

特集：タンパク質修飾がもたらす遺伝子発現調節

## メディエーター複合体によるタンパク質リン酸化 がもたらす転写制御機構

筒井 大 気, 大 熊 芳 明

真核生物の遺伝情報は、細胞核にコンパクトに収納されており、その発現のために活性化シグナルが細胞質を経て核内に入り、最終的にRNAポリメラーゼII (Pol II) による転写につながる。その際、転写制御因子がメディエーターやコファクターと相互作用し、クロマチン再構成装置や基本転写装置へとシグナルを伝達することでPol IIが転写を行う。この図式で人々は大きな流れは理解したが、詳細な機構の理解に関しては、クロマチンを構成するヒストンの特定アミノ酸が修飾、脱修飾されることが遺伝子発現に影響を及ぼすという「ヒストンコード」として認識されたのが大きな契機となった。近年はさらにヒストン修飾に加え、DNAメチル化修飾制御も含めたエピジェネティクスの概念が浸透してきた。ところが最近、タンパク質修飾はヒストンに限定されず他の核内タンパク質にも起こることから、核内事象全般に対しても翻訳後修飾が遺伝子発現に向けて重要な役割を果たすという、今回「核内コード」と名付けた新たな概念が認識されてきている。本特集号では、この核内コードに基づくタンパク質修飾による核内事象の制御を特集している。本総説ではリン酸化が引き起こす転写制御に焦点を当て、メディエーター複合体による転写制御を中心に最近の進展を紹介する。

### はじめに

様々な細胞外からのシグナルは、細胞核に到達するとクロマチン活性制御や転写の制御に関わるコファクター群や転写制御因子自身によって受容され、最終的に遺伝子発現の第一段階であるRNAポリメラーゼII (Pol II) による転写の効率を調節することになる。この転写に向けての概念図は1990年代半ばまでには提唱され<sup>1,2)</sup>、広く受け入れられてきたが、その詳細は明らかではなかった。しかし、近年三つの成果が報告され、分子や原子レベルにまで機構の

解明が一気に進展してきた。すなわち、i) スクレオソームの構造決定<sup>3)</sup>、ii) Pol IIの構造決定<sup>4,5)</sup>、iii) ヒトの全ゲノム塩基配列決定<sup>6,7)</sup>である。

ところが、その後さらにクロマチン免疫沈降法 (ChIP)<sup>8)</sup> や、これと組み合わせるべく用いられ、最近では転写産物RNAの直接シーケンシングなどにも用途が広がっている次世代高速シーケンス法<sup>9)</sup>などの新手法が導入された現在、タンパク質はそのまま単に翻訳されるだけでなく、翻訳後修飾を受けることで活性を制御されていることが明らかになってきた。細胞質におけるシグナル伝達にはタンパク質のセリン、トレオニンやチロシンのリン酸化修飾による活性制御が大きく関わっている事実は、1990年代から細胞膜上レセプターや細胞質内アダプタータンパク質がキナーゼ活性を有していることの発見から広く知られるようになってきている<sup>10,11)</sup>。

これに対し細胞核内でも、タンパク質の翻訳後修飾、しかもリン酸化修飾だけでなく他の様々な修飾も加わってタ

富山大学大学院医学薬学研究部遺伝情報制御学研究室  
(〒930-0194 富山市杉谷 2630)

Mechanisms of transcriptional regulation upon protein phosphorylation by Mediator complexes

Taiki Tsutsui and Yoshiaki Ohkuma (Laboratory of Gene Regulation, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

ンパク質の活性制御を行い、場合によってはポリユビキチン化を伴うタンパク質分解反応も引き起こされることが、近年数多く報告されてきた<sup>12,13)</sup>。本総説では、細胞核内においてタンパク質の特定のアミノ酸残基の翻訳後修飾が核内事象の特定の応答を引き起こして遺伝子発現制御に向けて協調的に作用することを、「核内コード」と総称しているが、最近この新たな概念の普遍性を明らかにしようとする努力が始まっている。細胞核内タンパク質の翻訳後修飾が着目される契機となったのは、i)ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質(コアヒストン; H2A, H2B, H3, H4)の修飾(リン酸化, アセチル化, メチル化, ユビキチン化, スモ化など)によるヌクレオソームの解離, 会合の制御<sup>14,15)</sup>, ii) Pol II 最大サブユニット C 末端ドメイン(CTD)の7アミノ酸繰返し配列(YSPTSPS)のリン酸化による転写, クロマチン構造, RNA プロセシングに対する協調的制御<sup>16,17)</sup>, iii) がん抑制タンパク質 p53 の修飾による DNA 損傷修復を含めた機能制御<sup>18,19)</sup>, の三つの研究である。そこで研究されてきた翻訳後修飾は、他の核内タンパク質に対しても同様に起こり、多くの機能的制御に関わることが明らかになってきている。また一方で、細胞内の化学修飾としては、遺伝情報を担っている DNA

の側もメチル化と脱メチル化反応により転写の制御を受けることが明らかになり、解析が進んでいる<sup>20)</sup>。

転写メディエーター複合体が有する CDK (Cyclin dependent kinase) サブユニットは、Pol II CTD のリン酸化修飾を行い、また他方でコファクターなどを制御することで、転写シグナルを基本転写装置に伝えると同時にクロマチン修飾や RNA の転写後調節にも関わると考えられている。本総説では CDK サブユニットが引き起こす翻訳後タンパク質リン酸化による細胞核内の転写に向けた制御を中心に概説していく。

### 1. 転写メディエーター複合体はキナーゼ活性を有している

転写メディエーター複合体(メディエーター複合体)は、真核生物に普遍的に存在することが知られている Pol II の転写制御複合体である<sup>21)</sup>。ヒトにおいてメディエーター複合体は、約 30 のサブユニットからなる分子量約 2 MDa の巨大複合体であり、DNA 配列特異的に DNA に結合する転写制御因子と、Pol II と基本転写因子が構成する基本転写装置の間を、コファクターと協調して橋渡しする。このことにより、メディエーター複合体は細胞内の転写制御シ

