

転写伸長研究の新展開

山口 雄輝

遺伝子の発現制御という観点から、転写開始後の過程は従来あまり面白みのないものと見なされていたが、過去10年の間にその認識は180度転換した。新たな技術開発により可能になったゲノムワイド解析の結果、全遺伝子のかなりの割合が、主に転写開始後の段階で制御されていることが判明したのである。そのため従来、生化学的に同定・解析されてきた転写伸長因子が改めて脚光を浴びている。さらに、転写と共役して遺伝子のコード領域でヒストンの化学修飾が起こっていることや、転写とRNAプロセッシングが緊密に共役していることなども明らかとなり、今や転写開始後の過程は遺伝子発現研究における最もホットな分野と目されている。本稿では当該研究分野における最近の進展について分かりやすく概説する。

1. Pol II の C 末端ドメイン

RNAポリメラーゼII (Pol II) は、Rpb1~Rpb12という12個のサブユニットからなる500 kDaを超える複合体である。Kornbergが酵母Pol IIのX線結晶構造を解明し、(その他の研究成果と合わせて)2006年ノーベル化学賞を受賞したことは、まだ記憶に新しい。最大サブユニットであるRpb1のC末端には、Tyr₁-Ser₂-Pro₃-Thr₄-Ser₅-Pro₆-Ser₇という7アミノ酸が数十回、ほぼ中断なく繰り返されたC末端ドメイン(CTD)が存在している¹⁾。リピート数は種により異なるが、出芽酵母で26~27ユニット、ヒトでは52ユニットに達する(図1)。ヒトでは単純計算で364アミノ酸になるので、全長1970アミノ酸のヒトRpb1タンパク質のかなりの割合を占める、極めて特殊な領域であることがお分かりいただけるだろう。Kornbergらが解いたPol IIのX線構造ではCTDは可視化されておらず、CTDはいわゆる天然変性状態をとっていると考えられる。

Pol IIはPol IおよびPol IIIと進化的起源を共にし、サブユニット構成もよく似ているが、CTDはPol IIに固有である。こういったことから、Rpb1の遺伝子配列が決定され、CTDの存在が見つかった1980年代半ばには、CTDがPol II固有の機能に重要であることが推定された。そして後述するように、その推定の正しさが後に証明される。

初期の解析から、まず以下のことが明らかとなった。出芽酵母を中心とした遺伝学的解析から、CTDが生育に必須であること(CTDを短縮していくと10数コピー以下で増殖遅延を示し、さらに短縮すると致死となること)が判明した²⁾。一方、*in vitro*転写系を用いた解析からは、一見相矛盾する結果が得られた。すなわち高度精製系を用いた解析からは、CTDはRNA合成に不要という結果が得られたのに対し、粗抽出液を用いた解析からは、CTDはRNA合成に重要であるという結果が得られたのである³⁾。こうしたことから、CTDはPol IIの酵素活性そのものには不要だが、生体内で重要な働きをしていることが示唆された。

その後の解析から、CTDが転写活性化、転写開始、転写伸長、転写終結、mRNAのキャッピング、スプライシング、ポリ(A)付加、核外輸送といった、およそありとあらゆるPol II転写産物の生合成過程に関与していることが明らかとなってきた(図2)^{4,5)}。1990年代後半から2000年代前半にかけて、あるパラダイムシフトがCTDの解析を通じて引き起こされたことは特筆に値する。従来mRNA

東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻 (〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259)

New development in research of transcription elongation
Yuki Yamaguchi (Tokyo Institute of Technology, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Department of Biological Information, 4259 Nagatsuta, Yokohama 226-8501, Japan)

