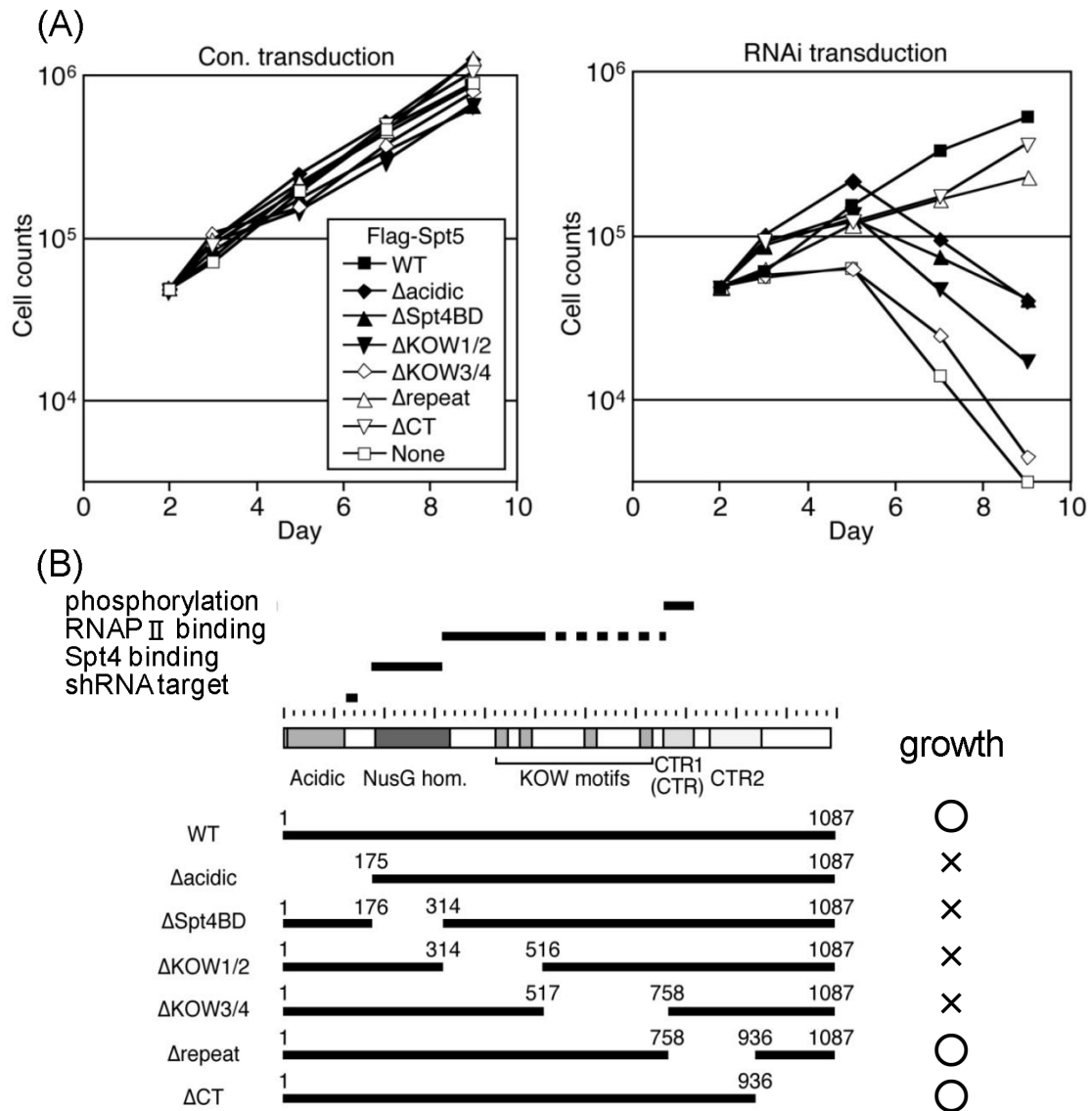


図 3-18 Spt5変異体を発現するHeLa細胞を用いた、内在性Spt5ノックダウンによる細胞死の相補実験(4)

(A) 各Spt5変異体を恒常的に発現するHeLa細胞コントロールウイルスならびにSpt5-RNAiウイルスを形質導入し、その2日後に細胞を新しいプレートに播き直し、形質導入後2,3,5,7,9日後に細胞を回収して、生細胞数の計測を行った。左図はコントロールウイルス、右図はSpt5-RNAiウイルスを形質導入した細胞の増殖曲線である。(B) 各Spt5変異体の構造を示している。また、正常な増殖を相補したかどうかを示している(growth)。

第4章 NELFのダイナミクス解析

4-1 緒言

NELFはNELF-A (NA)、NELF-B (NB)、NELF-C (NC) またはNELF-D (ND)、NELF-E (NE) の4つのサブユニットから構成される転写伸長因子である(図3-1)。NCはNDのN末端に9アミノ酸が付加したものであり、翻訳開始位置の使い分けによって同一のmRNAから生じる。NELFは1999年に転写伸長反応を抑制する因子として当研究室で精製・同定された(Yamaguchi *et al.*, 1999; Narita *et al.*, 2003)。

NELFはヘテロテトラマーの複合体を形成して機能していると考えられているが、それぞれのサブユニットごとに異なった役割を持っていることも分かっている。NAは転写伸長を行っているRNAPIIとNCの両方に結合している。NBはNCとNEに挟まれる形でそれぞれと結合している。そして、NEは新生のRNA転写産物と結合する(Narita *et al.*, 2003)。また、NBとNEは2因子でサブコンプレックスを形成していることも知られているが、その機能はまだわかっていない(Yamaguchi *et al.*, 2002)。しかし、以上のことは、すべてのNELFサブユニットがNELFの機能に何らかの不可欠な役割を果たしていると言える。

さらに、一部のNELFサブユニットは疾患との関連も示唆されている。例えば、NAはウォルフ・ヒルシュホーン症候群という精神遅滞疾患の候補遺伝子である*WHSC2*遺伝子にコードされている。NBは胃癌に関連があると言われているBRCA1のコファクターとして知られており(Ye *et al.*, 2001; Narita *et al.*, 2003)、NBの発現が抑制されると胃癌による余命短縮が導かれると示唆されている(Sun *et al.*, 2008)。逆に、上部消化器系の癌を起こすとNBとNEの発現が上昇することが示唆されている(Midorikawa *et al.*, 2002; McChesney *et al.*, 2006)。

NELFは発現量がさまざまな疾患によって変化するだけでなく、分子レベルにおいて、ターゲットとする遺伝子間でその役割が変わってくることが言われている。例えば、熱ショック遺伝子であるショウジョウバエ*hsp70*

遺伝子は、一過的な熱ショックによって発現誘導がかかるが、そのときに NELF が転写伸長複合体から離れていくことが分かっている。逆に、エストロゲンによって発現誘導がかかる遺伝子上では、NELF が転写伸長複合体にリクルートされるといった現象が見られる (Wu *et al.*, 2000; Aiyer *et al.*, 2004)。

また、mRNA の 3'プロセッシングに NELF が関与するために、NELF はキャップ結合タンパク質複合体 (CBC) と相互作用していることも示唆されている。CBC は多機能を持つ因子であり、RNA の成熟化を果たすために新生 mRNA の 5' キャップ構造と結合して RNA スプライシングや 3'プロセッシング、さらには核外へ mRNA を搬出する機能を果たしている (Izaurralde *et al.*, 1994; Flaherty *et al.*, 1997; Proudoot *et al.*, 2002; Narita *et al.*, 2007)。NELF と CBC が物理的相互作用をしていること、そして NELF が転写伸長段階の制御を行い、さらに CBC が mRNA の成熟化に関わるいくつかの段階で違った役割を果たしていることを考慮すると、mRNA プロセッシングの各段階は独立して行われているのではなく、転写反応と協調的に働いていると考える方が合理的である。

さらに、NELF は細胞核内に広範囲に局在しているだけでなく、特有の小さなドット状に局在を示し、それがヒストン遺伝子座に近接している (図 4-1)。分子レベルでの研究によって、複製依存的なヒストン mRNA の 3'プロセッシングが起こる際、NELF がそのプロセッシング機構にリクルートされることを当研究室が報告した。そして、この NELF が形成するドット状のものを NELF body と名づけた (Narita *et al.*, 2007)。NELF body は核内のオルガネラである Cajal body とも、大きさは異なるが形態学的に似ている特徴を持つことが分かっている。しかし、NELF body は完全には Cajal body と局在を共にするのではなく、細胞周期の S 期では異なる挙動を示すことも分かっている。ゆえに、NELF body と Cajal body は違ったタイプの核内オルガネラであると考えられている。

以上の過去の NELF に関する研究結果から、NELF が潜在的に様々な機能を持っていることがわかってきていたが、その多くが *in vitro* での結果からわかったものであった。そこで、*in vitro* で行われた機能解析の結果から

派生して、細胞生物学的な NELF の機能解析を行うことにした。そのツールとして、Flag タグならびに蛍光タンパク質を融合させた NELF の各サブユニットを細胞内で発現するためのプラスミドセットを作製し、それらを細胞内で恒常的に発現させることにより、NELF サブユニットの細胞内におけるダイナミクスを調べることにした。また、細胞内で NELF をロックダウンすることによって、その細胞が形態学的にどのような動態を示すのかを観察し、細胞内での NELF の生理学的な機能を解明することを本研究の目的とした。

4-2 材料と方法

4-2-1 プラスミドの構築

N 末端に Flag タグをつけた NA (Flag-NA)、さらにそのコンストラクトの C 末端に蛍光タンパク質である EYFP タグをつけた NA (FP-NA) を発現させるためのプラスミドは"Narita *et al.*, 2007"で使用したものをそのまま使用した。他のサブユニットに関しても"Narita *et al.*, 2007"で使われた方法で作製した (Flag-NB、Flag-NC、FP-NB、FP-NE)。さらに、各 FP-NB 欠損変異体(NB の 9-150 番目 ($\Delta 1$)、151-296 番目 ($\Delta 2$)、297-430 番目 ($\Delta 3$)、431-573 番目 ($\Delta 4$) のアミノ酸をそれぞれ欠損した変異体)を細胞内で発現するプラスミドも同様に作製した。また、タグの付いていない NB を発現するプラスミド、FP-histone H4 を発現するプラスミドも同様の方法で作製した。Flag-NE を発現するプラスミドは"Yamaguchi *et al.*, 2002"で使用したものをそのまま使用した。また、EYFP ではなく EGFP タグを C 末端側につけた FP-NE を発現するプラスミドは Flag-NE の ORF を pEGFP-C1 (Clontech) に挿入して作製した。N 末端に Flag タグをつけた HIV Rev (Flag-REV) を発現するプラスミドは、Flag-Rev の cDNA を pcDNA3 (invitrogen) に挿入して作製した。

4-2-2 細胞培養

4-2-1 項のプラスミドセットを HeLa 細胞にリポフェクション法によってそれぞれ導入し、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の G418 存在下で培養した。G418 に対して耐性をとるクローンを選択して、各タンパク質を恒常的に発現する細胞株を作製した。細胞は全て 10%濃度の FCS 含有 DMEM 培地で培養した。また、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。転写阻害剤を使った実験では、Actinomycin D と DRB を用い、培地に添加することで行った。

4-2-3 抗体

抗体は以下のものを使用した。

anti-NA 抗体、anti-NB 抗体、anti-NC 抗体、anti-NE 抗体 (Yamaguchi *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2001; Narita *et al.*, 2003; Aiyar *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2007) , rabbit anti-Flag 抗体 (Sigma, F7425)、mouse anti-Flag M2 抗体 (Sigma, F1802)、anti-IQGAP 抗体 (Santa Cruz, SC-8738)、anti-GRP94 抗体 (Santa Cruz, SC-1794)、anti-SMN (Survival Motor Neuron) 抗体 (BD Biosciences, 6110646)。