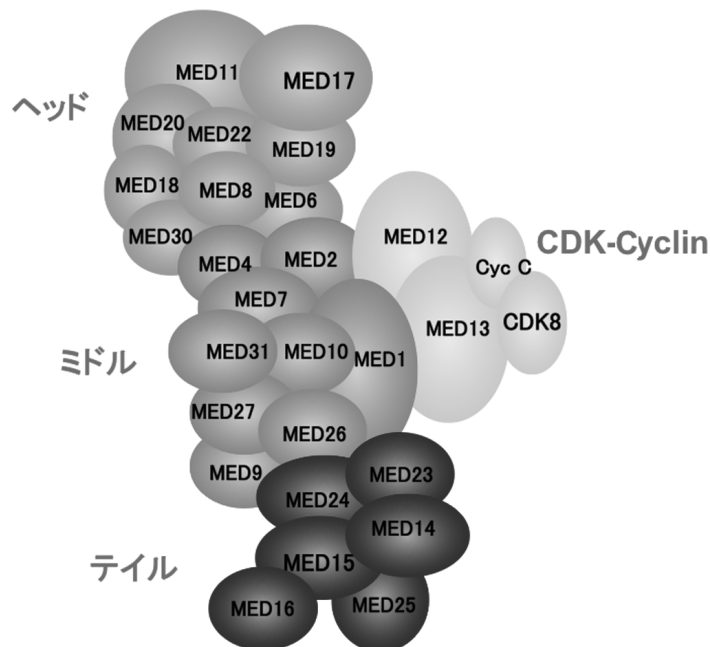


図1 メディエーター複合体のモデル図

ヒトのメディエーター複合体はおよそ 30 個のサブユニットから構成され、複合体内にヘッド、ミドル、テイル、CDK/Cyclin の四つのモジュールを形成している。CDK/Cyclin モジュールの中に CDK8 は存在するが、新たに見つかった CDK19 (旧名 CDK11) が CDK8 と入れ替わり、異なるメディエーター複合体を形成することも明らかになってきた<sup>29)</sup>。CDK/Cyclin モジュールはメディエーターの活性化に伴い離脱すると考えられており、その際には 4 モジュールの完全型をホロメディエーター複合体、CDK/Cyclin の離脱したものをコアメディエーター複合体とも呼ぶ。

グナルを mRNA を産生する遺伝子転写に結びつける機能を果たしている<sup>22,23)</sup>。メディエーター複合体は、その立体構造と生化学的な解析によりヘッド、ミドル、テイルの3モジュールからなるコアメディエーター複合体と、このコア複合体に CDK/Cyclin モジュールを加えたホロメディエーター複合体という、主に二つの複合体状態で存在すると考えられている (図 1)。

ホロメディエーター複合体の CDK8 サブユニットは、7 アミノ酸配列の5番目のセリン (Ser5) をリン酸化することが報告されている<sup>24)</sup>。一般的に転写の際に Pol II は転写開始点周辺のプロモーター領域に5種の基本転写因子 (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH) と共に転写開始前複合体を形成する。このホロメディエーター複合体は、Pol II CTD をリン酸化することにより Pol II の転写開始前複合体へのリクルートを抑制し、転写の抑制的制御に寄与していると考えられている<sup>25)</sup>。また、ホロメディエーター複合体は、CTD 以外の転写制御因子やヒストンをリン酸化することも知られてきており、転写の抑制に限らず分解の制御や、転写の活性化など転写因子特異的な様々な働きを持つと考えられていた<sup>26,27)</sup>。ところが最近、脊椎動物に特異的な CDK19 (最新の統一命名法による新規名称、従来は CDK11 あるいは CDK8L/CDC2L6) がメディエーター

分画のマスマスペクトル解析により見いだされ、この CDK19 も CDK8 同様にメディエーター複合体を構成すること、CDK8 と CDK19 は相互排他的に存在することを我々は明らかにした<sup>28,29)</sup>。さらに si (short interfering) RNA によるタンパク質発現のノックダウン実験により、CDK8 と CDK19 で転写において逆の機能を示すことを見いだした<sup>29)</sup>。詳細に関しては、後の章にて考察するが、このようにメディエーター複合体は様々な転写因子やコファクターと結合し、またそれらを修飾することによってそれらの機能を制御し、遺伝子の発現量を調節している。したがってメディエーター複合体は、細胞核内のタンパク質翻訳後修飾による核内コードの統御において中心的役割を果たしている可能性が大きいと考えられる。そこで、以下にこれらの機構と役割を概説していく。

## 2. CDK8 による転写制御因子のリン酸化と機能制御

メディエーター複合体は、それ自身で受容する、あるいは転写制御因子から伝達される転写制御シグナルを、転写開始装置やクロマチン構造変換装置に伝える役割を持っている。ここではまず、シグナルの上流側の転写制御因子との関連性について発表された論文の結果に基づき考察する。真核生物の細胞内では、様々な転写制御因子が CDK8