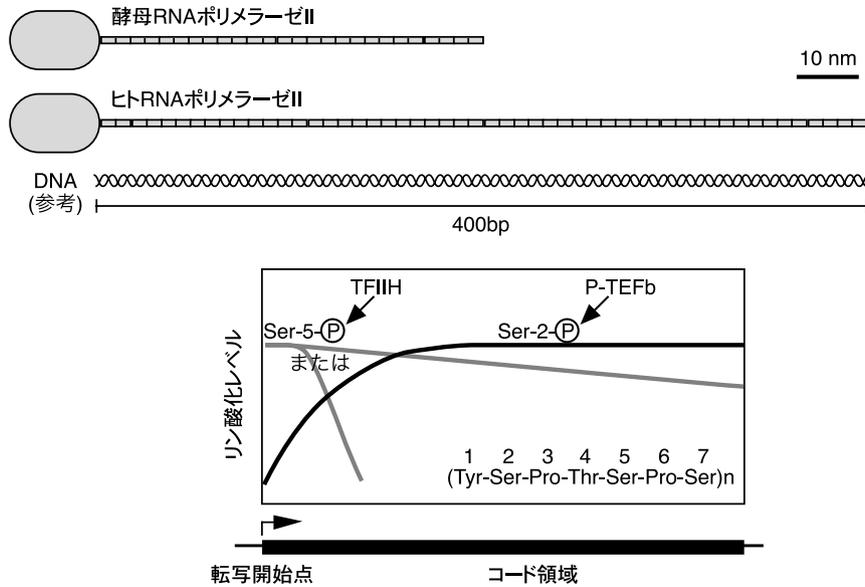


図1 Pol II CTDの一次構造とリン酸化パターン

CTDは7アミノ酸のモチーフが26回(酵母)から52回(ヒト)繰り返された構造をしている。CTDのSer-2とSer-5は転写サイクルの過程で、異なるキナーゼによって異なるパターンでリン酸化される。Ser-5リン酸化のパターンは報告により食い違っており、プロモーター近傍でのみ高いという報告もあれば、遺伝子全域に渡って高度にリン酸化されているという報告もある。

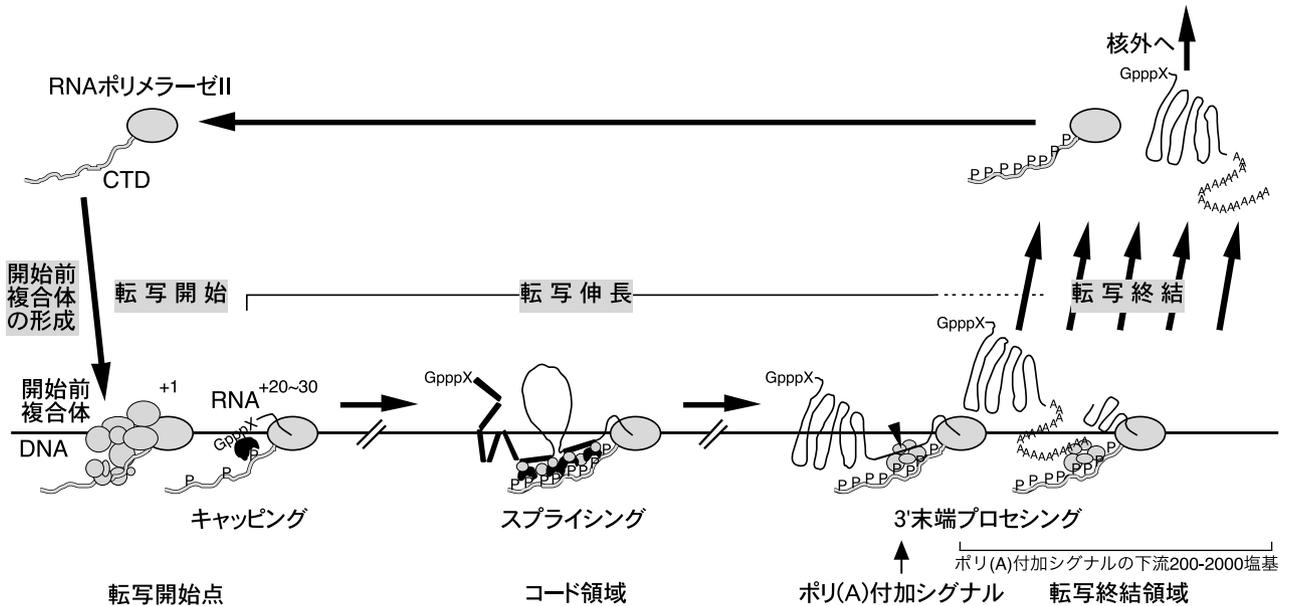


図2 転写と mRNA プロセッシングの共役

転写の開始、伸長、終結のタイミングとはほぼ一致して、mRNA 前駆体のキャッピング、スプライシング、3'末端プロセッシングが起きる。Gpppはキャップ構造を示す。転写終結はポリ(A)付加シグナルの下流200から2,000塩基の位置でランダムに起こると言われている。

プロセッシングは、教科書的には転写後の過程と見なされていたが、実際には mRNA プロセッシングは転写と時空間的に密接に共役して起きていることが分かり、そのことが広く受け入れられるようになったのである(図2)。

過去10余年の間に得られた分子レベルの知見を説明す

るのに、Buratowskiはヒストンコードになぞらえて、CTDコードという言葉提案している⁵⁾。ヒストンほど複雑ではないにしても、CTDは様々な化学修飾を受ける。機能的意義がはっきりしているのは、Ser-2、Ser-5そしてSer-7のリン酸化である(図1)^{1,6)}。CTDのSer-5とSer-7は主に

基本転写因子 TFIIF が有するキナーゼ活性によってリン酸化され、そのリン酸化はプロモーター近傍において転写開始のタイミングで起こる。一方、CTD の Ser-2 は主に転写伸長因子 P-TEFb (positive transcription elongation factor b) によってリン酸化され、そのリン酸化は転写開始点の下流領域において転写伸長の進行に伴って起こる。CTD コードの読み取り分子が多数見つかり、それらのあるものはリン酸化感受性に、またあるものはリン酸化依存性に CTD と結合する¹⁾。その結果、Pol II の転写サイクルにおいて様々な CTD 結合因子が CTD 上に順次、集合・解離し、CTD 結合因子によって担われる生化学的反応が、転写サイクルの進行に伴って段階特異的に起こるものと考えられる (図 2)。