4-2-4 免疫染色

細胞を半径 15mm のカバースリップ上で培養し、2% パラホルムアルデヒドで固定化した後、0.5% NP-40 で透過処理した。そして、2% BSA でマスキング処理した後、各 1 次抗体と反応させた。次に、2 次抗体として Alexa Fluor-594 または Alexa Fluor-488 (Molecular Probes) の各抗体を反応させ、最後に DAPI で共染色し、ORCA-ER デジタルカメラ (Hamamatsu) を搭載した BX51 fluorescence micro scope (Olympus) で観察した。

細胞膜・細胞質の染色には、Alexa Fluor-594 が結合した wheat germ agglutinin (WGA) (Molecular Probes) を使用した。

4-2-5 免疫沈降・イムノプロットティング

免疫沈降実験には anti-Flag M2 抗体と HeLa 細胞ならびに Flag-NE、FP-NB、各 FP-NB 変異体を発現する細胞株の細胞核抽出液を使用した。細胞核抽出液は dignam 法を採用した (Dignam *et al.*, 1983)。1mg のタンパク質を含む各細胞核抽出液と、NE バッファー (20 mM HEPES-NaOH pH

7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.1% NP-40) で平衡化した 20 μ g 容量の anti-Flag M2 アガロースビーズ (Sigma) を 4°C で 2 時間反応させた。その後、ビーズを 500 μ l の NE バッファーで 5 回洗浄し、0.1 mg/ml 濃度の Flag ペプチド (Sigma) を含む 20 μ l の NE バッファーで 4 回、抗体に結合したタンパク質の抽出操作を行った。その抽出物を使ってイムノブロッティングを各抗体で行った。

4-2-6 細胞種間ヘテロカリオン解析

この操作は共同研究者に行ってもらった。

1-2x10⁵ 個の NIH 3T3 マウス線維芽細胞を 15mm カバースリップ上に播き、オーバーナイトで培養して細胞を接着させた。そこに、FP-NA,FP-NB,FP-NC,FP-NE,Flag-NE,FP-H4 それぞれを恒常的に発現させた HeLa 細胞と、一過的に Flag-REV を発現させた HeLa 細胞を、一種類ずつ、NIH 3T3 細胞と 1:1 の細胞数比で播いた。新たに播いた細胞をカバースリップに接着させるために 3 時間置いた。その後 90 秒間 PEG-1500 (Roche) で細胞接着を誘導した。その後、100 μ g/ml 濃度のシクロヘキシミド (CHX) を添加した培地で 4 時間培養し、新たなタンパク質合成の阻害処理を行った。また、CHX の効果を確認するため、コントロール実験として CHX を添加した培地に放射性同位体 ³⁵S を加え、パルス・チェイス・ラベリングを行った。これにより、新規のタンパク質合成が阻害されているかを確認した。

以上の処理をした細胞を anti-SMN 抗体、rabbit anti-Flag 抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡を用いてイメージ・キャプチャーした。

4-2-7 蛍光顕微鏡を使った生細胞の観察

この操作は共同研究者に行ってもらった。

FP-NA を恒常的に発現する HeLa 細胞を 40mm カバースリップ (Bioptechs) 上に播き、80%コンフルエントになるまで培養した。そこでそのカバースリップを FCS2 live cell chamber(Bioptechs)に装着し、これを Olympus IX80 倒立顕微鏡のステージに乗せた FCS2 stage adaptor(Bioptechs) に結合させた。10%濃度の FCS と ampicillin/streptomycin を添加した L-15 メディウム(Invitrogen)をカバースリップ上に Micro-Perfusion Pump(Bioptechs)を使って流し、CO₂なし、37°Cの状態増殖のコンディションを維持させたまま培養した。コンディションの維持には FCS2 controller(Bioptechs)を使用した。イメージ・キャプチャーは MetaMorph software Ver. 6.26 を使用して行った。

4-2-8 細胞周期の同調

この操作は共同研究者に行ってもらった。

M 期から G1 期に細胞周期を同調させるため、ダブル・チミジン・ブロック法を採用した。まず細胞を 2 mM チミジン含有の培地で 12 時間培養し、その後チミジンなしの培地で 10 時間培養、さらに 2 mM チミジン含有の培地で 12 時間培養して G1/S 期に同調させた。その後チミジンなしの培地に戻してさらに 9 時間培養し、M/G1 期に同調させた。同調しているかどうかの確認は可視光による観察ならびに FACS 解析により行った。

4-2-9 NE のノックダウン実験

これは"Narita *et al.*, 2007"と同様の方法を使って行った。イムノブロットティングに使った細胞核抽出液、細胞抽出液は NE ノックダウン誘導後 5 日目の細胞から調製した。

4-3 結果

4-3-1 間期にある細胞内で NELF は核に局在する

in vivo での NELF の知見を得るために、まず間期における細胞内での NELF 各サブユニットの局在を調べた。HeLa 細胞をそれぞれの NELF サブユニットに対する抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡でその局在を観察した。

当研究室における過去の研究から、NA が核内に局在し、さらに NELF body と呼ぶシグナルが集中しているドット状のものが核内に確認できていたので (Narita *et al.*, 2007)、他の内在性 NELF サブユニット (NB、NC、NE) の細胞内での局在も同様に調べた (図 4-2)。すると、NA と同様、他のサブユニットも核内に局在し、NELF body が形成していることを確認することができた。

4-3-2 過剰発現した NELF-B と NELF-C は核と細胞質に局在する

次に、FP-NA、FP-NB、FP-NC、FP-NE タンパク質をそれぞれ恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立し、それぞれのタンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した (図 4-3)。すると、4 つの外来性 NELF サブユニットは内在性の NELF サブユニットと似た発現パターンを示すように見えた (図 4-3 (B))。しかし、FP-NB を発現する細胞では FP-NB タンパク質が核だけでなく、細胞質にも局在している細胞も確認された (図 4-3 (C))。さらにその中には、FP-NB タンパク質が核よりも細胞質の方に量的に多く局在している細胞も存在した。anti-Flag 抗体を用いた免疫沈降実験により、FP-NB タンパク質が内在性 NELF 複合体に組み込まれているのを確認したことから (未発表データ)、FP-NB が細胞質に局在している理由が Flag タグならびに EYFP タグの影響によるものなのではないかと考えた。この疑問に答えるため、野生型 NB を発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入して一過的に発現させ、その後 anti-NB 抗体で免疫染色し、NB タンパク質の

局在を蛍光顕微鏡で観察した (図 4-3 (D))。すると、前述の FP-NB を恒常的に発現させたときと同様に、細胞質に野生型 NB タンパク質の局在が観察された。

また、FP-NC を恒常的に発現する細胞でも FP-NC タンパク質が細胞質に局在しているのが観察された (図 4-3 (C))。しかし、FP-NB と FP-NC の動態の間には 2 つの違いがあった。1 つめは、FP-NC タンパク質の細胞質内での発現レベルは核内での発現レベルを超えないこと。そして 2 つめは、発現レベルは低いものの、細胞質に FP-NC タンパク質の局在が見られる細胞数の割合が多いことである。これらの結果より、NELF が核内だけでなく細胞質内でも機能を果たしている可能性があるとして示唆された。そこで私は、この局在の違いが意味することをさらに解析することにした。

4-3-3 NELF は核-細胞質間輸送活性を持つ

細胞質内で FP-NB、FP-NC が発現していることが観察されたが、これは NELF の *in vivo* における機能について新しい疑問を投げかける結果となったと考えている。それは、NELF が核-細胞質間輸送に関係があるのではないかという疑問である。既に NELF の相互作用因子であり、核-細胞質間輸送に関わることが知られている CBC や BRCA1 が定常状態では主に核に局在していることが確認されているので、NELF または NELF のサブユニットのいくつかも同様に輸送に関与しているのではないかと考えられる (Visa *et al.*, 1996; Narita *et al.*, 2007)。

そこで、FP-NB と FP-NC タンパク質間での局在の違いが輸送効率、もしくは NELF サブユニット間における発現レベルの不均衡から来るものではないかと仮定した。この仮定を検証するため、まず NELF サブユニットの核-細胞質間輸送活性を解析した。NIH 3T3 細胞と外来性 NELF サブユニットを発現する HeLa 細胞株とを融合させて、細胞種間ヘテロカリオン解析を行うことで、各 FP-NELF サブユニットの輸送活性を検討した (図 4-4、図 4-5)。輸送活性のネガティブコントロールとして、FP-H4 を恒常的に発

現する HeLa 細胞株を、ポジティブコントロールとして、輸送活性があることがすでに知られている Flag-REV を一過的に発現する HeLa 細胞を使用した。また、anti-SMN 抗体で免疫染色することで、細胞形態を特定し、その上で DAPI 染色をすることで HeLa 細胞と NIH 3T3 細胞が融合している細胞を特定した (NIH 3T3 細胞の核にはスポット上の DAPI によるシグナルが見える)。その結果、コントロールである FP-H4 は輸送されず、Flag-REV は HeLa 細胞の核から NIH 3T3 細胞の核へと輸送されていることが分かった。そこで、各 NELF サブユニットの輸送活性を観察したところ、当初は 4-3-2 項の結果から FP-NB と FP-NC が核-細胞質間を行き来すると予想していたのだが、実際には FP-NE が積極的に輸送され、FP-NA も FP-NE よりは程度が低い、輸送されていることが確認された。そして、FP-NB と FP-NC はさらに低い程度でしか輸送されていないことも確認された。図 4-6 にその輸送程度を定量化したデータを示す。FP-NE はポジティブコントロールとしておいた Flag-REV よりも高頻度で輸送されていた。この解析は CHX で処理して行っていることから、HeLa 細胞内で新しく合成された FP-NE が NIH 3T3 細胞側に輸送されたものではない (^{35}S -パルス・チェイス・ラベリングした結果 (図 4-4 (B)) より)。しかし、この FP-NE が輸送されているという観察の結果が、過剰発現させた FP-NE の EGFP タグの影響によるものである可能性も否めない。そこで、同様に Flag-NE を発現する HeLa 細胞を用いてヘテロカリオン解析を行った。しかし、FP-NE の時に得られた結果と変化はなかった (未発表データ)。FP-NB ならびに FP-NC も微量ながらも NIH 3T3 細胞の核に輸送されることが観察された。しかし、これは HeLa 細胞の核から輸送されたものではないと考えている。これは CHX で処理する前、そして細胞融合する前に HeLa 細胞の細胞質に存在していた微量の FP-NB または FP-NC が、NA や NE、そして何か別の因子によって NIH 3T3 細胞核に輸送されたものであると推測している。以上の結果から、NELF のすべてのサブユニットではなく一部のサブユニットに核-細胞質輸送活性が存在することが示唆された。