表1 CDK8 によるリン酸化の標的とその役割

	標的因子	キナーゼ(種)	修飾アミノ酸部位	分子機能	参考文献
転写制御因子	Sip4	Srb10 (Sc)	未決定	転写活性化	39
	Gal4	Srb10 (Sc)	Ser699	転写活性化	35
	Gcn4	Srb10 (Sc)	未決定	分解促進	32
	Msn2	Srb10 (Sc)	未決定	分解促進	32
	Ste12	Srb10 (Sc)	Ser261, Ser451	分解促進	38
	VP16	Srb10 (Sc)	Ser452, Thr458	未解析	35
	p53	CDK8 (Hs)	Ser33, Ser46	転写活性化?	31
	E2F1	CDK8 (Hs)	未決定	転写抑制?	37
	Notch ICD	CDK8 (Hs)	Ser2481, Ser2484, Ser2506	分解促進	33
	SMAD1/ SMAD3	CDK8 (Hs)	Ser206, Ser214/Thr179, Ser208, Ser213	転写活性化&分解促進	30
転写コファクター	TAF2	Srb10 (Sc)	未決定	未解析	36
	Bdf1	Srb10 (Sc)	未決定	未解析	36
	MED2	Srb10 (Sc)	Ser208	2 μm プラスミドの転写活性化	34
	Cyclin H	CDK8 (Hs)	Ser5, Ser304	CAK 活性抑制&転写抑制	26
	MED13	CDK8 (Hs)	未決定	未解析	40
	CDK8	CDK8 (Hs)	未決定	未解析	40
	ヒストン	Histone H3	CDK8 (Hs)	Ser10	転写活性化

(Srb10) によってリン酸化されていることが知られているが、それぞれのリン酸化が果たす役割は各々の因子に特異的である (表 1)<sup>30-41)</sup>。これらの修飾の多くは酵母の CDK8 ホモログである Srb10 を用いて酵母で行われたものが多く、これに対し、ヒトでの CDK8 によるリン酸化制御は、酵母のそれと比べるとあまり知られていない。

最初に CDK8 が転写において正に機能しているという報告であるが、近年、Firestain らによりヒト CDK8 が一部の大腸がん細胞においてがん遺伝子であることが報告された<sup>42)</sup>。彼らは、様々なリン酸化酵素をターゲットとした sh (short hairpin) RNA ライブラリーを大腸がん由来細胞株である DLD-1 に導入し  $\beta$ -カテニンによる転写量を解析するという手法により、DLD-1 細胞において CDK8 が  $\beta$ -カテニンシグナルを活性化し、また細胞の増殖を活性化することを見いだした。この解析により、約 62% の大腸がん CDK8 を含む遺伝子領域のコピー数の上昇が見られ、CDK8 の発現量と細胞増殖に高い相関のあることが明らかになった。さらに、NIH3T3 細胞を使った軟寒天培地コロニー形成解析により、CDK8 の大量発現は軟寒天培地内で NIH3T3 細胞のコロニーの形成を促進し、この機能にはリン酸化活性が必要であることが明らかとなった。 $\beta$ -カテニンのターゲット遺伝子である *c-Myc* 遺伝子のプロモーター上に CDK8 が  $\beta$ -カテニンと共に存在し、*c-Myc* 遺伝子の転写を正に制御していることが ChIP 解析によって明らかとなった。

一方、CDK8 の転写に対する負の機能としては、Morris らが行った解析により、ヒト CDK8 が細胞周期調節に関わる転写活性化因子 (E2F1) と直接相互作用し、さらに E2F1 をリン酸化することによりその機能を抑制している可能性が示された<sup>37)</sup>。これまで E2F1 に関しては、 $\beta$ -カテニンの分解を制御している *Axin1* と *Axin2* そして *Siah1* 遺伝子の転写を活性化することで  $\beta$ -カテニンシグナルを抑制することがすでに明らかとなっていた<sup>43,44)</sup>。そこで、CDK8 は E2F1 による転写を抑制することで、 $\beta$ -カテニンシグナルの抑制を解除していることが示唆されている<sup>37)</sup>。また Kim らの解析により、 $\beta$ -カテニンは細胞核内において CDK/Cyclin モジュールの構成因子である MED12 と直接相互作用することで、標的遺伝子の転写の活性化を行っていることが新たに示された<sup>45)</sup>。このように、メディエーター複合体の CDK/Cyclin モジュールとそのリン酸化活性は、 $\beta$ -カテニンによる標的遺伝子の転写制御に対して直接と間接の双方のメカニズムにより寄与していることが示されている (図 2)。

上記したように  $\beta$ -カテニンシグナルにおいて、CDK8 は細胞のがん化に対して促進的に働いていることが明らかにされている。しかし一方でヒト CDK8 は結腸がん由来 HCT116 細胞において、がん抑制因子である p53 による

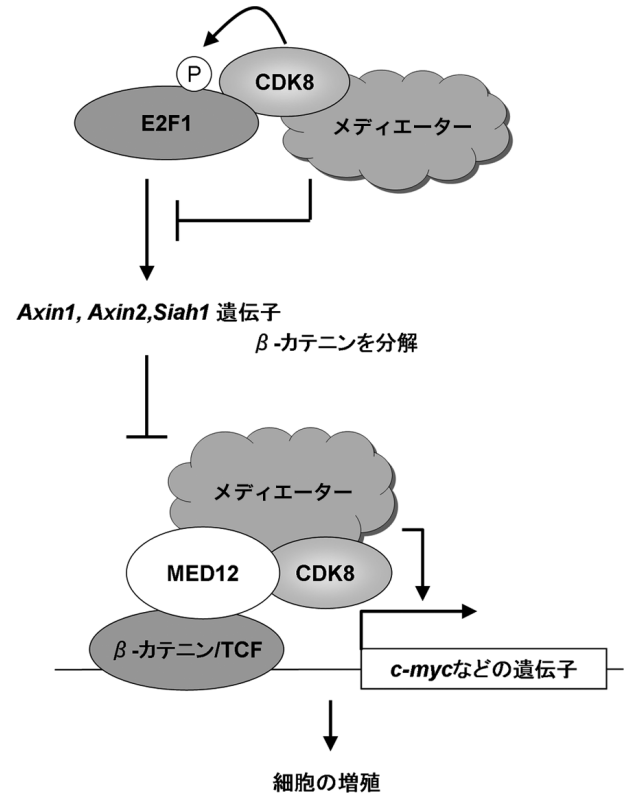


図2  $\beta$ -カテニンシグナルにおける CDK8 によるリン酸化修飾の役割

CDK8 は E2F1 を抑制することで  $\beta$ -カテニンを分解する *Axin1* などの発現を抑制し、また  $\beta$ -カテニンと転写制御複合体を形成することで *c-myc* などの遺伝子の発現を活性化すると考えられており、このどちらの機能にもリン酸化活性が関与している。