CTD の主要な結合因子と、CTD のリン酸化が制御する過程についていくつか実例を挙げて説明しよう。

(1) メディエーター (Mediator)

メディエーターは 20 種類以上のサブユニットからなる巨大複合体であり、非リン酸化型の CTD と結合して、プロモーターに結合した開始前複合体に取り込まれる。メディエーターは複合体の様々な表面を介して多数の転写アクセレーターと相互作用し、活性化シグナル依存的な転写開始の活性化に重要な役割を果たしている。

(2) キャッピング酵素

キャッピング酵素は Ser-5 がリン酸化された CTD と特異的に相互作用し、転写開始直後の Pol II に取り込まれる。また、リン酸化型 CTD の結合はアロステリックな作用も持ち、キャッピング酵素の触媒活性を高める。CTD のリン酸化はこの二つの働きを通じて mRNA 5' 末端のキャッピングを促進し、その結果、キャッピングは Pol II の転写開始直後に起こる。

(3) NELF (negative elongation factor)

後で詳述するように、NELF は負の転写伸長因子であり、DSIF (DRB sensitivity-inducing factor) と協調して Pol II の伸長停止を引き起こす。NELF は CTD に直接結合するわけではなく、CTD 以外の部分に結合するが、P-TEFb による Ser-2 のリン酸化によって結合が阻害される。すなわち CTD リン酸化の機能的意義の一つは負の転写伸長因子による抑制を解消して、転写伸長を活性化することであるといえる。

(4) Pcf11

Pcf11 は mRNA の 3' プロセシング因子の一つであり、転写終結因子としても働いている。Pcf11 は Ser-2 がリン酸化された Pol II と特異的に相互作用し、転写開始点の下流領域で転写伸長複合体に取り込まれて、ポリ(A)付加シグナル依存的な 3' プロセシングおよびそれと共役した転写終結に関与している¹⁾。

(5) インテグレーター (Integrator)

インテグレーターは 12 個のサブユニットからなる複合体で、snRNA 遺伝子の特殊な 3' プロセシングに関わる。インテグレーターは CTD と結合し、その親和性は Ser-7 のリン酸化によって著しく高まる。Ser-7 リン酸化の意義は、Ser-2 や Ser-5 のリン酸化に比べてまだよく理解されていないが、その機能の一つは snRNA 遺伝子の 3' プロセシングを促進することにあるらしい⁷⁾。

(6) Set2

Set2 は遺伝子の下流領域で働くヒストンメチルトランスフェラーゼであり、ヒストン H3 の Lys-36 を特異的にメチル化する。Set2 は、Ser-2 と Ser-5 の両方がリン酸化された CTD に最も高い親和性で結合し、転写伸長複合体に取り込まれて、遺伝子コード領域のヒストン修飾を転写と共役して誘導すると考えられる⁸⁾。

これら CTD 結合タンパク質のあるものは共通した構造モチーフを有している。具体的には CID (CTD-interacting domain) や WW ドメインなどであり、これらと CTD ペプチドの共結晶構造がいくつか報告されている。しかし、そういった共通モチーフを持たない CTD 結合タンパク質も多数存在しており、それらが一体どうやって CTD を (多くの場合、リン酸化状態特異的に) 認識しているかは興味深い不明点である。

2. 転写伸長の基本メカニズム

転写は反応機構論的に見て、少なくとも四つのステップに分けることができる (図 2)。まず、一群の基本転写因子 (general transcription factor) と Pol II が遺伝子のプロモーター領域に集合する (開始前複合体の形成)。次に、プロモーター DNA が部分的に巻き戻されて一本鎖部分が露出し (プロモーターオープニング)、RNA 合成が開始する。Pol II の動き出しに伴って基本転写因子との結合を断ち切る必要があり (プロモータークリアランス)、これらのステップを合わせて広義の転写開始とみなす。その後、Pol II は DNA 上を滑走しながら mRNA 前駆体を合成していく (転写伸長)。その長さは数 kb から、ときには 1 Mb 以上に達する。Pol II の RNA 合成速度は毎秒 20~30 塩基なので、転写伸長には数分から長いものでは 10 時間以上を要する。そして Pol II は遺伝子の 3' 末端に到達すると、DNA や RNA から解離する (転写終結)。

RNA ポリメラーゼの転写伸長機構は、大腸菌 RNA ポリメラーゼの生化学的解析 (部位特異的なクロスリンクや FRET 解析) や出芽酵母 Pol II の X 線構造解析などから、かなり詳細に明らかとなっている。伸長途中の Pol II-DNA-RNA 複合体 (伸長複合体) は図 3 のような構造をしている。新生 RNA の 3' 末端の 11~12 塩基は鋳型鎖 DNA