4-3-4 NELF のサブユニット間の存在比が細胞内局在を決定する

FP-NB や FP-NC といった外来性の NELF サブユニットは核だけでなく、細胞質にも局在していたが (図 4-3)、外来性 NELF を過剰発現していない HeLa 細胞内では NELF のすべてのサブユニットは核に局在していた (図 4-2)。そこで、NELF は NA-NC-NB-NE という形でそれぞれ結合し複合体を形成しているので (Narita *et al.*, 2003)、核-細胞質輸送活性を持つ NA と NE は、NB と NC それぞれの細胞質から核への移行に関与しているのではないかと考えた。さらに、FP-NB と FP-NC が細胞質に局在するのは、内在性の NB や NC に比べて過剰に発現していることが原因であり、核ではなく細胞質に局在する理由と、細胞内に存在する NELF 各サブユニット間の存在量比との間に何か関係あるのではないかと考えた。これらの推測を検討するために、細胞内で FP-NB を発現させる DNA コンストラクトと、Flag-NE を発現させる DNA コンストラクトを、同一の HeLa 細胞内で一過的に発現させた (図 4-7)。FP-NB は一定量発現させるのに対し、Flag-NE は段階的に発現量を増やし、その発現量の比によって FP-NB の細胞内における局在に変化が見られるかどうかを解析した。すると、Flag-NE の量が多くなればなるほど、核に局在する FP-NB の量に対する細胞質に局在する FP-NB の量の割合が減少することが分かった。これは、FP-NE が FP-NB の核移行に関与しているということを示唆する結果となった。さらに同様の実験をさまざまな NELF サブユニットの組み合わせで行った。コントロールとして、何も ORF が挿入されていない pBluescript プラスミドを FP-NB ならびに FP-NC とそれぞれ同時にコトランスフェクションした細胞の観察も行った (図 4-8)。その結果、Flag-NE は細胞質に FP-NB が局在している細胞数の割合を減らし、Flag-NA は細胞質に FP-NC が局在している細胞数の割合を減らす役割があることが分かった。そして、FP-NB と Flag-NC の組み合わせ、ならびに FP-NC と Flag-NB の組み合わせを同一の細胞で一過性に発現させても、蛍光タンパク質が細胞質に局在している細胞数の割合の変化は見られなかった。また、Flag-NA、Flag-NC、FP-NB の 3 つを同時に同一細胞内で一過的に発現させると、細胞質に FP-NB が局在してい

る細胞数の割合が減少することが分かった。これはおそらく、Flag-NC が Flag-NA と FP-NB にサンドイッチされるようになって複合体を形成し、結果として FP-NB が核に移行されたからであると考えられる。さらに、Flag-NB、FP-NC、Flag-NE の 3 つを同時に同一細胞内で一過的に発現させた場合、FP-NC が細胞質に局在している細胞数の割合が減少した。これも NC-NB-NE という複合体が形成され核への移行が行われたからであると考えられる。以上の結果は、NELF が NA-NC-NB-NE という構造で複合体を形成しているという過去のデータをもとに考えても合理的な結果であると言える (Narita *et al.*, 2003)。

さらに、NE の機能によって NB が核へ移行されるという考えを支持するための検討を行った (図 4-9)。FP-NB の NB コード領域を一部欠損させた変異体を細胞内で発現するプラスミドを作製した (図 4-9 (A))。FP-NB 変異体コンストラクトは NB のコード領域を 1/4 ずつ欠損させた計 4 つ ($\Delta 1$ - $\Delta 4$) である。それぞれ 4 つの変異体を発現するプラスミドを HeLa 細胞内で一過的に発現させた。すると、 $\Delta 2$ と $\Delta 3$ の FP-NB 変異体を発現させたときは、細胞質にのみ蛍光タンパク質によるシグナルが観察された (図 4-9 (B))。つまり、 $\Delta 2$ と $\Delta 3$ の FP-NB 変異体は NE と結合できず、その結果、核へ移行されずに細胞質にとどまっていることが示唆された。この結果を裏付けるために、anti-Flag 抗体と、上記 4 種類の細胞の抽出液を使って免疫沈降実験を行い、FP-NB 変異体と Flag-NE タンパク質が結合をしているかどうかを調べた。また、ポジティブコントロールとして、全長の FP-NB を発現している細胞の抽出液を、ネガティブコントロールとして、HeLa 細胞の核抽出液を用いた免疫沈降実験も同時に行った。その結果 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ の FP-NB 変異体は Flag-NE と共沈してこないことが分かった (図 4-9 (C))。以上の結果から、NB が NE の作用により核へ移行されるためには、NB と NE が結合する必要があることが示唆された。

4-3-5 生細胞内における NELF body の物質動態

NELF body は 1 つの細胞につき核内に 1-4 個存在する(Narita *et al.*, 2007)。ここでは、FP-NA を発現する生細胞を蛍光顕微鏡で観察をすることで、NELF body の動態を追跡した(図 4-10 (A))。NELF body は細胞周期を通して、ほとんどの時期で存在が確認できたが、有糸分裂に入る直前に NELF body が消え(9 時間 20 分と 10 時間との比較より)、そして、細胞分裂の終了後に再び現れることが観察された(14 時間 40 分と 16 時間 20 分との比較より)。この有糸分裂直前に NELF body が消える現象は、同時期に見られる核内オルガネラである cajal body とは別の動態であることが分かった (図 4-10 (B))。この結果は FP-NA と cajal body のマーカータンパク質である coilin との共染色により明らかとなった。NELF body はたびたび Cajal body と隣接していることが分かっていたが(Narita *et al.*, 2007)、今回の解析により、両者が常に隣接しているわけではないことが明らかとなった。

次に、NELF は転写伸長因子であることから、細胞培養液中に転写阻害剤を加えたときに NELF body の動態がどうなるかを観察した(図 4-10(C))。転写阻害剤として、DNA にインターカレートする Actinomycin D と転写伸長反応阻害剤である DRB を採用した。Actinomycin D 存在下では、過去の報告にあるように coilin は核小体キャップに局在を変えており(Haaf *et al.*, 1996)、NELF body は消失していた。DRB 存在下では NELF body の動態に変化は見られなかった。

4-3-6 NELF-B と NELF-C は有糸分裂終期に midbody に局在する

次に、有糸分裂中における NELF サブユニットの局在の解析を調べた(図 4-11)。まず、細胞周期を同調させるためにダブル・チミジン・ブロック法を採用した。HeLa 細胞をダブル・チミジン・ブロック法により G1/S 期に同調させた後、チミジンなし培地で培養してブロックを解除し、さらに 9 時間培養して、細胞を有糸分裂期に移行させた。有糸分裂期に移行しているかどうかは可視光による観察ならびに FACS 解析により確認した (図 4-11

(A))。細胞周期を同調させた細胞を、NELF の各サブユニットに対する抗体で免疫染色し、各サブユニットの局在を蛍光顕微鏡で観察した (図 4-11 (B))。その結果、有糸分裂終期に NB と NC が核に局在するだけでなく、特徴的な局在をとることがわかった。これは、細胞分裂中のペアになっている細胞と細胞とをつなぐ橋のような特有な形の局在である。逆に、NA と NE は NB と NC のような特徴的な局在は示さず、核にのみ局在していた。

それでは、橋のような構造の正体は何なのだろうか。文献を参考に調べた結果、この構造は midbody というものと似ていることが分かった。midbody とは細胞質分裂中にできる溝によって一時的に生じる紡錘体微小管構造を含む構造体である (Mullins *et al.*, 1982; Skop *et al.*, 2004)。そこで、この構造は midbody であるのかどうかを調べた。anti-NB 抗体と、midbody 構成タンパク質であることがすでに分かっている IQGAP1 タンパク質ならびに GRP94 タンパク質 (Skop *et al.*, 2004) に対する抗体を使って免疫染色し、その細胞を蛍光顕微鏡で観察した (図 4-11 (C))。すると、anti-NB 抗体と anti-IQGAP1 抗体、anti-NB 抗体と anti-GRP94 抗体由来のシグナルがそれぞれ重なることが分かった。この結果から、有糸分裂終期に NB と NC が midbody に局在していることが示唆された。

4-3-7 NELF ノックダウンは細胞と核の肥大化、多核化を引き起こす

次に、HeLa 細胞内での NELF の機能を探るため、NELF のノックダウンを行った (図 4-12)。過去の研究結果から、NELF を細胞内でノックダウンすると、細胞増殖の遅延が起こることが分かっていることから (Narita *et al.*, 2007)、この細胞は細胞分裂や細胞形態に異常をきたしているのではないかと推測した。そこで、NE をノックダウンした HeLa 細胞を詳細に観察すると、細胞の肥大化とそれに伴って生じる核の肥大化、そして多核化が観察された (図 4-12 (A))。そして NE のノックダウンしたことによって異常を生じた細胞の数を定量化した (図 4-12 (B))。WGA 染色によって細胞の

全体像が観察できる。これと DAPI との共染色により、ひとつの細胞の中に複数の核が存在している細胞、さらに、核の大きさが定常状態のものに比べて大きくなっている細胞が観察できた。また、細胞の大きさ自体も大きくなっていることも分かった。異常の起こった細胞を定量化すると、NELF をロックダウンした細胞はコントロールの細胞に比べて、前述の異常が起こっている細胞の割合が多いことが分かった。

4-4 考察

本研究では、細胞生物学的手法を用いて NELF の細胞内におけるダイナミクスを解析した。まず、NELF body がすべての NELF サブユニットに対する抗体での免疫染色によって見出された。次に、NA と NE に核-細胞質間輸送活性があること、そして、NB と NC が核移行するのに NA と NE が必要であることを見出した。また、転写阻害剤である Actinomycin D を細胞培地に加えると、NELF の局在に変化が見られた。さらに、細胞質分裂中に生じる midbody という構造体に NB と NC が局在していることを発見した。最後に、NELF をロックダウンした細胞は細胞の肥大化、細胞核の肥大化、多核化が起こることを発見した。

NB と NC が細胞質そして midbody に局在していること、ならびに NA と NE が核-細胞質間輸送活性を持っていることはとても面白い事象である。これまでは、NELF は核内で転写制御に関わるタンパク質であると認識されているにすぎなかった。また、機能的の観点から見ても、NELF のサブユニットが核-細胞質間輸送することを発見したことは別の面白い問題を提示している。例えば、NE は RNA を認識するモチーフ (RRM) を C 末端領域に持っている。また、mRNA に結合し、核外輸送を含む mRNA の成熟化を助ける CBC と NE は直接結合するので (Narita *et al.*, 2007)、NE は RNA の核外輸送に重要な役割を果たすのではないかと推測している。NELF と CBC は、mRNA のキャッピングやスプライシング、3'プロセッシング、そして核外輸送といったプロセスのいくつかに関わっていることが分かっているので (Izaurralde *et al.*, 1994; Flaherty *et al.*, 1997; Proudfoot *et al.*, 2002; Narita *et al.*, 2007)、このような推測は、転写反応の様々なステージが同時進行で行われているという近年提唱されているモデルを支持することになると考えている。

また、改めてアミノ酸配列のみから導き出される細胞内での NELF 各サブユニットの局在予測を、以下のオンラインソフトを使って行った。

(http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/eu_predict.htm)

(<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/submit.html>)

(<http://psort.nibb.ac.jp/form.html>)

局在予測を行った結果、NA と NE は核に、NB と NC は細胞質に存在すると予測された。さらに、本研究の結果から、NELF サブユニット間の理想的なモル比が NB ならびに NC が核に移行されることに重要であるということが示唆された (図 4-7、図 4-8)。NELF が細胞内でストイキオメトリーに合ったサブユニット間のモル比で構成されているという過去のデータと共に考えると (Yamaguchi *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2002)、やはり、サブユニット間の理想的なモル比が NB と NC が適切に核に移行されるのに重要であると思われる。そしてこの各サブユニット間のモル比が理想的であることが、間期において内在性 NB と NC が核内のみに存在することを支持すると考えている。

次に、転写阻害剤である Actinomycin D ならびに DRB で細胞を処理したときの、細胞内での NELF の局在を観察した結果について考える。2 種類の転写阻害剤を別々に培地に加えたとき、NELF の局在は、ふたつの転写阻害剤の間で違う動態を示した。Actinomycin D を加えたときは NELF body は消滅し、DRB を加えた場合は定常状態と同じ動態を示した。この観察結果の違いは、Actinomycin D と DRB との間で転写阻害機構が違うことから生じたものであると考えている。NELF はリン酸化されていない RNAP II、または RNAP II の最大サブユニット Rpb1 が持つ CTD の繰り返し配列である YSPTSPS の 5 番目のセリンがリン酸化されている RNAP II と結合することにより転写伸長複合体を形成するが、CTD の YSPTSPS 配列の 2 番目と 5 番目が共にリン酸化された RNAP II とは複合体を共有しない (Wada *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1999)。DRB は P-TEFb による RNAP II の CTD の 2 番目のセリンへのリン酸化を阻害する働きがあり、その働きによって RNAP II を鋳型 DNA のプロモーター近傍領域にとどまらせる。その結果、転写伸長阻害が起こる。つまり、DRB の機能によって NELF は RNAP II と結合したままになっている。その結果として、定常状態と動態を異とすることにはならなかったと考えている。この考えを支持する実験結果

