

MED26 の異所性液滴形成が混合型急性白血病を引き起こす分子機構の解明

鈴木秀文

横浜市立大学大学院医学研究科 分子生物学分野

【研究の背景】

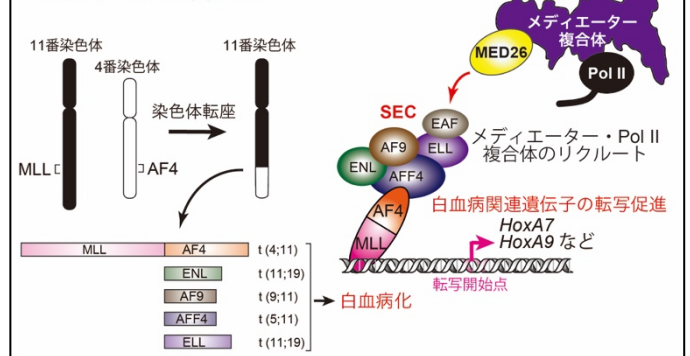
遺伝子の発現は緻密に制御されており、その制御機構の破綻は、がんや白血病などのさまざまな腫瘍を引き起こす。近年、腫瘍発症に関連する多くの遺伝子領域において、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が転写開始直後に一時停止しており、その一時停止が転写伸長因子によって解除され腫瘍関連遺伝子が過剰に発現されることが、腫瘍発症のメカニズムに関与することがわかってきた。Pol II が一時停止を解除され RNA 合成を再開するためには、転写伸長因子が遺伝子領域にリクルートされることが必要である。申請者らは、メディエーター複合体のサブユニット MED26 が転写伸長因子をリクルートすることで遺伝子発現を促進することを明らかにした。これまでの研究で、MED26 が ELL と EAF、AF4、AFF4、ENL、P-TEFb から構成される転写伸長因子複合体 Super Elongation Complex (SEC) や、ELL、EAF、ICE1、ICE2、ZC3H8 から構成される Little Elongation Complex (LEC) と共

役し、それぞれ異なる腫瘍関連遺伝子群の転写を制御していることを明らかにした【Suzuki H. & Takahashi H. *Seikagaku* 2021, Suzuki H. et al. *Nat. Commun.* 2022, Suzuki H. et al. *BioEssays* 2023】(図 1)。SEC のサブユニットの ELL、AF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子と混合型白血病 (MLL) で高頻度に染色体転座がみられる (図 2)。転座の結果生じる MLL 融合タンパク質が *Hox* などの白血病関連遺伝子領域に SEC をリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を亢進することが MLL 発症の原因であると考えられている。このとき、MED26 を含むメディエーター・Pol II 複合体も、MLL 融合タンパク質を介して白血病関連遺伝子領域にリクルートされ、それらの遺伝子の転写伸長を促進させる可能性がある (図 2)。また、近年、液-液相分離によって核内で形成される液滴が転写制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。液滴の内部では転写反応に関わる様々な因子が濃縮され、多因子反応の場が形成されていると考えられている。最近の申請者の研究から、MED26 が SEC とともに核内で液滴を形成していることがわかってきた。このことから、MLL 融合タンパク質が SEC を介して MED26 を白血病関連遺伝子へリクルートすることで、MED26 の液滴が異所性に形成され、白血病関連遺伝子が過剰に活性化される可能性が考えられた。

図1. MED26ががん関連遺伝子における転写のチェックポイントとしての役割を果たしていることが明らかになった (Suzuki H. et al. *Nat. Commun.* 2022)



図2. SECサブユニットの遺伝子とMLL遺伝子の染色体転座は急性白血病の原因となる



【目 的】

腫瘍性疾患をはじめとする様々な疾患において、RNA ポリメラーゼ II の転写調節の破綻が疾患の発症に関与する。メディ

エーター複合体のサブユニット MED26 は、RNA ポリメラーゼ II の転写調節に必須な因子であるが、染色体転座の結果生じる MLL 融合タンパク質によって MED26 が白血病関連遺伝子領域にリクルートされて液滴を形成することで、白血病関連遺伝子が活性化されている可能性が考えられた。本研究では、白血病関連遺伝子領域における MED26 の異所性の液滴形成が白血病発症につながる機構を解明することを目的とした。