*p21* 遺伝子の転写が必要であることが報告された<sup>31)</sup>。また酵母の CDK8 ホモログである Srb10 は p53 の転写活性化ドメイン (1-97aa) と結合し、このドメインに存在する Ser33 と Ser46 をリン酸化することが示されている<sup>46,47)</sup>。これらの Ser33, Ser46 のリン酸化は p53 を安定化することによりアポトーシスを促進することが知られており<sup>48)</sup>、他方で CDK8 のリン酸化活性は、一部の細胞においてはがん抑制に働いている可能性が示唆されている<sup>49)</sup>。

またヒト CDK8 は、コアクチベーター MAM (Mastermind) に直接結合することで NOTCH シグナルをそのリン酸化活性で制御していることが知られている<sup>33)</sup>。膜貫通型レセプターである NOTCH は、Delta などのリガンドを発現している細胞と接触するとプレセニリン/ $\gamma$ -セクレターゼ依存的に切断され、細胞内領域 (intracellular domain; ICD) を遊離させる。ICD は、細胞核内で DNA 結合タンパク質である CBF-1 および MAM とで複合体を形成し、標的遺伝子の転写活性化を行う。SN3T9 細胞において CDK8 は、核内でコアクチベーター MAML (MAM-like) と結合することで NOTCH の標的遺伝子である *HES1* のプロモーター上にリクルートされ、さらに ICD の PEST ド

メインをリン酸化することによりこれを不安定化して、ICDによる *HES1* 遺伝子転写を負に制御することが示された (図 3)。

さらに最近、ヒト CDK8 が CDK9 と協調し、核内で SMAD のリン酸化を行っていることが報告された<sup>30)</sup>。SMAD は、TGF-β や BMP (bone morphogenetic protein) などリガンドとするレセプターのリン酸化酵素により C 末端ドメインがリン酸化されて活性化型となり核内に移行することが知られている。またリンカー領域が MAP キナーゼなどのリン酸化酵素によりリン酸化されることで細

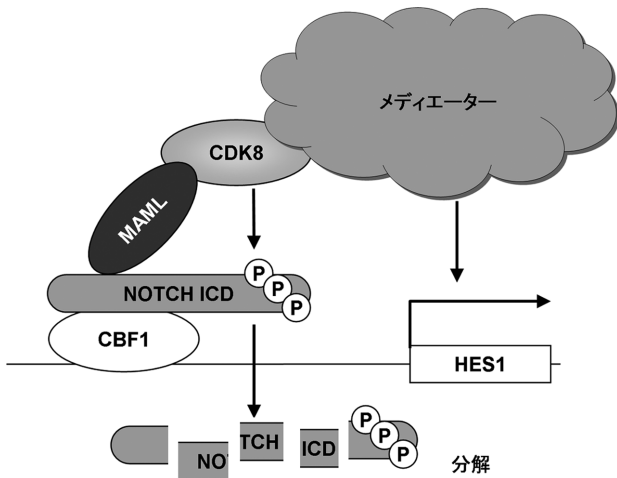


図3 NOTCH シグナルにおける CDK8 によるリン酸化修飾の役割

NOTCH ICD は PEST ドメインが CDK8 によりリン酸化されて不安定化して半減期が短くなる。CDK8 はこのような機構で NOTCH による *HES* の発現を抑制すると考えられている。

胞質に保持され分解が促進されることが知られている<sup>50)</sup>。しかし、この SMAD のリンカー領域は、細胞核内で CDK8 と CDK9 によりリン酸化されることにより核内の転写活性化因子である YAP1 の WW ドメインに認識されるようになることから、CDK8/9 依存的な YAP を介した SMAD の転写活性化メカニズムが提唱されている (図 4)。またこのリン酸化は、ユビキチンの E3 リガーゼである Smuf1 の WW ドメインにも認識され、分解される。その際、SMAD シグナルにおいて CDK8 によるリン酸化は、転写活性化とそれに引き続く分解を制御することによって SMAD の標的遺伝子の発現量の制御を行っていると考えられる。

以上のように、CDK8 による転写制御因子のリン酸化制御は、がん遺伝子の転写制御という役割に加え、正常な細胞での分化制御という役割を持っていることが明らかとなった。その一つとして、CDK8 のノックアウトマウスは、受精卵が着床前の段階で致死になるという表現型を示すことがわかっている<sup>51)</sup>。このことから、CDK8 のリン酸化活性が正常細胞の分化に必要な遺伝子の転写制御を行っていることが示唆されている。

### 3. CDK8 による転写コファクターのリン酸化と機能制御

次にメディエーター複合体と共に転写制御シグナルを基本転写装置に媒介する役割を持つ、様々なコファクターとの関連性に関して考察する。メディエーターのおよそ 30 ある構成サブユニットの一つ CDK8 は、メディエーター自身が相互作用するコファクターに対しても、直接リン酸化修飾をすることで機能制御を行うことが明らかになって