として、DRB とは別の P-TEFb リン酸化活性阻害剤であるフラボピリドールを HeLa 細胞培養中の培地に加え、その細胞と anti-NELF 抗体を使った ChIP 解析の結果がある。細胞をフラボピリドールで処理すると、RNAP II のリン酸化が抑えられていると同時に、*FOS* 遺伝子のプロモーター近傍領域に NELF がより多く局在することがわかった(Yamada *et al.*, 未発表)。一方、Actinomycin D で細胞を処理し同様に ChIP 解析を行っても、RNAP II がプロモーター領域にとどまっていることが知られているため(Becker *et al.*, 2002)、Actinomycin D を処理しても、NELF body の動態に変化は見られないだろうと予想していた。しかし、Actinomycin D は、DRB とは逆に P-TEFb の RNAP II に対するリン酸化活性を促進し、その結果、リン酸化状態の RNAP II の量を増加させる(Casse *et al.*, 1999)。ゆえに、NELF が RNAP II から離れてしまい、そのことが細胞内における NELF 由来のシグナルの拡散や NELF body の消滅に関係しているのではないかと考えている。そして、NB と NC は細胞質へ移行され、midbody を構成する因子と相互作用することにより midbody に局在していたのではないかと考えている。

次に、NB と NC が細胞質分裂時に生じる midbody に局在していたことと、NELF をノックダウンした時に生じる細胞分裂の異常ならびに、細胞・細胞核の肥大化と多核化 (図 4-12) についての関連を考える。

核の形成異常には NELF のどのサブユニットが関連しているのかを同定するために、それぞれのサブユニットを 1 つずつノックダウンして解析する必要があると考えた。しかし、個別の解析は今のところ難しいと考えている。というのも、NA、NB、NE のうちの 1 つだけノックダウンしても、全 NELF サブユニットの発現量が総じて低下するからである (Sun *et al.*, 2008; Narita *et al.*, 2007; 未発表データ)。それにもかかわらず、全 NELF サブユニットが核の形成異常に関わっているとは考えにくい。細胞継代によって核形成の異常が起きた細胞は排除されることもあるが、おそらく NELF が細胞分裂を制御するのではなく、実際に制御に関わる因子の何か補助的な働きだけをすると考えるのが妥当だろう。この考えを支持する実験結果として、有名な腫瘍抑制因子であり、かつ NB と相互作用することが知られている BRCA1 (Ye *et al.*, 2001) や、BRCA1 のコファクターである BARD1 に

関する研究結果がある。そして、この結果は本研究の結果と非常に似ているところがある。その類似点とは、BRCA1 が midbody に局在している (Lotti *et al.*, 2002) こと、そして、BARD1 もまた核-細胞質間輸送活性を持つ因子であり、細胞内での BRCA1 の適切な局在に関与することである (Fabbro *et al.*, 2003; Henderson.2005)。さらに、BRCA1 または BARD1 をノックダウンすると、細胞が有糸分裂の異常を起こし、それにより細胞の多核化が起こることが報告されている (Bae *et al.*, 2005; Irminger-Finger *et al.*, 1998)。このことは BRCA1/BARD1 が紡錘体の形成に関与しているということが近年報告されたことと合わせて考えると、とりわけ驚くべき結果ではない (Joukov *et al.*, 2006)。それゆえ、BRCA1/BARD1 と NELF サブユニットの関連を解明することは今後 NELF を研究していく上での興味深いテーマのひとつであると思う。

NELF は NB-NE サブコンプレックスというマイナーな複合体として細胞内で存在することが確認されているが (Yamaguchi *et al.*, 2002)、全サブユニットによるホロコンプレックスという形をとるのがメジャーであると考えられている。本研究で得られた NELF の各サブユニットがそれぞれ個別の機能を持つこと、そして複合体が一時的に解離しているという結果から、NB と NC だけが有糸分裂終期に midbody に局在する理由について考察する。細胞分裂が発生すると同時に NA が翻訳後修飾を受けるといった何かのシグナルにより、NB と NC がフリーとなって細胞質に取り残される。もしくは核膜の再形成が行われた後に NA もしくは NE の輸送活性によって細胞質に局在することになる。それによって midbody に局在するのではないか。そして機能を果たした各サブユニットは核内に輸送され、再度ホロコンプレックスを形成したり、タンパク質分解を起こしたりするのではないかといろいろ予想できる。しかし私は、タンパク質分解が起こるのではないかと考えている。というのも、ホロコンプレックスを形成していない NELF サブユニットは安定な状態ではないと考えているからである。その理由として、NELF のひとつのサブユニットをノックダウンすると、その他の NELF サブユニットも付随してノックダウンされるということがある。

本研究により、NELF の細胞ダイナミクスに関する新しい知見を見出す

ことができたと同時に、NELF に関わる今後の研究への手がかりを得ることができた。今後は細胞周期に依存した NELF の細胞内でのダイナミクスや、NELF 複合体の集合と解離のサイクルがどのような生理学的意義をもたらすのかをさらに追及していく必要があると私は考えている。

4-5 図表

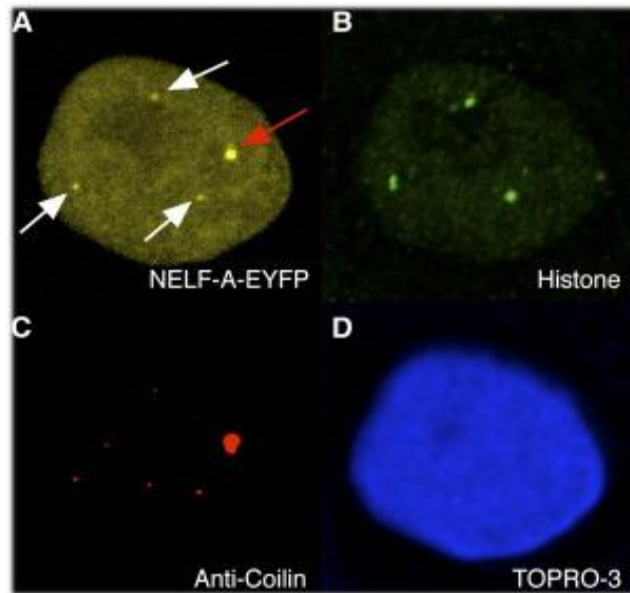


図 4-1 NELF-Aの細胞内局在

(A)NELF-Aは核に局在し、さらにドット状の形で局在するものがある。これをNELF bodyと言う。NELF bodyはヒストン遺伝子の発現が活発な領域(B)ならびにCajal body(C)と隣接している。(D)TOPRO-3染色は核の局在を示している。