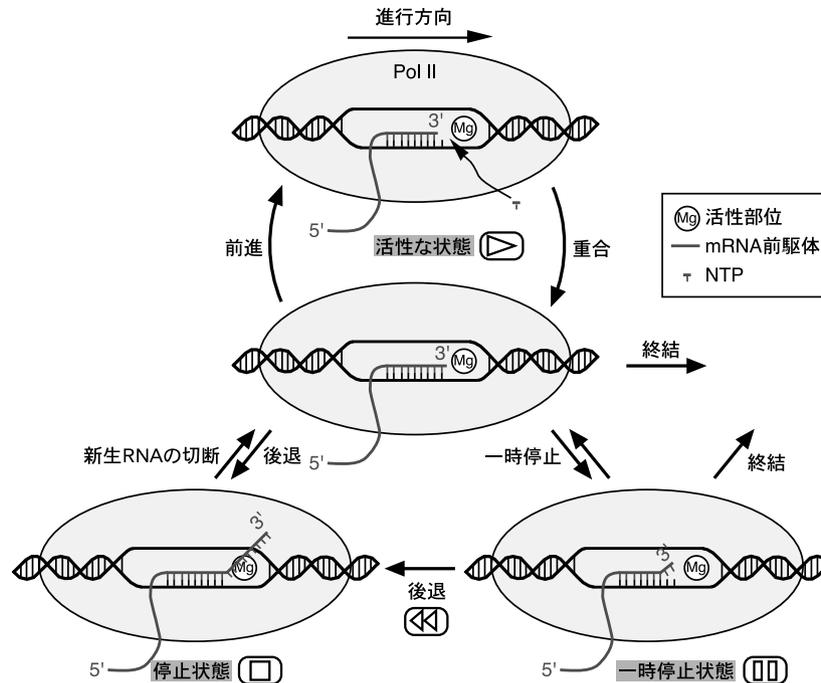


図3 転写伸長の基本メカニズム

転写伸長複合体の構造が模式的に示されている。Pol IIは「DNA バブル」を抱え込んでいる。新生 RNA の3'末端の11~12塩基は鋳型鎖 DNA とハイブリッドを形成しており、その3'末端は Pol II の活性部位に配置されている。詳しくは本文を参照。

とハイブリッドを形成しており、それにより新生 RNA は伸長複合体に保持され、新生 RNA の3'末端は Pol II の活性部位に配置されている。伸長複合体はカーテンレール上のランナーのように物理化学的に安定であり、*in vitro* で高濃度の塩や界面活性剤に対して耐性を示す⁹⁾。これは、長時間を要することもある RNA 合成を完遂するために必要な性質といえる。

しかしもう少し細かく見てみると、転写伸長は単調な過程ではなく、様々な要因によって停止しがちな断続的過程であることが分かる。伸長途中の Pol II は(1)先に進む、(2)その場で一時停止する (pausing)、(3)後退する (backtracking)、(4)終結する、という四つの選択肢を持ち、熱力学的法則に基づいて1塩基ごとに判断を下しているのである (図3)。熱力学的にみて、Pol II にとって前進と後退に大差ない点に注意してほしい。Pol II が後退する場合、RNA の3'末端は Pol II の活性部位から外れ、Pol II から突き出た形となる (図3)。ここから直ちに RNA 合成を再開することは不可能であり、後退した Pol II は安定な停止状態 (arrest) となる。停止状態からの転写再開には特別な機構が必要とされる (後述)。

それでは Pol II の選択は一体どのように制御されているのかというと、核酸上で起こるその他の過程と同様、多数のトランス作動因子のシスエレメント (多くの場合、新生 RNA 上に存在) が制御を担っている。大腸菌 RNA ポリメ

ラーゼの系で働くターミネーターヘアピンは、詳しく解析された有名な例である。ターミネーターヘアピンはヘアピン構造を作る領域とその下流の連続したUからなる。この構造が転写されると、ヘアピン領域が二次構造を形成し、それが新生 RNA を RNA ポリメラーゼから引き抜く力として働く。そのとき伸長複合体中の DNA-RNA ハイブリッドが A-U リッチだと、新生 RNA は引き抜かれて転写終結が導かれる。この例から示されるように、DNA-RNA ハイブリッドの安定性は、伸長複合体の安定性を決定する一つの要因となっている (図4)。

トランス作動因子としては、転写伸長因子と呼ばれる一群の因子が伸長制御に中心的な役割を果たしている。それらの多くは RNA ポリメラーゼと直接結合して、伸長反応を正負に制御している。転写伸長因子については以下で詳述する (図4)。ヒストンが伸長制御に果たす役割も見逃すことができない。ヌクレオソームは Pol II のロードブロックとして働き、DNA 上で起こる他の反応と同様、転写伸長を全般的に抑制することが知られている (図5)。その一方で、遺伝子のプロモーター領域だけでなくコード領域でも種々のヒストン修飾が、転写と共役して起きることが明らかとなっている (図6)⁸⁾。それらの機能はまだ余りよく分かっていないが、化学修飾を受けたヒストンが他の因子をリクルートするなどの働きを介して転写伸長を促進する方向に働く可能性も考えられる。