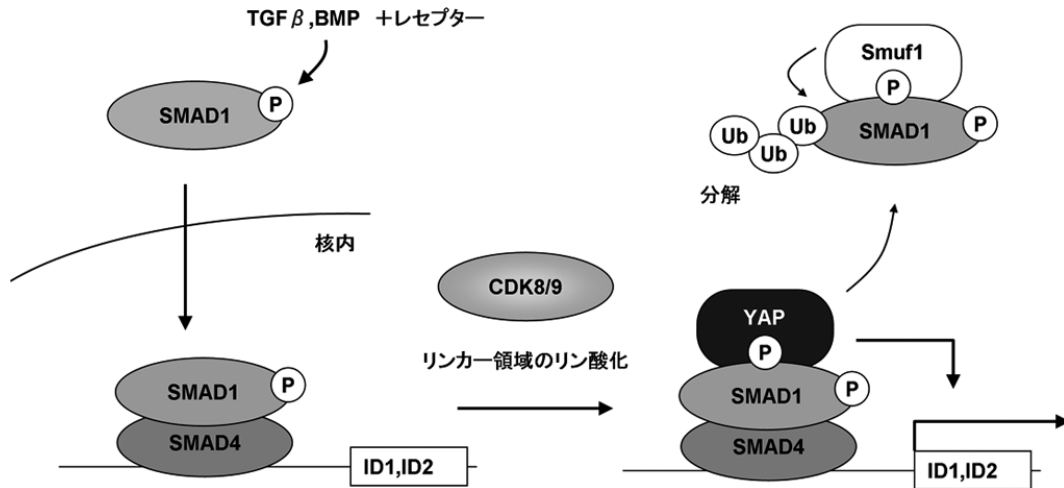


図4 TGF-β/SMAD シグナルにおける CDK8 によるリン酸化修飾の役割

SMAD1 はレセプターリン酸化酵素によって C 末端がリン酸化された後に核内に移行し、SMAD4 などの因子と DNA 結合複合体を形成する。CDK8 と CDK9 は SMAD4 と結合した SMAD1 のリンカー領域をリン酸化する。リンカー領域がリン酸化された SMAD1 は核内で転写活性化因子である YAP と結合して標的遺伝子である ID1 や ID2 の転写を活性化する。またリンカー領域がリン酸化した SMAD1 はユビキチンの E3 リガーゼである Smuf1 と結合し分解される。

いる。酵母の CDK8 ホモログである Srb10 を使った解析により、CDK8 は細胞内において基本転写因子 TFIID のサブユニット TAF2 と、TFIID の相互作用因子である Bdf1 をリン酸化していることが示された<sup>36)</sup>。さらに、酵母のメディエーター複合体サブユニットである MED2 は、Srb10 によりリン酸化されており、この MED2 のリン酸化が酵母の 2  $\mu$ m プラスミドからの遺伝子転写に重要な機能を果たしていることが示されている<sup>35)</sup>。

一方、ヒト細胞を用いた解析により、CDK8 は基本転写因子 TFIH に存在するリン酸化酵素 CDK7 のサイクリンである Cyclin H をリン酸化することにより TFIH 依存的な転写を抑制する役割を果たすことが示された<sup>26)</sup>。生化学的に精製された CDK8 を含むメディエーター複合体は *in vitro* 転写解析において TFIH を介して転写を抑制し、この機能には CDK8 のリン酸化活性が必要であった。またその際 CDK8 は、Cyclin H の 5 番目セリン (Ser5) と 304 番目セリン (Ser304) をリン酸化していることが示された。セリン残基をアスパラギン酸に改変した、リン酸化ミミック変異型 Cyclin H を使った解析の結果、変異型 Cyclin H は野生型と同様に TFIH の CAK モジュールに組み込まれた。しかし、変異型 Cyclin H を含む TFIH は Pol II CTD のリン酸化活性が大きく低下しており、この低下の程度は Ser304 リン酸化よりも Ser5 リン酸化の場合の方が顕著であった。このことから、CDK8 による Cyclin H のリン酸化は、TFIH のリン酸化活性の抑制を引き起こし、この CTD リン酸化活性に依存的な Pol II の転写活性化を抑制すると考えられている。またリン酸化ミミックの変異型 Cyclin H を発現する細胞は、野生型やセリンをアラニンに置換した変異型 Cyclin H を発現する細胞に比べて細胞の増殖が有意に低下するという結果が得られた。高等真核生物では CDK7 は、他の CDK を活性化するための CAK (CDK-activating kinase) として機能していることが知られている<sup>52)</sup>。このような機構により、CDK7 の機能抑制は細胞の増殖低下を引き起こしていると考えられる。以上のことからメディエーターの CDK8 は、TFIH 内の Cyclin H をリン酸化することによって CDK7 の機能を抑制し、その結果 CDK7 が生体内で担っている細胞周期や細胞増殖を制御するという機構の存在が示唆される。

この他にもヒト CDK8 は、メディエーター複合体サブユニットの MED13 と CDK8 自身をリン酸化していることが知られている<sup>40)</sup>。これらのリン酸化が転写制御に与える機能はまだ明らかにされていないが、酵母において MED2 が Srb10 (酵母 CDK8) によってリン酸化され制御されているように、高等真核生物でも CDK8 によるメディエーター複合体サブユニットのリン酸化によって制御される遺伝子が存在することが考えられる。

#### 4. CDK8 によるヒストン H3 のリン酸化

CDK8 はまた、クロマチンを構成するヌクレオソームの制御も行っているらしいことが報告されつつある。HeLa 細胞の核抽出液より精製した CDK8 と TRRAP/GCN5L を含むホロメディエーター複合体 (T/G メディエーター) は、ヒストン H3 の Ser10 をリン酸化してそれに引き続くヒストン H3 の Lys14 のアセチル化を活性化することが明らかになった<sup>41)</sup>。しかし、ヒストン Ser10 のリン酸化は転写を活性化する修飾であると考えられているにもかかわらず<sup>53)</sup>、CDK8 を含むホロメディエーター複合体は *in vitro* 転写において、様々な転写活性化因子による転写活性化を抑制することが知られている。Meyer らが精製した T/G メディエーターも *in vitro* でクロマチンを鋳型とした転写活性化因子によって活性化される転写を抑制することが示された<sup>41)</sup>。RAR  $\beta$ 2 遺伝子のプロモーターにおいて、メディエーター複合体はレチノイン酸刺激に応答して PARP-1 依存的にホロメディエーター複合体からコアメディエーター複合体に置き換わることが知られている<sup>54)</sup>。T/G メディエーターはヒストン H3 をリン酸化とアセチル化した後に CDK/Cyclin モジュールが外れて転写活性化であるコアメディエーターに置き換わるというモデルが考えられている。