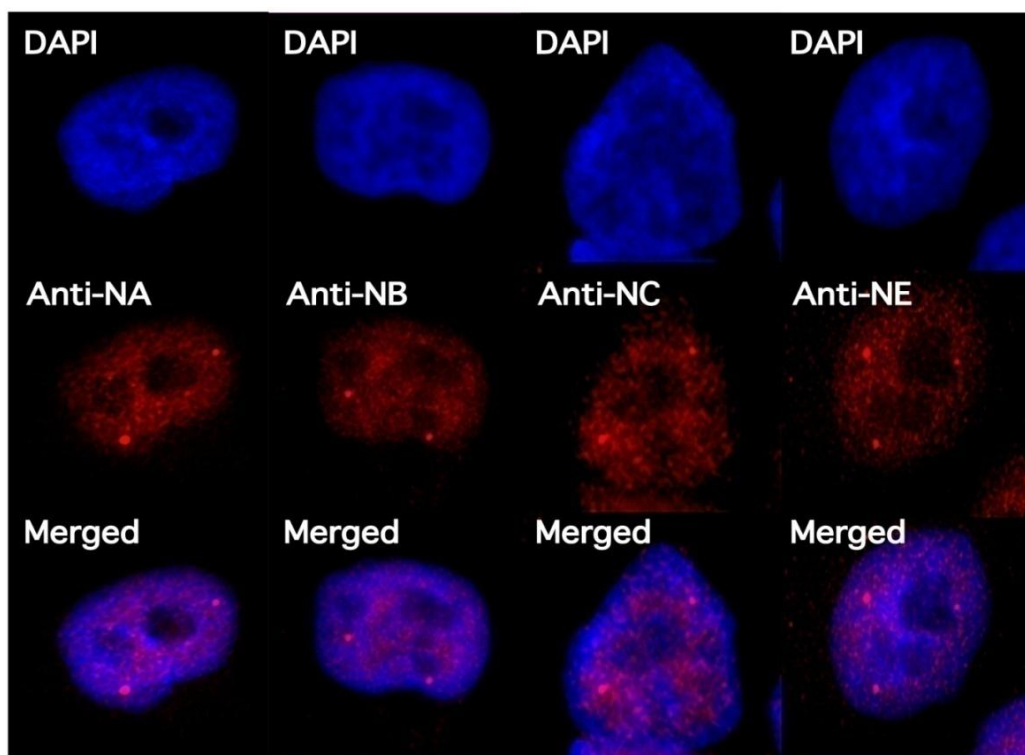


図 4-2 間期にある細胞内でNELFは核に局在する
 DAPIと各NELFサブユニットとの共染色により、各NELFサブユニットの細胞内局在を観察した。

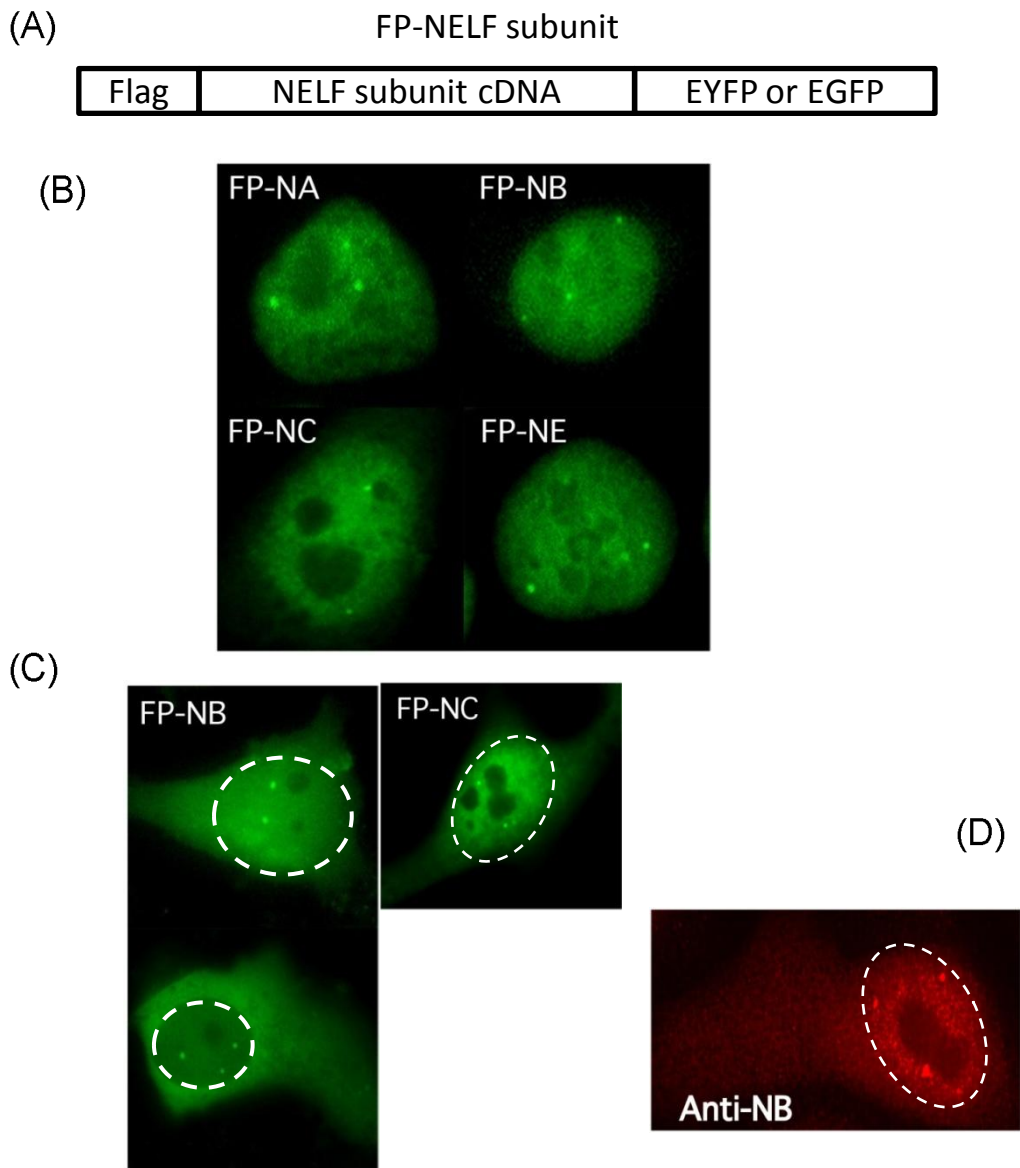


図 4-3 過剰発現させたNBとNCは核と細胞質に局在する

(A) 細胞内で発現させるFP-NELFサブユニットの構造を。NELFサブユニットのN末端側にFlag、C末端側に蛍光タンパク質(EYFP or EGFP)を融合させている。(B) 各FP-NELFサブユニットを発現する細胞を、それぞれのNELFサブユニットに対する抗体で免疫染色した。(C) FP-NB、FP-NCを発現する細胞をさらに詳細に観察した。(D) NBを一過的に発現させた細胞をanti-NB抗体で免疫染色した。(C),(D)で白い点線で囲まれた領域は核を示している。

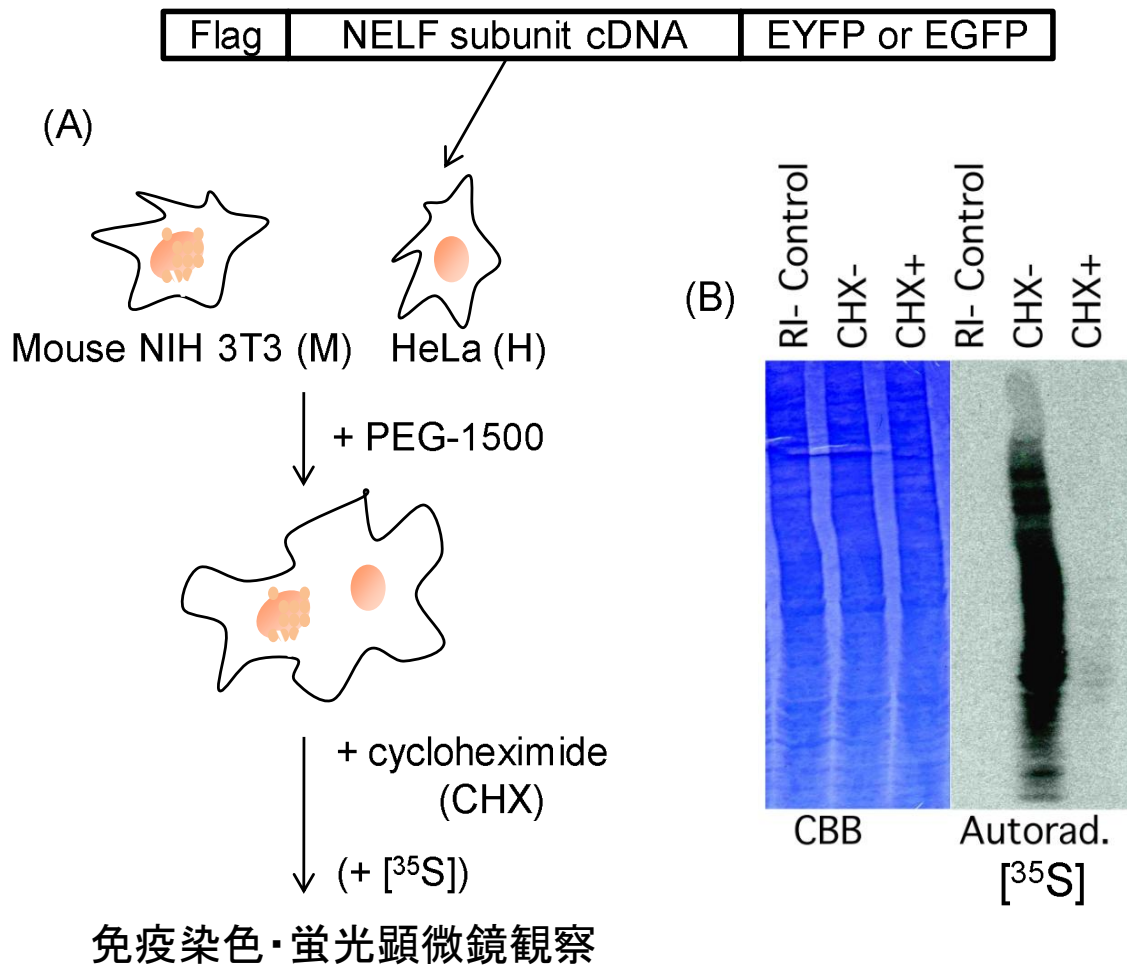


図 4-4 細胞種間ヘテロカリオン解析

(A)細胞種間ヘテロカリオン解析の実験スキームを示した。Mouse NIH 3T3細胞とHeLa細胞との区別は、核の形状の差によって行った。(B)CHXの効果を確認するために³⁵Sでパルス・チェイス・ラベリングを行った。

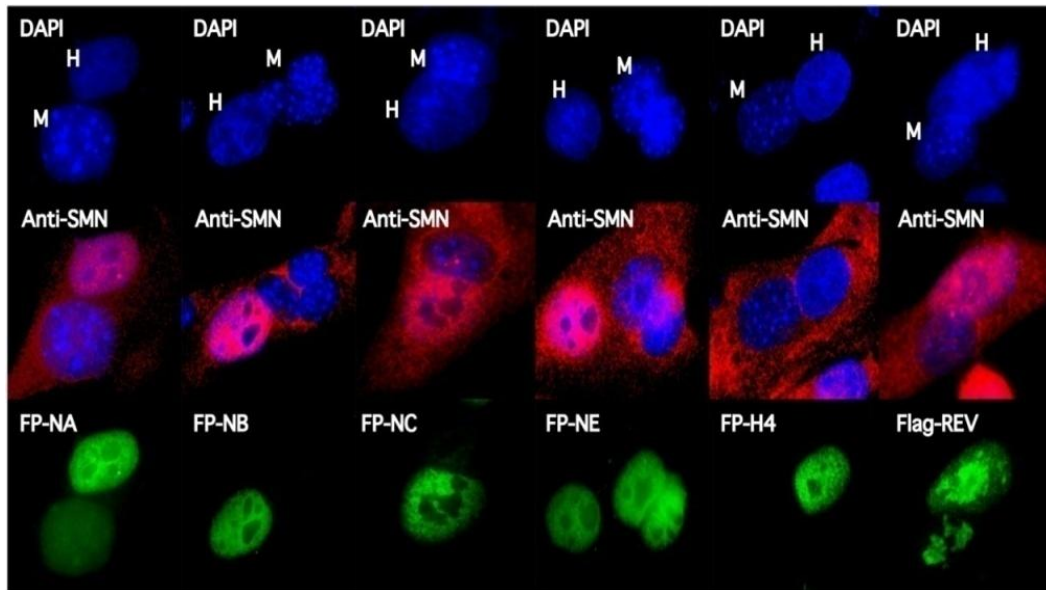


図 4-5 NELFは核-細胞質間輸送活性を持つ(1)

細胞種間ヘテロカリオン解析を行い、細胞を固定化した後に各FP-NELFサブユニットの局在を免疫染色によって観察した。“M”はmouse NIH 3T3細胞由来の核、“H”は各FP-NELFサブユニットを発現しているHeLa細胞由来の核を示している。FP-H4はネガティブコントロール、Flag-Revはポジティブコントロールを示す。anti-SMN抗体による免疫染色とDAPIとの混合画像により、1つの細胞内に2つの核が存在していることを確認した。

weighted average of shuttling strength

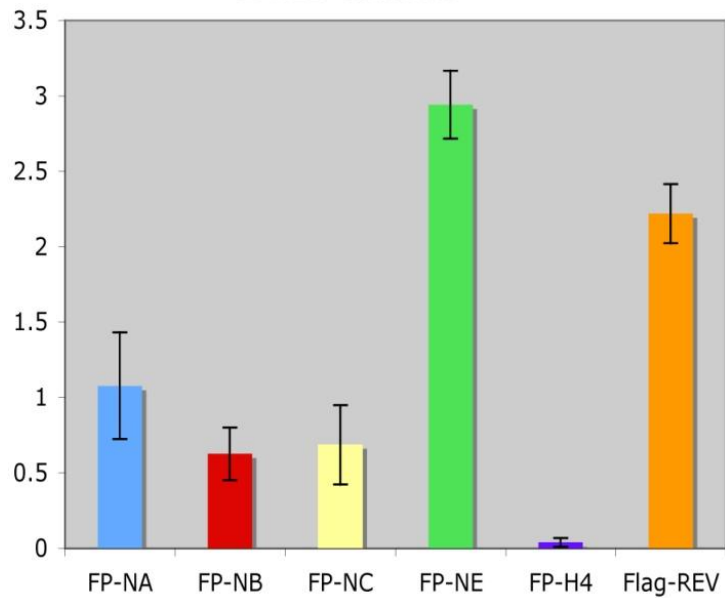


図 4-6 NELFは核-細胞質間輸送活性を持つ(2)

細胞種間ヘテロカリオン解析の結果を定量化したグラフである。50個のヘテロカリオンをランダムに抽出し、NIH 3T3細胞核に輸送されたFP-NELFサブユニットの蛍光強度(M)と、HeLa細胞核に残っているFP-NELFサブユニットの蛍光強度(H)の比から値を算出した。(M):(H)=1:over 8 → 0、=1:8 → 1、=1:4 → 2、=1:2 → 3、=1:1 → 4となる。エラーバーは3回独立して行なった解析結果のSEMを表している。