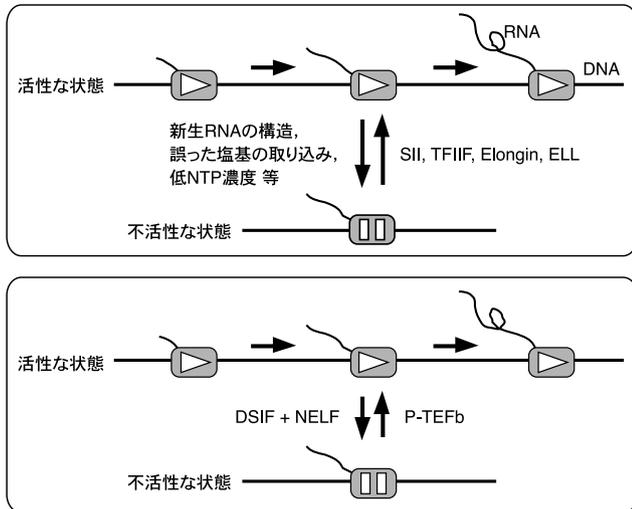


図4 転写伸長の制御メカニズム概要

転写伸長複合体は活性な状態と不活性な状態との間の平衡状態にあり、転写伸長はいくつかの異なるメカニズムで制御されている。

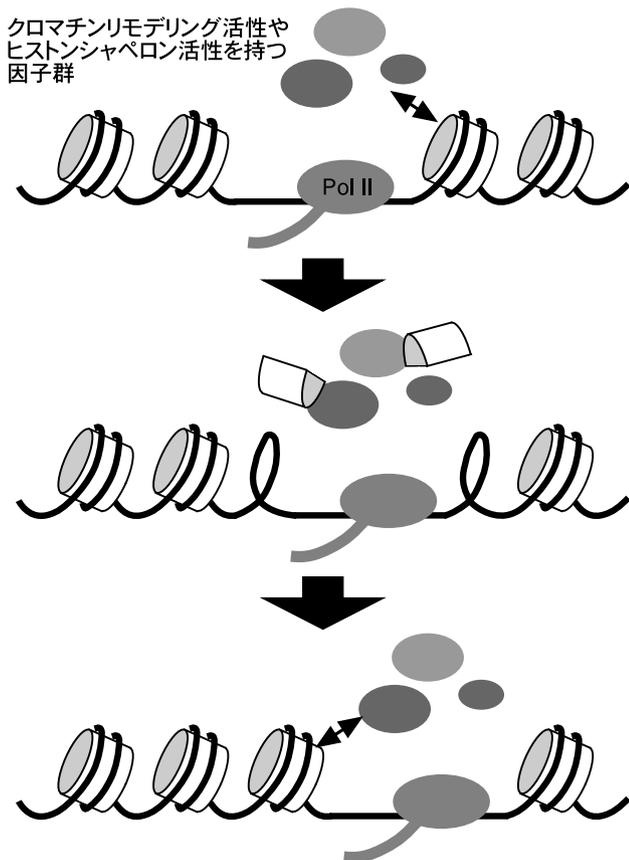


図5 クロマチンによる転写伸長阻害とその解除

クロマチン構造はPol IIによる転写伸長のバリアとして働くが、この障害を取り除く装置が存在している。

転写伸長を制御するその他の要因として、誤った塩基の取り込みがある(図4)。誤った塩基がRNAの3'末端に取り込まれると、その次の塩基を挿入する反応の速度が著し

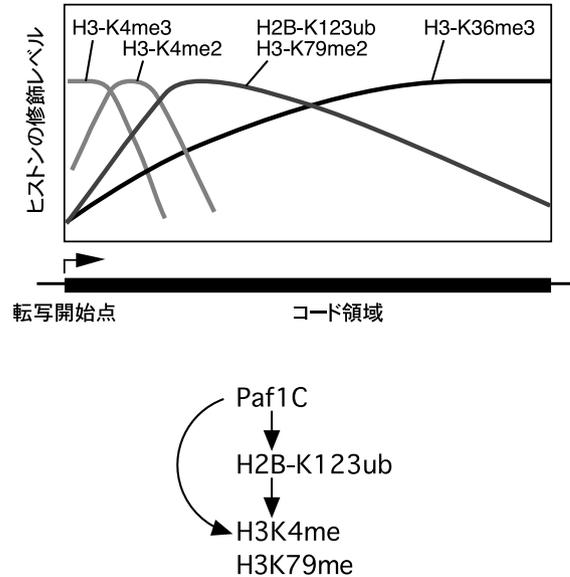


図6 遺伝子のコード領域におけるヒストンの化学修飾

遺伝子のコード領域におけるヒストンの化学修飾のパターンを模式的に示している。その下には、ヒストンの化学修飾におけるPaf1Cの役割を示している。ub: ユビキチン化, me: メチル化。