【方 法】

- MLL 融合タンパク質 (MLL-ENL, MLL-AF4, MLL-AF1, MLL-ELL) を発現するプラスミドを構築しヒト由来培養細胞に発現させ、プロモーターレポーターアッセイにより MLL 融合タンパク質の転写活性化能を評価した。
- LacO-LacI システムを用いた相互作用解析によって、MLL 融合タンパク質が MED26 をリクルートするかどうかを評価した。
- ライブセルイメージング解析によって、液滴形成の解析および液滴の性質の解析 (FRAP 解析) を行なった。

【結 果】

まず、プロモーターレポーターアッセイにより、MLL 融合タンパク質の転写活性化能を評価した。その結果、遺伝子プロモーター領域にリクルートされた MLL 融合タンパク質は、強い転写活性化能を有することが確認された。興味深いことに、これらの中でも MLL-AF4 が最も高い活性化能を示した。さらにこのとき、MED26 をノックダウンすると、MLL 融合タンパク質による転写活性化が減弱することがわかったことから、MED26 が MLL 融合タンパク質による転写活性化に必要であることが示唆される。次に、LacO-LacI システムを用いて、MLL 融合タンパク質上に MED26 がリクルートされるかどうかを評価した。その結果、MLL 融合タンパク質上に MED26 の凝集体がリクルートされることが明らかとなった。MLL-AF4 領域に形成された MED26 の凝集体の性質について、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 解析を用いて凝集体の分子交換速度について解析を行ったところ、MED26 の凝集体は、凝集体内外での分子交換が活発な柔らかい液滴であることが明らかとなった。次に、MED26 の液滴形成について、HeLa 細胞を用いて解析を行った。GFP を融合させた MED26 を発現させると、核内に大きな液滴が形成されたことから、MED26 は強力な液滴形成タンパク質であることが明らかとなった。さらに、MED26 の液滴形成には、MED26 分子内部の天然変性領域が必須であること、天然変性領域の電荷パターンが関与していることが示唆された。MED26 の液滴内の相互作用因子を同定するために、独自の空間標識手法を用いて解析を行ったところ、MED26 の液滴には RNA 結合性因子が多数含まれていることが示唆された。この結果は、MED26 は液滴を形成することで RNA 結合性因子を転写活性化の場を集積させ、遺伝子発現を制御していることを示唆している。

【考 察】

MED26 は、メディエーター複合体のサブユニットとして、多くの遺伝子をゲノムワイドに制御することが知られているが、本研究では、MED26 が MLL 融合遺伝子と協働して転写を活性化することを明らかにした。さらに、MED26 は分子内の天然変性領域を介して液滴を形成することが明らかとなり、液滴内部に相互作用因子を濃縮することで遺伝子発現を制御している可能性が考えられた。MLL 融合タンパク質は MED26 の液滴をリクルートすることから、MED26 の異所性液滴形成が、MLL 融合タンパク質による白血病遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。MLL 融合タンパク質による白血病遺伝子の転写活性化において、MED26 が液滴を形成することがどのような意味をもつのか、また、MED26 の翻訳後修飾がどのように関与しているのかについては、さらなる解析が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

混合型白血病に見られる MLL 融合遺伝子が MED26 型メディエーター依存的に転写を活性化している可能性が示唆され、染色体転座が白血病発症に至る分子メカニズムの一端が明らかとなった。今後は、疾患特異的な MED26 の異所性の液滴を標的とした阻害剤を開発し、新規治療薬の開発へとつなげていきたいと考えている。

【参考・引用文献】

1. Hidefumi Suzuki, Kazuki Furugori, Ryota Abe, Shintaro Ogawa, Sayaka Ito, Tomohiko Akiyama, Keiko Horiuchi, Hidehisa Takahashi, MED26-containing Mediator may orchestrate multiple transcription processes through organization of nuclear bodies. *BioEssays* 45, e2200178, 2023
2. Hidefumi Suzuki, Ryota Abe, Miho Shimada, Tomonori Hirose, Hiroko Hirose, Keisuke Noguchi, Yoko Ike, Nanami Yasui, Kazuki Furugori, Yuki Yamaguchi, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Tatsuro Yamamoto, Noriko Saitoh, Shigeo Sato, Chieri Tomomori-Sato, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Hidehisa Takahashi, The 3' Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies. *Nature Communications* 13, 2905, 2022
3. Hidefumi Suzuki, Hidehisa Takahashi, Novel mechanism of transcription regulation by human Mediator subunit MED26. *Journal of Japanese Biochemical Society (Seikagaku)* 93, 810-814, 2021