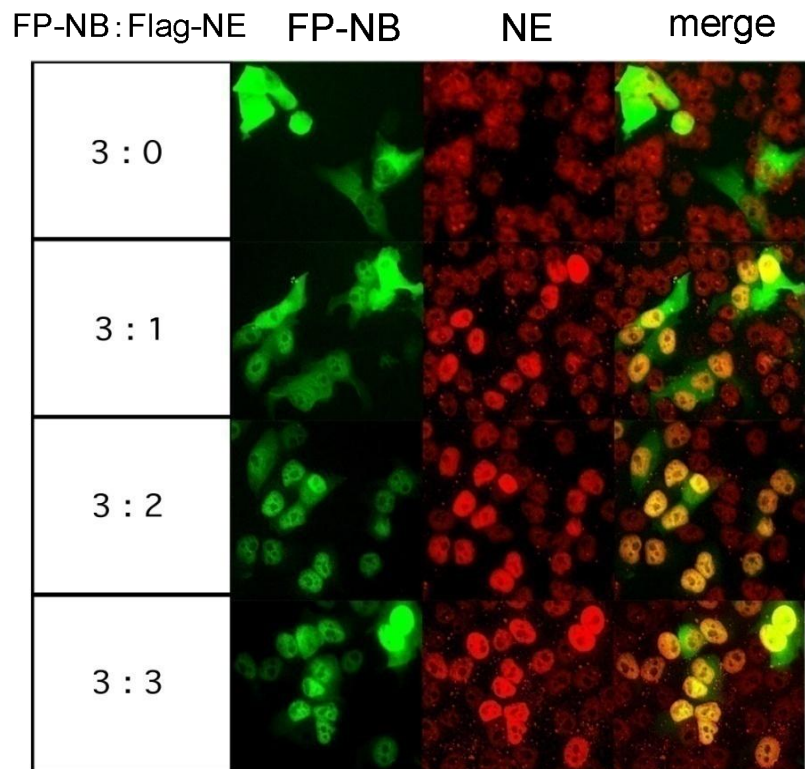


図 4-7 NELFのサブユニット間の存在比が細胞内局在を決定する(1)
細胞内でFP-NBを発現させるDNAコンストラクトと、Flag-NEを発現させるDNAコンストラクトを、同一のHeLa細胞内で一過的に発現させた。FP-NBは一定量発現させるのに対し、Flag-NEは段階的に発現量を増やした。そのときの、FP-NBならびにNEの細胞内局在を免疫染色によって確認した。

(A)

Ratio of cells with cyto fluor \geq nuclear fluor (%)

	Control	Flag-NA	Flag-NB	Flag-NC	Flag-NE	Flag-NA Flag-NC	Flag-NB Flag-NE
FP-NB	93.8%	92.3%	N/A	94.9%	38.4%	6.3%	N/A
FP-NC	85.7%	0%	99%	N/A	95.7%	N/A	65.4%

(B)

NELF
holocomplex

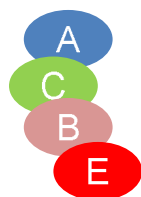


図 4-8 NELFのサブユニット間の存在比が細胞内局在を決定する(2)
(A) 図4-7にある解析を、さまざまなNELFサブユニット間の組み合わせで同様に行った。トランスフェクションするDNAのモル量は、すべて1:1とした。値は、1細胞内で核より細胞質の方にFP-NBならびにFP-NC由来の蛍光強度が多い細胞の割合数を示したものである。コントロールにはFP-NELFサブユニットのORFが入っていないpBluescriptプラスミドを用いた。(B) NELFが複合体を形成する際にとる結合様式を示した。A:NA、B:NB、C:NC、E:NE.

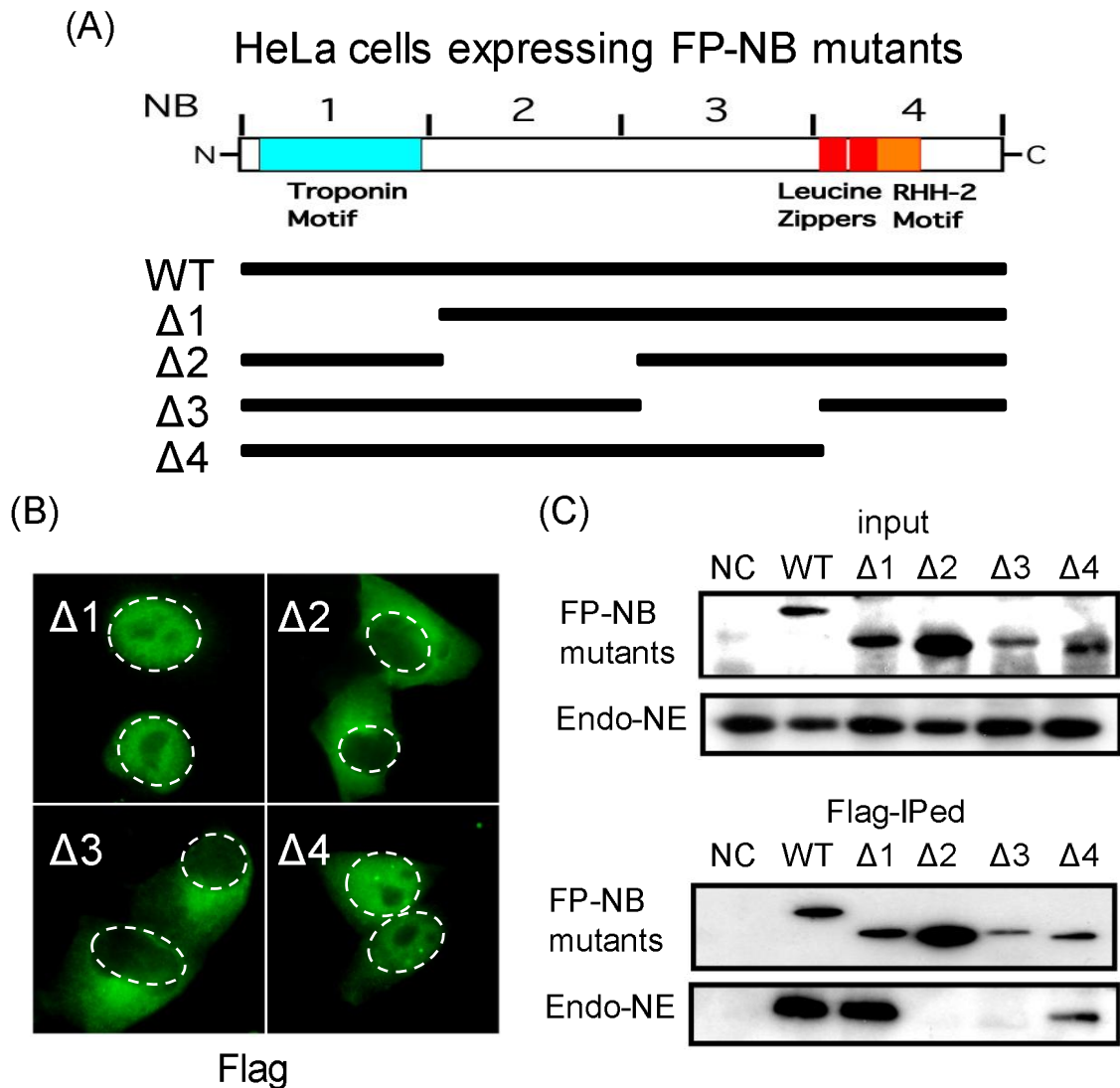


図 4-9 NEの作用によってNBは核移行する

(A) 使用した各FP-NB変異体の構造を示している。5つの変異体ともN末端側にFlagタグ、C末端側にEYFPタグが融合されている。(B) 各FP-NB変異体の細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。白い点線で囲まれた領域は核を示している。(C) 各FP-NB変異体を発現する細胞から調製した細胞抽出液とanti-Flag抗体を用いて免疫沈降し、そのeluateをイムノブロッティングで解析した。ネガティブコントロール(NC)としてHeLa細胞の細胞抽出液を用いた。

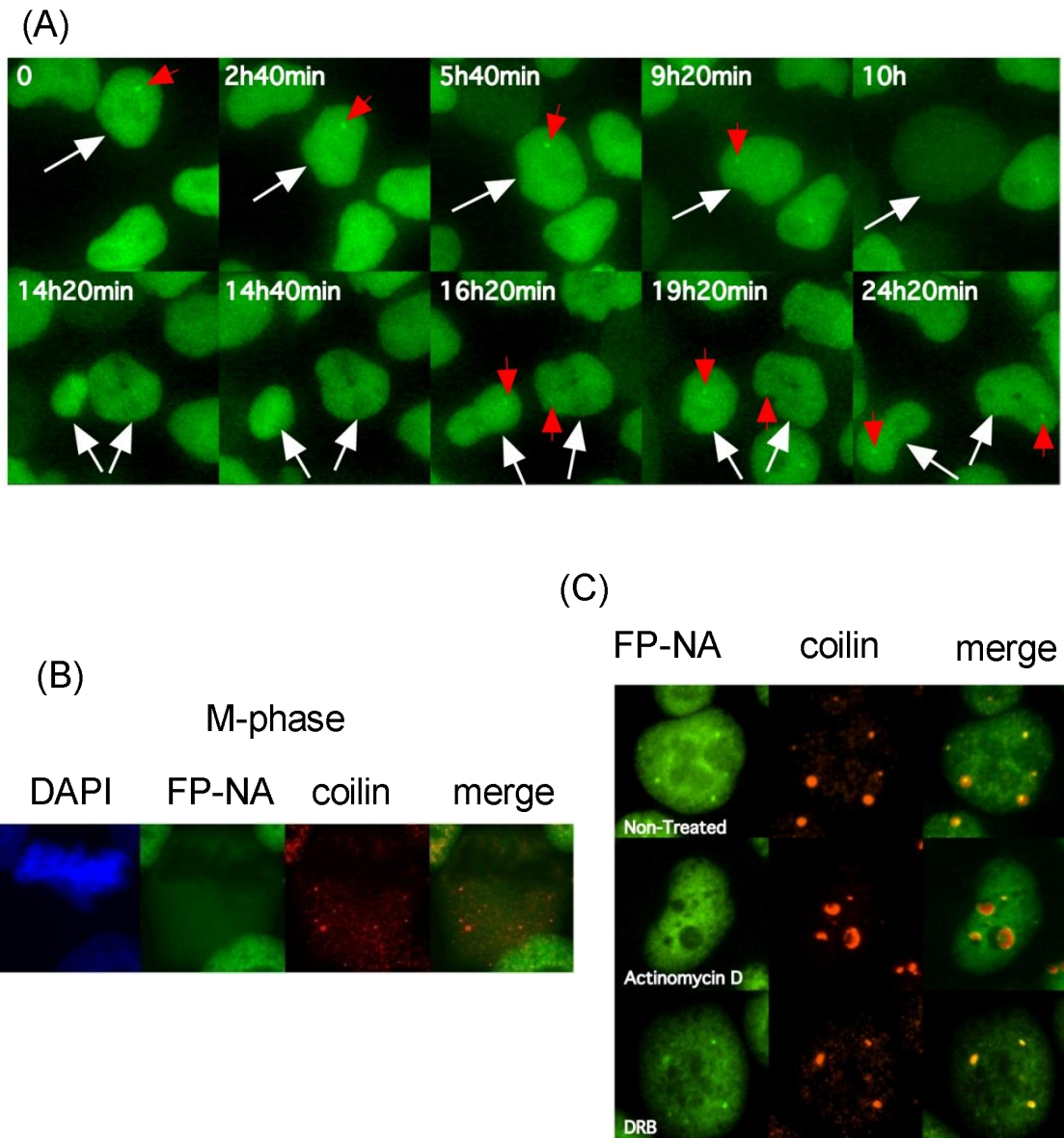


図 4-10 生細胞内でのNELF bodyの物質動態

(A) 蛍光顕微鏡を用いて生細胞内でのFP-NAの動態を観察した。白い矢印はFP-NAの局在を、赤い矢印はNELF bodyの局在を示している。各観察写真の左上に記した時間は、観察を始めてからの時間を示している。(B) M期におけるDAPI、FP-NA、coilinの局在を免疫染色によって観察した。(C) 細胞培地にActinomycin DとDRBを添加したときのFP-NA、coilinの細胞内局在を免疫染色によって観察した。