く低下するため、RNAポリメラーゼは停止状態に陥る^{9,10}。停止状態からの復帰は、ポリメラーゼ自身が持つ校正活性によって行われる(後述)。ヌクレオチド三リン酸(NTP)の濃度も、少なくとも*in vitro*では伸長速度に大きく影響し、*in vivo*でもNTP濃度を低下させる薬剤で処理すると伸長速度の低下が観察される(図4)。

3. 転写伸長因子

転写伸長因子は現在までに10種類以上が見つかるが、それらのほとんどは*in vitro*でPol IIの転写あるいは転写伸長を制御する活性を指標に精製・同定されたものである。表1に示したように、転写伸長を抑制する因子はNELFとDSIFだけである(ただしDSIFは正負両方の働きを持っている)のに対し、転写伸長を促進する因子は多数存在する。*in vitro*の生化学的解析が先行した反面、これら因子の生細胞内での役割はまだ十分に理解されておらず、生化学的に似た活性を持つ多数の因子の機能が重複しているのか、それとも何らかの役割分担が存在しているのか、不明な点が多い。しかし後述するように、正の転写伸長因子の多くが*in vivo*で重複しない重要な役割を果たしていることが、最近の筆者らの研究から示唆されている。まずは個々の転写伸長因子の働きについて、一部取り上げて紹介したい。

(1) SII

SII(別名TFIIS)はPol IIの転写促進活性を指標にして1976年、名取、関水らによってマウスのエールリッヒが

表1 ヒト Pol II に作用する転写伸長因子

転写伸長因子	サブユニット	コメント
TFIIF	RAP30, RAP74	基本転写因子の一つ, 伸長の促進
SII/TFIIS		アレストの解除, 転写忠実度の上昇, クロマチン伸長の促進
SIII/Elongin ELL	A, B, C	伸長の促進
DSIF	Spt4, Spt5	伸長の促進 一時停止の誘導, 伸長の促進, mRNA プロセッシングへの関与
NELF	A, B, C/D, E	一時停止の誘導 mRNA プロセッシングへの関与
P-TEFb	Cdk9, Cyclin T	伸長抑制の解除, タンパク質リン酸化活性
Tat-SF1 Paf1 複合体	Paf1, Ctr9, Leo1, Cdc73, Ski8	伸長の促進 伸長の促進, ヒストン修飾への関与
Spt6		伸長の促進, クロマチン伸長の促進
FACT Elongator	Spt16, SSRP1 Elp1, Elp2, Elp3	クロマチン伸長の促進 クロマチン伸長の促進, ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性
HDAg		D型肝炎ウイルスタンパク質

ん細胞から精製, 同定された因子である¹¹⁾. この発見は, 転写伸長因子の重要性が確立される遙か以前のことであり, 真核生物の転写因子全体を見渡しても, 最初期に同定されたものの一つである. その後の解析から, SII は Pol II に直接結合して作用する転写伸長因子であることが判明し, とりわけ後退した停止状態からの復帰を誘導することが判明した¹⁰⁾. その反応機構はというと, Pol II の後退によって活性部位から飛び出した RNA を切断・除去する反応を誘導することにより, RNA の 3'末端が Pol II の活性部位に再び配置されるようにしていると考えられる (図 3, 4). といっても, SII 自身がリボヌクレアーゼ活性を持っているわけではなく, Pol II の RNA 合成の活性中心 (あるいはその付近) に存在する隠れたりリボヌクレアーゼ活性を誘導しているようだ. 生化学的な解析結果を支持する証拠が構造生物学的解析から得られている¹²⁾. 報告された Pol II と SII の共結晶構造は実に驚くべきものである. SII の C 末端側は 100 オングストロームにも及ぶ伸展した構造をとり, それが Pol II の中心部に存在する活性部位にまで深く挿入されている.

RNA ポリメラーゼの忠実度は DNA ポリメラーゼと比べて低く, 誤った塩基の取り込み頻度は 10^{-3} ~ 10^{-5} 程度であると推定されている^{9,13)}. RNA やタンパク質レベルでの変異は DNA レベルでの変異と異なり, 恒久的な問題とはならないので, 生物学的意義がどれほどあるかは不明だが,

SII は Pol II の忠実度を高める働きもしているようだ. DNA ポリメラーゼが有する校正活性 = 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性との対比で考えれば, このことは驚くにあたらない.