また、CDK8 のヒストン H3 リン酸化活性にはメディエーター複合体の CDK/Cyclin モジュールの構成サブユニットである MED12 が必要であることが明らかにされている<sup>40)</sup>。加えて、HeLa 細胞内において、CDK8 は CyclinC、そして MED12 と MED13 から構成されるメディエーター・サブ複合体を形成していることが示されており (図 1)、ここで報告されている CDK8 によるヒストン H3 のリン酸化は、メディエーター複合体とは独立した機能の一環である可能性も考えられる。

このように、メディエーター複合体は、直接ヒストン修飾を介する方向からも Pol II による転写を制御している可能性が示唆されており、さらには様々なヒストン修飾因子やクロマチンリモデリング因子と相互作用し、それらと協調的に遺伝子転写制御を行っていると考えられている<sup>55)</sup>。

#### 5. メディエーター複合体の有するもう一つの CDK サブユニット CDK19 (旧名 CDK11/CDK8L)

ここまでのメディエーター複合体の CDK8 によるリン酸化修飾が引き起こすとして報告された制御反応を紹介、考察してきた。ところが、明らかのようにその反応ターゲットは多岐にわたり、結果として引き起こされる転写への影響は、活性化と抑制のどちらの場合も報告されている。このメディエーター複合体の機能の 2 面性は広く受け入れられており、James D. Watson らの編集した教科書「遺

伝子の分子生物学第6版 (Molecular Biology of the Gene, Sixth Edition)」にも転写活性化と抑制の機構の二つのモデル図にメディエーターは共に描かれている。しかし、メディエーター複合体の存在が明らかになった1990年初頭以来、その作用機構は謎であった。我々にとって興味を引いたのは、2004年になって、前述したSatoらにより精製されたメディエーター複合体分画中にCDK8以外に、CDK11が報告されたことである<sup>28)</sup>(ただし、CDK11の名称を用いた全く別のCDKファミリータンパク質の研究が報告され、混乱を来すことから最近、CDKの名称を整理した統一命名法が提唱され、CDK11は新たにCDK19という名称に変更されている<sup>56)</sup>)。この新規のCDK19は真核生物の中でも脊椎動物以上の高等真核生物にしか存在していない<sup>29)</sup>。

転写におけるPol IIのCTD領域のリン酸化の意味合いを検討していた我々は、直ちにCDK19にタグをつけたHeLa細胞株を樹立して、転写におけるCDK19の役割の研究を行った<sup>29)</sup>。その結果、CDK19はCDK8同様に、他のサブユニットと共にメディエーター複合体を形成しており、その複合体にはCDK8は含まれないこと、逆にCDK8が形成したメディエーター複合体にはCDK19は含まれず、二つのCDKは複合体形成においては相互排他的であることがわかった。また両CDKの細胞内染色により各々の局在を調べたところ、共に核内に存在するが半数以上が別々の領域に分布していた。

両CDKの細胞内での転写活性化における役割を調べるため、siRNAによりCDK8あるいはCDK19(旧名CDK11)の発現をノックダウンした後、細胞内に転写活性化因子としてGal4-VP16をアデノウイルスの主要後期プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を付けたレポーターDNAを導入し、ルシフェラーゼアッセイにより細胞内での転写活性を調べた。その結果、CDK8のノックダウンにより転写は抑制され、逆にCDK19のノックダウンでは転写は活性化された(図5)。このことは、少なくともVP16依存の転写活性化においてはCDK8が細胞核内では活性化に寄与しており、逆にCDK19が抑制に作用していることを示しており、両CDKは全く正反対の役割を果たしていることになる。さらに、*in vitro*のPol II CTDリン酸化反応によってCDK19の形成するメディエーターもCDK8の場合と同様、CTDの5番目セリンをリン酸化することを明らかにしている。

以上の結果から、CDK19の新たな解析によって、メディエーターの転写における活性化と抑制の両反応における関与が、異なるCDKを持ったメディエーターによって担われている可能性が浮上してきた。酵母にはCDK8(Srb10)の1種類しかメディエーターの構成CDKサブユニットは存在しないので、機能の使い分けに関しては解明