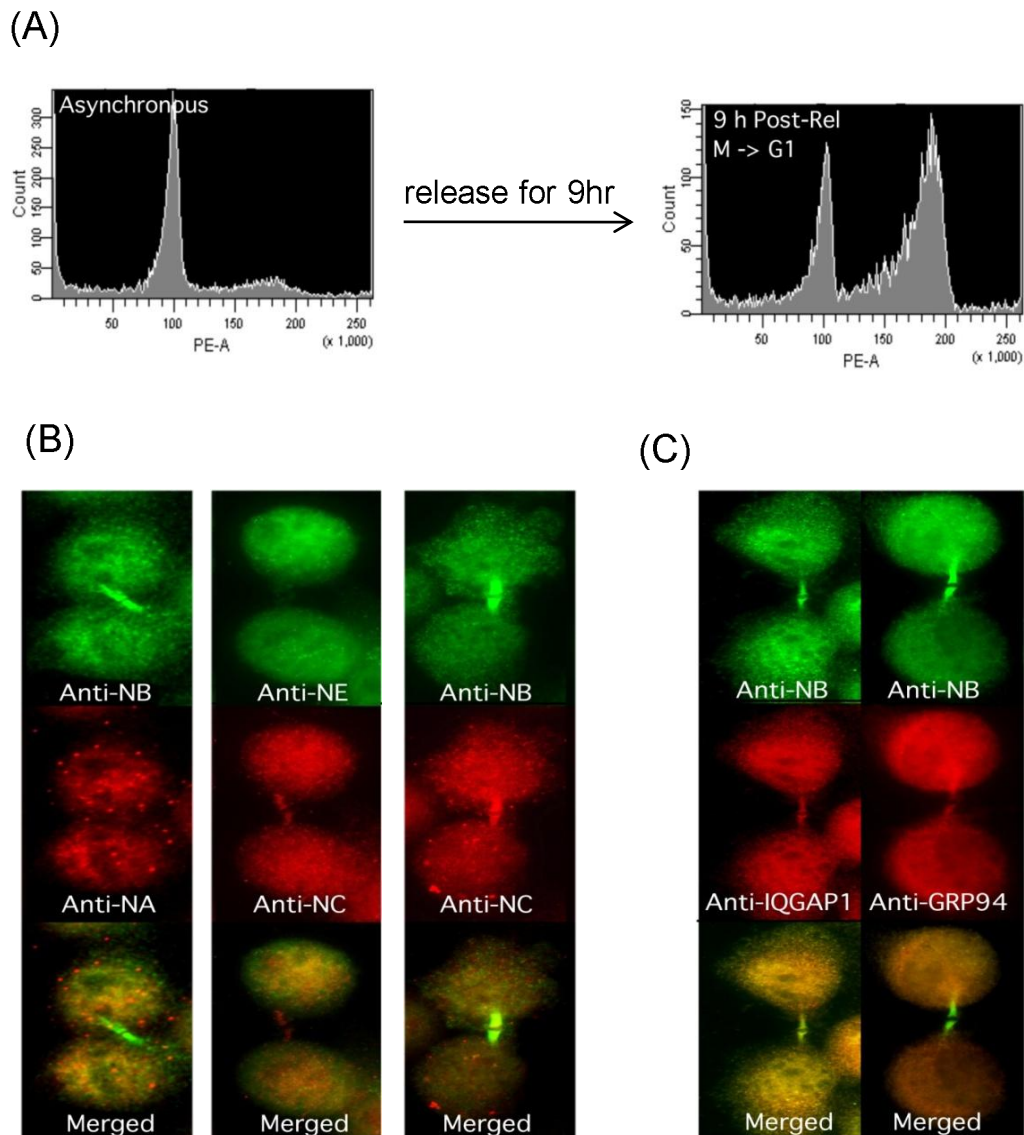


図 4-11 有糸分裂終期にNBとNCはmidbodyに局在する

(A)ダブル・チミジン・ブロック法により細胞周期を同調させた。同調したかどうかをFACSを用いて確認した。左図はG1/S期に同調されていることを示している。右図は左図の状態からチミジンなしの培地で9時間培養した細胞の細胞周期分布を表している。(B)有糸分裂終期におけるNELF各サブユニットの細胞内局在を免疫染色によって観察した。(C)有糸分裂終期にある細胞をanti-NB抗体と、midbodyに局在することが知られているIQGAP1タンパク質ならびにGRP94タンパク質に対する抗体で共染色し、それらの局在を観察した。

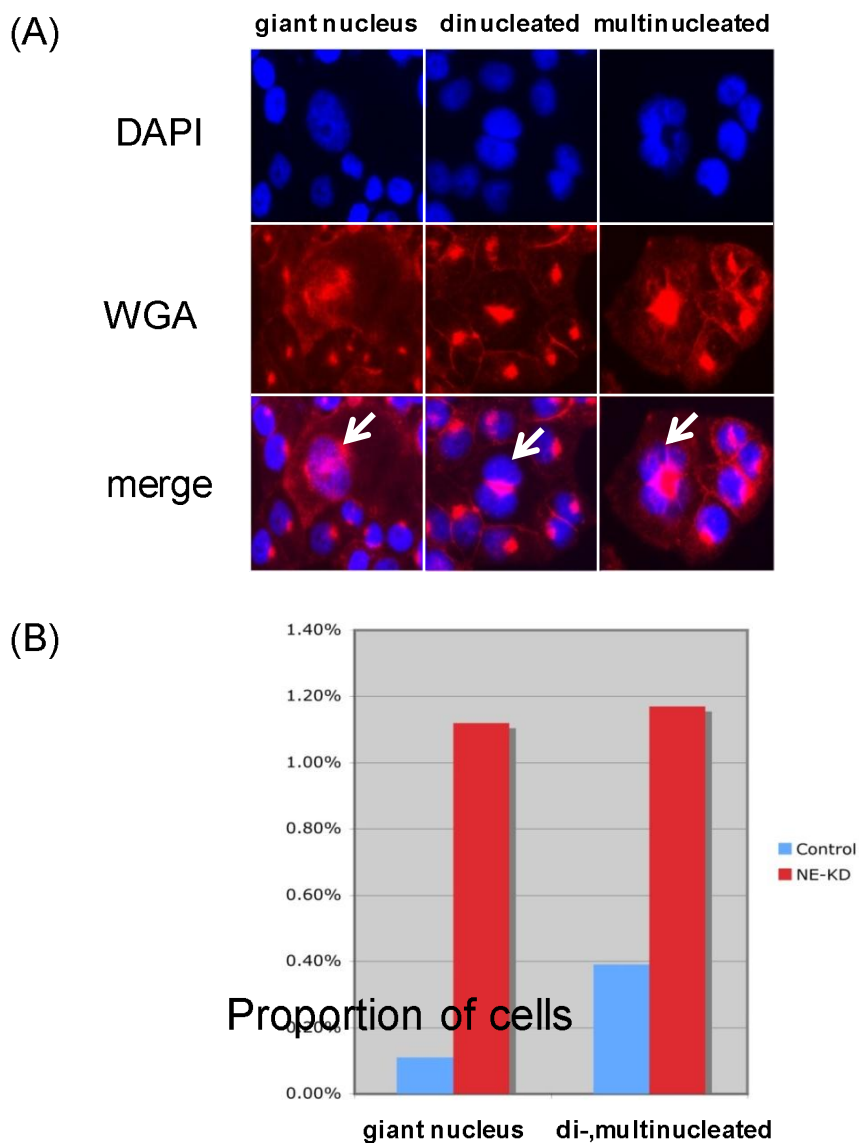


図4-12 NELFノックダウンは細胞と核の肥大化、多核化を引き起こす
 (A)NELFをノックダウンしたHeLa細胞をDAPIとWGAで共染色した。白い矢印で示す部分が、異常をきたした細胞ならびに核である。(B)NELFをノックダウンしたことで異常が発生した細胞の割合を計測した。

第 5 章 本研究のまとめ

私は 3 つの転写制御因子に着目し、それぞれ独立したテーマを持って本研究に取り組んできた。

1 つめに、マウス **ASH1L** 変異マウスを用いた表現型解析を行った。これにより、個体レベルで **ASH1L** が **Hox** 遺伝子群の制御に関与していることを明らかにした。

2 つめに、**DSIF** のターゲット遺伝子の探索を行った。これにより、**DSIF** が正常な細胞増殖に必須な因子であり、**DSIF** のサブユニットである **Spt5** をノックダウンすることによって、細胞は増殖停止ならびにアポトーシスすることを明らかにした。さらに、**Spt5** のノックダウンにより **p53** シグナル経路が活性化されることを明らかにした。また、正常な細胞増殖に **Spt5** の一部のドメインは必須ではないことを明らかにした。

3 つめに、**NELF** の細胞内ダイナミクスの解析を行った。これにより、**NELF** の一部のサブユニットが核-細胞質間輸送活性を持つことを明らかにした。また、有糸分裂終期に **NELF** の一部サブユニットが **midbody** と呼ばれる構造体に局在することを明らかにした。さらに、細胞内で **NELF** をノックダウンすると、細胞核の肥大化ならびに細胞核の多核化が誘導されることを明らかにした。

参考文献

Aida, M., Chen, Y., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Wada, T., & Handa, H. (2006)

Transcriptional pausing caused by NELF plays a dual role in regulating immediate-early expression of the junB gene. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6094-6104.

Aiyar, S.E., Sun, J.L., Blair, A.L., Moskaluk, C.A., Lu, Y.Z., Ye, Q.N., Yamaguchi, Y., Mukherjee, A., Ren, D.M., Handa, H., and Li, R. (2004)
Attenuation of estrogen receptor alpha-mediated transcription through estrogen-stimulated recruitment of a negative elongation factor. *Genes Dev* **18**, 2134-2146.

Andrulis, E.D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J. & Lis, J.T. (2000)
High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes *in vivo*: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev.* **14**, 2635-2649.

Bae, I., Rih, J.K., Kim, H.J., Kang, H.J., Haddad, B., Kirilyuk, A., Fan, S., Avantaggiati, M.L., & Rosen, E.M. (2005)
BRCA1 regulates gene expression for orderly mitotic progression. *Cell Cycle* **4**, 1641-1666.

Basrai, M.A., Kingsbury, J., Koshland, D., Spencer, F., & Hieter, P. (1996)
Faithful chromosome transmission requires Spt4p, a putative regulator of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2838-2847.

Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D.A., Vigneron, M., McNally, J.G., & Hager, G.L. (2002)

Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep* **3**, 1188-1194.

Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E., & Sauer, F. (2002)

Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*. **419**, 857-62.

Burckin, T., Nagel, R., Mandel-Gutfreund, Y., Shiue, L., Clark, T.A., Chong, J.L., Chang, T.H., Squazzo, S., Hartzog, G., & Ares, M. Jr (2005)
Exploring functional relationships between components of the gene expression machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 175-182.

Byrd, KN. & Shearn, A. (2003)

ASH1, a *Drosophila* trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 11535-40.

Casse, C., Giannoni, F., Nguyen, V.T., Dubois, M.F., & Bensaude, O. (1999)

The transcriptional inhibitors, actinomycin D and alpha-amanitin, activate the HIV-1 promoter and favor phosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain. *J Biol Chem* **274**, 16097-16106.

Cheng, B. & Price, D.H. (2007)

Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **282**, 21901-21912.

Cole, PA. (2008)

Chemical probes for histone-modifying enzymes. *Nat Chem Biol.* **4**, 590-7.

Delaval, K. & Feil, R. (2004)

Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Curr Opin Genet Dev.* **14**, 188-95.

Dignam, JD., Lebovitz, RM., & Roeder, RG. (1983)

Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475-89.

Eissenberg, JC., Shilatifard, A., Dorokhov, N., & Michener, DE. (2007)

Cdk9 is an essential kinase in *Drosophila* that is required for heat shock gene expression, histone methylation and elongation factor recruitment. *Mol Genet Genomics.* **277**, 101-14.

Fabbro, M. & Henderson, B.R. (2003)

Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* **282**, 59-69.

Flaherty, S.M., Fortes, P., Izaurralde, E., Mattaj, I.W., & Gilmartin, G.M. (1997)

Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11893-11898.

Frey, M.R., Bailey, A.D., Weiner, A.M., & Matera, A.G. (1999)

Association of snRNA genes with coiled bodies is mediated by nascent snRNA transcripts. *Curr. Biol.* **9**, 126-35.

Gilmour, D.S. & Lis, J.T. (1984)

Detecting protein-DNA interactions *in vivo*: distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 4275-4279.