(2) FACT (facilitate chromatin transcription)

FACT はクロマチン鑄型を用いた際に転写伸長を促進する因子として 1998 年, Reinberg, Orphanides らによってヒト HeLa 細胞から精製, 同定された¹⁴⁾. Spt16 と SSRP1 という二つのサブユニットからなる FACT はクロマチンリモデリング活性とヒストンシヤペロン活性を有することから, ヌクレオソームを DNA から除去することによって Pol II の通過を助け, あるいはまた転写終了後にヌクレオソームを再び DNA 上に配置する役割を果たしているのではないかと考えられている (図 5). 実際, 活発に転写されている遺伝子上でヌクレオソームの密度が低下していることが多くの例で示され, 転写と共役したヒストンの除去 (histone eviction) という概念が現在では受け入れられている. FACT はヒストンの H2A-H2B 二量体に対して特異的に作用することが生化学的な実験から示されており, ヒストン除去を担う装置の一部だと考えられる.

他方, ショウジョウバエの FACT ホモログが遺伝子プロモーターや遺伝子間領域で働いていることが示唆されたり, アフリカツメガエルの FACT ホモログが DNA 複製の促進因子として独立に同定されたりしている^{15,16)}. 従って, FACT は転写伸長だけでなく, DNA 上のその他の過程にも関与していることが十分に考えられる.

(3) Paf1C (polymerase-associated factor 1 complex)

Paf1C は 1996 年, Pol II に結合するタンパク質複合体として Jaehning, Shi らによって酵母より精製, 同定された¹⁷⁾. 酵母 Paf1C は Paf1, Ctr9, Leo1, Cdc73, Rtf1 という五種類のサブユニットからなる. その後, 酵母の遺伝学的解析から転写伸長制御への関与が示唆され, Paf1C は転写伸長因子とみなされるようになったが, 生化学的な証拠は最近まで乏しく, Paf1C はむしろヒストンの化学修飾の制御因子として知られるようになった.

いわゆるヒストンコードの解釈は, ヒストン修飾酵素の同定と修飾ヒストンの読み取り分子の同定を通じて進められてきたが, それらは進展し, 現在注目すべき段階, すなわちヒストン修飾のクロストークあるいは修飾ヒストン間のネットワークの理解へと移りつつある. クロストークの例として最も見事に証明されているのは, 酵母ヒストン H2B の Lys-123 (ヒト H2B では Lys-120 に相当) とヒストン H3 の Lys-4 および Lys-79 の関係である. H2B Lys-123 のモノユビキチン化は H3 Lys-4 および Lys-79 のメチル化に必須であることが示されている (図 6)¹⁸⁾. 一次配列上, 遠く離れたこれらの残基の修飾がこうした因果関係によって結びつけられていることの分子基盤は不明であり, 興味

深い。

もう一つ特筆すべきことは、これらのヒストン修飾が遺伝子のコード領域で、転写と共役して起こるという点である。1990年代後半にクロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) が普及し、*in vivo* のゲノム上におけるタンパク質因子の分布を解析することが可能になった。当初支配的だったアイディアは、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングはプロモーター周辺で特異的に起こり、それらは開始前複合体の形成に寄与するというものだったが、より詳しい解析の結果、いくつかのヒストン修飾が転写開始点下流のコード領域で起こっていることが明らかとなった (図6)。コード領域のヒストン修飾はどれも転写と共役して、つまり活発に転写されるタイミングに合わせて起こることから、転写の「メモリー」に関与するというモデルが提案されているが、実際の機能はほとんど未解明のままである。その中で一つ実験的に示されているのは、ヒストン H3 Lys-36 のメチル化が遺伝子内部から起こる異常な転写開始を抑制しているという点である¹⁹⁾。転写が盛んに起こると、上述したようにヌクレオソーム密度が低下するため、通常抑制されている異常な転写開始が誘発される可能性があるが、ヒストン H3 Lys-36 のメチル化はそれを抑制しているらしい。

話題がヒストン修飾自体の方にだいぶ逸れてしまったが、Paf1Cに話を戻すと、酵母の解析から、Paf1CはH2B Lys-123のモノユビキチン化やH3 Lys-4およびLys-79のメチル化に必須とまでは言えないものの、重要な役割を果たしていることが示されている (図6)^{20,21)}。Paf1CはH2B Lys-123のユビキチン化酵素をPol II転写伸長複合体上にリクルートすることによって、転写と共役したH2Bのモノユビキチン化と、それに引き続くH3のメチル化を引き起こすようだ。Paf1CがH3メチル化酵素を直接リクルートするという証拠もある。

最近、他の生物種のPaf1Cホモログも解析され始めている。筆者らは、ヒトPaf1Cが*in vitro* 転写系においてクロマチン非依存的にPol IIの転写伸長を直接活性化する能力を持っていることを最近報告している (図7)²²⁾。

(4) DSIF, NELF, P-TEFb

この三つの転写伸長因子はある共通した背景を持っているので、まずそれについて説明したい。一般に、薬剤や阻害剤といった低分子化合物は転写のような複雑な生命現象を解析するツールとして有用である。例えば、キノコ毒である α -アマニチンはよく知られた真核転写の特異的阻害剤だが、三種類のRNAポリメラーゼは α -アマニチンに対して異なる感受性を示すため、 α -アマニチンは三種類のRNAポリメラーゼを区別するのに長い間、用いられてきた。本稿で重要なDRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) は1950年代に初めて文献に記載された人