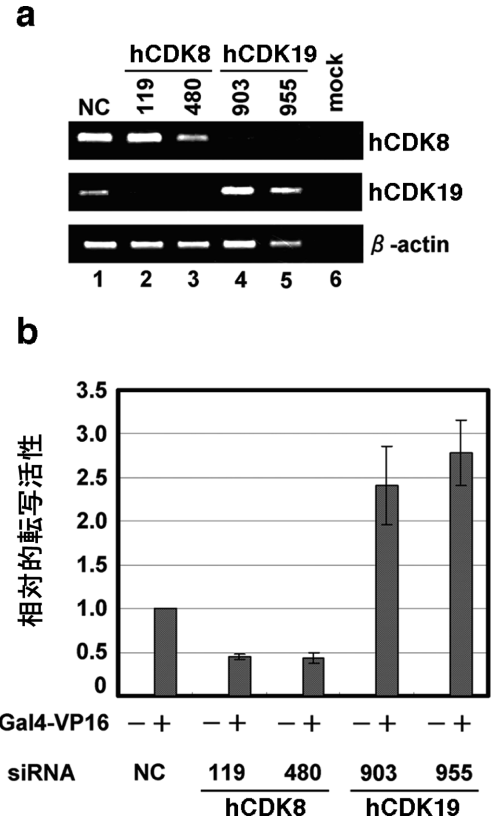


図5 両CDKのノックダウンによる細胞内転写活性化への影響  
a. 各々のヒトCDKに対する2種類のsiRNA(hCDK8が119と480, hCDK19が903, 955)を調製し、HeLa細胞に導入して2.5日後にhCDK8とhCDK19(旧名hCDK11)の細胞内でのmRNAをRT-PCRにより定量した。NC:非ターゲットコントロール。mock:非鋳型コントロール。  
b. siRNA処理した細胞の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより定量した。siRNA導入後2.5日にGal4-VP16発現ベクターとレポータープラスミドを細胞に導入して、1日後に蛍光の強さを計測した。

の必要があるが、脊椎動物や高等植物に関しては、これまでCDK8が行っているとして論文発表されたリン酸化の引き起こす諸現象もCDK8の行うものと、CDK19の行うものが混在して認識されている可能性がある。今後は各々のCDKによりリン酸化修飾を受けるターゲットの違いと、それに伴う生理機能を明らかにする方向に研究を推進し、二つのCDKの構成するメディエーター複合体による転写における機構の解明を進めようとしている。

## 6. CDK以外のメディエーターサブユニットによる翻訳後修飾

メディエーター複合体によるタンパク質翻訳後修飾は、上記のようにCDK8(Srb10)のキナーゼ活性によるものが多く解析されているが、それ以外のサブユニットの酵素活性による修飾も報告されてきている。酵母メディエーター複合体のサブユニットであるMED5は、GCN5関連

N-アセチル化酵素スーパーファミリーに属するHATドメインを持っており、フリーのヒストンならびにヌクレオソーム構造を構成したヒストンのどちらもアセチル化することができることが知られている<sup>57)</sup>。しかし、酵母MED5のヒトホモログであると考えられているMED24/TRAP100には、このHATドメインが存在しないことも知られており、メディエーター複合体によるヒストンの直接のアセチル化は酵母特異的な現象であると現在では解釈されている<sup>21)</sup>。

### おわりに

真核生物の転写メディエーター複合体は、およそ30サブユニットのタンパク質により構成される巨大複合体であり、かつ細胞核内シグナルの受容から転写開始装置へのシグナルの受渡しという重要な機能的位置づけにある。そこで、この複合体が行うタンパク質翻訳後修飾の結果として引き起こされる転写制御機構は、非常に複雑であり、様々な転写をそれぞれの転写制御因子特異的に制御していると考えられる。細胞内における遺伝子の発現は、細胞の置かれている環境に反応して、時間的、空間的、量的、質的に厳密に制御される必要があり、メディエーター複合体はCDK8とCDK19(旧名CDK11)のリン酸化活性を通して様々な環境応答遺伝子などの発現量の微調整を行っていることが考えられる。脊椎動物以上の高等真核生物において存在するCDK19は、やはりCDK8とは別にリン酸化されて制御される転写因子やコファクターを持っている可能性が高くなってきたことから、今後メディエーター複合体の翻訳後修飾活性による転写調節機構の更なる解析が待たれる。

以上、細胞核内でキナーゼが引き起こすリン酸化修飾と、それによる転写制御として、本総説では機能の良くわかってきているメディエーター複合体による制御について記述してきた。これらの報告結果は、ある特定のタンパク質の決まった位置のアミノ酸残基の修飾が、核内事象の制御を行うのに重要であるという「核内コード」仮説の検証のために重要な糸口を与えると考えられる。最初に記述したように、現在タンパク質が受ける翻訳後修飾にはリン酸化のみならず、アセチル化、メチル化、グリコシル化、スモ化、ユビキチン化、等々多くのものが知られるようになってきている。これらの修飾反応の相互作用も考えられる。アミノ酸の修飾の種類と、修飾位置、修飾される時間などを今後、秩序だてて整理し、生命現象との関連性、意味合いが一体、核内コードという形で規則化されうるのであるかを生化学、分子生物学、構造生物学、システム生物学等を駆使しつつ明らかにしていくことが重要であろう。