Glaser, S., Schaft, J., Lubitz, S., Vintersten, K., van der Hoeven, F., Tufteland, K.R., Aasland, R., Anastassiadis, K., Ang, S.L., & Stewart, A.F. (2006)

Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of Mll2 in mouse development. Development. **133**, 1423-32.

Gregory, G.D., Vakoc, C.R., Rozovskaia, T., Zheng, X., Patel, S., Nakamura, T., Canaani, E., & Blobel, G.A. (2007)

Mammalian ASH1L is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. Mol Cell Biol. **24**, 8466-79.

Guo, S., Yamaguchi, Y., Schilbach, S., Wada, T., Lee, J., Goddard, A., French, D., Handa, H., & Rosenthal, A. (2000)

A regulator of transcriptional elongation controls vertebrate neuronal development. Nature **408**, 366-369.

Haaf, T. & Ward, D.C. (1996)

Inhibition of RNA polymerase II transcription causes chromatin decondensation, loss of nucleolar structure, and dispersion of chromosomal domains. Exp Cell Res **224**, 163-173.

Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., & Winston, F. (1998)

Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. **12**, 357-369.

Heard, E. (2005)

Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev.* **15**, 482-9.

Henderson, B.R. (2005)

Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *Bioessays* **27**, 884-893.

Inukai, N., Yamaguchi, Y., Kuraoka, I., Yamada, T., Kamijo, S., Kato, J., Tanaka, K., & Handa, H. (2004)

A novel hydrogen peroxide-induced phosphorylation and ubiquitination pathway leading to RNA polymerase II proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 8190-8195.

Irminger-Finger, I., Soriano, J.V., Vaudan, G., Montesano, R., & Sappino, A.P. (1998)

in vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* **143**, 1329-1339.

Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., & Gaynor, R.B. (2000)

Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2970-2983.

Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., & Mattaj, I.W. (1994)

A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**, 657-668.

Jennings, B.H., Shah, S., Yamaguchi, Y., Seki, M., Phillips, R.G., Handa, H., & Ish-Horowicz, D. (2004)

Locus-specific requirements for Spt5 in transcriptional activation and repression in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **14**, 1680-1684.

Joukov, V., Groen, A.C., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., Rodriguez, A., Walter, J.C., & Livingston, D.M. (2006)

The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* **127**, 539-552.

Kaplan, C.D., Morris, J.R., Wu, C., & Winston, F. (2000)

Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* **14**, 2623-2634.

Keegan, B.R., Feldman, J.L., Lee, D.H., Koos, D.S., Ho, R.K., Stainier, D.Y., & Yelon, D. (2002)

The elongation factors Pandora/Spt6 and Foggy/Spt5 promote transcription in the zebrafish embryo. *Development* **129**, 1623-1632.

Klymenko, T. & Muller, J. (2004)

The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep.* **5**, 373-7.

Li, C. & Wong, W.H. (2001)

Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 31-36.

Li, X. & Manley, J.L. (2006)

Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev.* **20**, 1838-1847.

Lopez, A., Higuera, D., Rosset, R., Deutsch, J., & Peronnet, F. (2001)
cortc genetically interacts with Pc-G and trx-G genes and maintains the
anterior boundary of Ultrabithorax expression in *Drosophila* larvae. *Mol
Genet Genomics.* **266**, 572-83.

Lotti, L.V., Ottini, L., D'Amico, C., Gradini, R., Cama, A., Belleudi, F.,
Frati, L., Torrisi, M.R., & Mariani-Costantini, R. (2002)
Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells.
Genes Chromosomes Cancer **35**, 193-203.

Matera, A.G, (1998)
Of coiled bodies, gems, and salmon. *J Cell Biochem* **70**, 181-192.

McChesney, P.A., Aiyar, S.E., Lee, O.J., Zaika, A., Moskaluk, C., Li, R., &
El-Rifai, W. (2006)
Cofactor of BRCA1: a novel transcription factor regulator in upper
gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer Res* **66**, 1346-1353.

Malagon, F. & Aguilera, A. (1996)
Differential intrachromosomal hyper-recombination phenotype of spt4
and spt6 mutants of *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **30**, 101-106.

Martinez, A.M., Cavalli, G. (2006)
The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during
development. *Cell Cycle.* **5**, 1189-97.

Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y.,

- Kodama, T., Makuuchi, M., & Aburatani, H. (2002)
Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res* **93**, 636-643.
- Muller, J. & Kassis, J.A. (2006)
Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev.* **16**, 476-84.
- Mullins, J.M. & McIntosh, J.R. (1982)
Isolation and initial characterization of the mammalian midbody. *J Cell Biol* **94**, 654-661.
- Nakamura, T., Blechman, J., Tada, S., Rozovskaia, T., Itoyama, T., Bullrich, F., Mazo, A., Croce, C.M., Geiger, B., & Canaani, E. (2000)
huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila ash1* gene, localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 7284-9.
- Narita, T., Yamaguchi, Y., Yano, K., Sugimoto, S., Chanarat, S., Wada, T., Kim, D.K., Hasegawa, J., Omori, M., Inukai, N., Endoh, M., Yamada, T., & Handa, H. (2003)
Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. *Mol Cell Biol* **23**, 1863-1873.
- Narita, T., Yung, T.M., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2007)
NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. *Mol Cell* **26**, 349-365.

Newman, J.C. & Weiner, A.M. (2005)

L2L: a simple tool for discovering the hidden significance in microarray expression data. *Genome Biol.* **6**, R81.

Papp, B. & Muller, J. (2006)

Histone trimethylation and the maintenance of transcriptional ON and OFF states by trxG and PcG proteins. *Genes Dev.* **20**, 2041-54.

Proudfoot, N.J., Furger, A., & Dye, M.J. (2002)

Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**, 501-512.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., & Jenuwein, T. (2000)

Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* **406**, 593-9.

Roeder, R.G. (1996)

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* **21**, 327-35.

Rozovskaia, T., Tillib, S., Smith, S., Sedkov, Y., Rozenblatt-Rosen, O., Petruk, S., Yano, T., Nakamura, T., Ben-Simchon, L., Gildea, J., Croce, C.M., Shearn, A., Canaani, E., & Mazo, A. (1999)

Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol.* **19**, 6441-7.

Sanchez-Elsner, T., Gou, D., Kremmer, E., & Sauer, F. (2006)

Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax. *Science*. **311**, 1118-23.

Saunders, A., Core, L.J., & Lis, J.T. (2006)
Breaking barriers to transcription elongation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 557-567.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., & Cavalli, G. (2007)
Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. **128**, 735-45.

Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.Y., Bourgon, R., Biggin, M., & Pirrotta, V. (2006)
Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* **38**, 700-5.

Sehgal, P.B., Darnell, J.E. Jr, & Tamm, I. (1976)
The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1- β -Dribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* **9**, 473-480.

Shim, E.Y., Walker, A.K., Shi, Y., & Blackwell, T.K. (2002)
CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev.* **16**, 2135-2146.

Sims, R.J. 3rd, Belotserkovskaya, R., & Reinberg, D. (2004)
Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* **18**, 2437-2468.

Sims, R.J. 3rd, Mandal, S.S., & Reinberg, D. (2004)

Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol.* **16**, 263-71.

Skop, A.R., Liu, H., Yates, J., 3rd, Meyer, B.J., & Heald, R. (2004)
Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* **305**, 61-66.

Sparmann, A. & van Lohuizen, M. (2006)
Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* **6**, 846-56.

Srinivasan, S., Dorigi, K.M., & Tamkun, J.W. (2008)
Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet.* **4**, e1000217.

Strahl, B.D. & Allis, C.D. (2000)
The language of covalent histone modifications. *Nature.* **403**, 41-5.

Sun, J., Watkins, G., Blair, A.L., Moskaluk, C., Ghosh, S., Jiang, W.G., & Li, R. (2008)
Deregulation of cofactor of BRCA1 expression in breast cancer cells. *J Cell Biochem* **103**, 1798-1807.

Swanson, M.S., Malone, E.A., & Winston, F. (1991)
SPT5, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3009-3019.

Swanson, M.S. & Winston, F. (1992)
SPT4, SPT5 and SPT6 interactions: effects on transcription and viability

in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **132**, 325-336.

Tanaka, Y., Katagiri, Z., Kawahashi, K., Kioussis, D., & Kitajima S. (2007)

Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene*. **397**, 161-8.

Tanaka, Y., Nakayama, Y., Taniguchi, M., & Kioussis, D. (2008)

Regulation of early T cell development by the PHD finger of histone lysine methyltransferase ASH1. *Biochem Biophys Res Commun*. **365**, 589-94.

Tripoulas, N.A., Hersperger, E., La Jeunesse, D., & Shearn, A. (1994)

Molecular genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* gene *absent, small or homeotic discs1* (*ash1*). *Genetics*. **137**, 1027-38.

Tripoulas, N., LaJeunesse, D., Gildea, J., & Shearn, A. (1996)

The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and a PHD finger. *Genetics*. **143**, 913-28.

Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B., & Mattaj, I.W. (1996)

A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol* **133**, 5-14.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., Buratowski, S., & Handa, H. (1998a)

DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA

polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* **12**, 343-356.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., & Handa, H. (1998b) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription *in vitro*. *EMBO J.* **17**, 7395-7403.

Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., & Botstein, D. (2002)

Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1977-2000.

Wright, T.J., Costa, J.L., Naranjo, C., Francis-West, P., & Altherr, M.R. (1999)

Comparative analysis of a novel gene from the Wolf-Hirschhorn / Pitt-Rogers-Danks syndrome critical region. *Genomics* **59**, 203-212.

Wu, C.H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinsky, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., & Gilmour, D. (2003)

NELF and DSIF cause promoter proximal pausing on the hsp70 promoter in *Drosophila*. *Genes Dev.* **17**, 1402-1414.

Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Okamoto, S., Mura, T., & Handa, H. (2006)

P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol. Cell* **21**, 227-237.

Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T.,

Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M.M., & Handa, H. (2001)
Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen.
Science **293**, 124-127.

Yamaguchi, Y., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., & Handa, H. (2002)
Evidence that negative elongation factor represses transcription
elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA
polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol* **22**, 2918-2927.

Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S.,
Hasegawa, J., & Handa, H. (1999a)
NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to
repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41-51.

Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, D., Takagi, T., Hasegawa, J., &
Handa, H. (1999b)
Structure and function of the human transcription elongation factor
DSIF. *J. Biol. Chem.* **274**, 8085-8092.

Ye, Q., Hu, Y.F., Zhong, H., Nye, A.C., Belmont, A.S., & Li, R. (2001)
BRCA1-induced large-scale chromatin unfolding and allele-specific
effects of cancer-predisposing mutations. *J Cell Biol* **155**, 911-921.

謝辞

本研究遂行に際し、学部生時代からの 6 年間、サイエンスの楽しさ、そして難しさを存分に教えていただき、終始暖かくそして厳しくご指導賜りました半田宏教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科、東京工業大学大学院統合研究院）に心から厚く御礼申し上げます。また、常日頃から貴重なご指導ならびにご助言を頂きました和田忠士准教授（東京工業大学大学院統合研究院）と山口雄輝准教授（東京工業大学大学院生命理工学研究科）に心から深く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者でもあり、動物実験をゼロから学ばせていただき、研究に対する真摯な心構えをご指導賜りました廣瀬進教授（国立遺伝学研究所）、また日々の密なディスカッションを通して、考える力を育てていただいた西岡憲一助教（佐賀大学医学部）に心から感謝申し上げます。

そして 6 年間の研究生生活を支えていただいた半田宏研究室ならびに廣瀬進研究室の関係者の皆様には、日々の研究、相談等、多大なるご協力をいただき誠に感謝いたします。

最後に、わがままばかりで生きてきた我が人生を、暖かく見守ってくれた父、母、そして弟に深く感謝いたします。