### 文 献

- 1) Roeder, R.G. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 327-335.
- 2) Kornberg, R.D. (1999) *Trends Cell Biol.*, **9**, M46-M49.
- 3) Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., & Richmond, T.J. (1997) *Nature*, **389**, 251-260.
- 4) Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnat, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P. R., & Kornberg, R.D. (2000) *Science*, **288**, 640-649.
- 5) Armache, K.J., Kettenberger, H., & Cramer, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6964-6968.
- 6) Lander, E.S., et al. (2001) *Nature*, **409**, 860-921.
- 7) Venter, J.C., et al. (2001) *Science*, **291**, 1304-1351.
- 8) Orlando, V. (2000) *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 99-104.
- 9) Kan, C.W., Doherty, E.A., Buchholz, B.A., & Barron, A.E. (2004) *Electrophoresis*, **25**, 3564-3588.
- 10) Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) *Cell*, **61**, 203-212.
- 11) Karin, M. (1992) *FASEB J.*, **6**, 2581-2590.
- 12) Perissi, V. & Rosenfeld, M.G. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 542-554.
- 13) O'Malley, B.W., Qin, J., & Lanz, R.B. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 310-315.
- 14) Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) *Science*, **293**, 1074-1080.
- 15) Mellor, J. (2006) *Trends Genet.*, **22**, 320-329.
- 16) Orphanides, G. & Reinberg, D. (2002) *Cell*, **108**, 439-451.
- 17) Hampsey, M. & Reinberg, D. (2003) *Cell*, **113**, 429-432.
- 18) Fingerhahn, I.M. & Briggs, S.D. (2004) *Cell*, **117**, 690-691.
- 19) Kruse, J.P. & Gu, W. (2009) *Cell*, **137**, 609-622.
- 20) Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (2005) *Nature*, **436**, 1103-1106.
- 21) Bourbon, H.M. (2008) *Nucl. Acids Res.*, **36**, 3993-4008.
- 22) Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., & Conaway, J.W. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 250-255.
- 23) Malik, S. & Roeder, R.G. (2005) *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 256-263.
- 24) Hirose, Y. & Ohkuma, Y. (2007) *J. Biochem.*, **141**, 601-608.
- 25) Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.M., Wilson, C.J., Koh, S. S., & Young, R.A. (1998) *Mol. Cell*, **2**, 43-53.
- 26) Akoulitchev, S., Chuikov, S., & Reinberg, D. (2000) *Nature*, **407**, 102-106.
- 27) Meyer, K.D., Donner, A.J., Knuesel, M.T., York, A.G., Espinosa, J.M., & Taatjes, D.J. (2008) *EMBO J.*, **27**, 1447-1457.
- 28) Sato, S., Tomomori-Sato, C., Parmely, T.J., Florens, L., Zybailov, B., Swanson, S.K., Banks, C.A., Jin, J., Cai, Y., Washburn, M.P., Conaway, J.W., & Conaway, R.C. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 685-691.
- 29) Tsutsui, T., Umemura, H., Tanaka, A., Mizuki, F., Hirose, Y., & Ohkuma, Y. (2008) *Genes Cells*, **13**, 817-826.
- 30) Alarcón, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., Sapkota, G., Pan, D., & Massagué, J. (2009) *Cell*, **139**, 757-769.
- 31) Donner, A.J., Szostek, S., Hoover, J.M., & Espinosa, J.M. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 121-133.
- 32) Chi, Y., Huddleston, M.J., Zhang, X., Young, R.A., Annan, R. S., Carr, S.A., & Deshaies, R.J. (2001) *Genes Dev.*, **15**, 1078-1092.
- 33) Fryer, C.J., White, J.B., & Jones, K.A. (2004) *Mol. Cell*, **16**, 509-520.
- 34) Hallberg, M., Polozkov, G.V., Hu, G.Z., Beve, J., Gustafsson,



- C.M., Ronne, H., & Björklund, S. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3370–3375.
- 35) Hirst, M., Kobor, M.S., Kuriakose, N., Greenblatt, J., & Sadowski, I. (1999) *Mol. Cell*, **3**, 673–678.
- 36) Liu, Y., Kung, C., Fishburn, J., Ansari, A.Z., Shokat, K.M., & Hahn, S. (2004) *Mol. Cell Biol.*, **24**, 1721–1735.
- 37) Morris, E.J., Ji, J.Y., Yang, F., Di Stefano, L., Herr, A., Moon, N.S., Kwon, E.J., Haigis, K.M., Näär, A.M., & Dyson, N.J. (2008) *Nature*, **455**, 552–556.
- 38) Nelson, C., Goto, S., Lund, K., Hung, W., & Sadowski, I. (2003) *Nature*, **421**, 187–190.
- 39) Vincent, O., Kuchin, S., Hong, S.P., Townley, R., Vyas, V.K., & Carlson, M. (2001) *Mol. Cell Biol.*, **21**, 5790–5796.
- 40) Knuesel, M.T., Meyer, K.D., Donner, A.J., Espinosa, J.M., & Taatjes, D.J. (2009) *Mol. Cell Biol.*, **29**, 650–661.
- 41) Meyer, K.D., Donner, A.J., Knuesel, M.T., York, A.G., Espinosa, J.M., & Taatjes, D.J. (2008) *EMBO J.*, **27**, 1447–1457.
- 42) Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M.G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J.S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., Chan, J.A., Baselga, J., Taberero, J., Root, D.E., Fuchs, C.S., Loda, M., Shivdasani, R.A., Meyerson, M., & Hahn, W.C. (2008) *Nature*, **455**, 547–551.
- 43) Hughes, T.A. & Brady, H.J. (2005) *Exp. Cell Res.*, **303**, 32–46.
- 44) Xie, W., Jin, L., Mei, Y., & Wu, M. (2008) *J. Cell. Mol. Med.*, **13**, 1719–1727.
- 45) Kim, S., Xu, X., Hecht, A., & Boyer, T.G. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 14066–14075.
- 46) Ansari, A.Z., Koh, S.S., Zaman, Z., Bongards, C., Lehming, N., Young, R.A., & Ptashne, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14706–14709.
- 47) Ansari, A.Z., Ogirala, A., & Ptashne, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2346–2349.
- 48) Bode, A.M. & Dong, Z. (2004) *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 793–805.
- 49) Firestein, R. & Hahn, W.C. (2009) *Cancer Res.*, **69**, 7899–7901.
- 50) Feng, X.H. & Derynck, R. (2005) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 659–693.
- 51) Westerling, T., Kuuluvainen, E., & Makela, T.P. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 6177–6182.
- 52) Fisher, R.P. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 5171–5180.
- 53) Li, B., Carey, M., & Workman, J.L. (2007) *Cell*, **128**, 707–719.
- 54) Pavri, R., Lewis, B., Kim, T.K., Dilworth, F.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P., & Reinberg, D. (2005) *Mol. Cell*, **18**, 83–96.
- 55) Malik, S. & Roeder, R.G. (2008) *Mol. Cell*, **31**, 305–306.
- 56) Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.H., & Wolgemuth, D.J. (2009) *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1275–1276.
- 57) Lorch, Y., Beve, J., Gustafsson, C.M., Myers, L. C., & Kornberg, R.D. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 197–201.
-