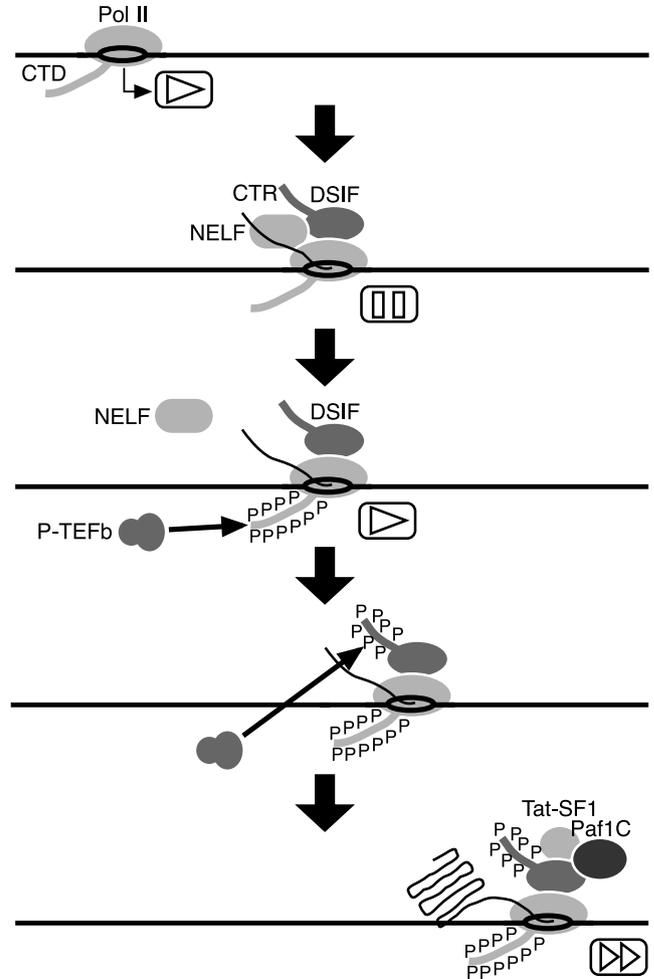


図7 プロモーター近傍での一時停止とその解除の分子メカニズム

プロモーター近傍での一時停止とその解除は主にDSIF, NELF, P-TEFbという三つの転写伸長因子によって制御される。P-TEFbはPol IIのCTDをリン酸化することで、DSIFとNELFによる転写抑制を解除する。P-TEFbはDSIFのCTRをもリン酸化し、そのリン酸化は転写伸長のさらなる活性化を引き起こす。

工のヌクレオシド類似体であり、Pol II特異的な転写阻害剤である。DRBの作用機構の解明を目指して、長年に渡って多くの研究者が取り組んできた。その結果、分かってきたのは(1)細胞をDRBで処理するとhnRNA (heterogeneous nuclear RNA) やmRNAの合成が強く阻害され、ごく短い転写産物の蓄積が誘導されること、(2)DRBによる転写阻害剤は*in vitro* 転写系で再現可能だが、高度に精製された*in vitro* 転写系ではDRBは阻害効果を発揮しないこと、などである。これらの知見から、DRBの作用標的はPol II自身ではなく、転写伸長段階の制御に関わる因子であり、細胞内のmRNA合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。Priceらのグループと半田らのグループはDRBの作用標的因子の解析を独立に進め、DRBの作用に関わる三つの新規転写伸長因子を同定した。その

結果、DRBの作用機構が最終的に明らかとなったのである。

Priceらは1997年、DRB感受性の転写伸長活性化を担う因子としてショウジョウバエKc細胞からP-TEFbを精製、同定した²³⁾。P-TEFbはCdk9とサイクリンTからなるタンパク質キナーゼ複合体である。一方、半田、和田、山口らは1998年と1999年、DRB感受性の転写に必要な因子としてヒトHeLa細胞からDSIFとNELFを精製、同定した^{24,25)}。DSIFは進化的に保存されたSpt4とSpt5という二つのサブユニットからなり、酵母Spt4-Spt5複合体の遺伝学的解析も進められている。NELFはA、B、C/D、Eという四つのサブユニットからなる。P-TEFbとNELFは、その名が示すようにそれぞれ転写伸長の促進と抑制に関わっている。一方、DSIFは後述するように正負の働きを併せ持っており、Pol IIとの安定な相互作用を介して転写伸長複合体上に種々の因子をリクルートする働きをしている。

転写を開始したPol IIは（遺伝子の種類によらず）転写伸長の初期段階で以下のような経過を辿るものと考えられる（図7）。まず転写開始後、直ちにPol IIにDSIFとNELFが結合し、転写開始点の下流25~50塩基程度のところでPol IIが一時停止する。これはプロモーター近傍での一時停止（promoter-proximal pausing）と呼ばれ、普遍的に観察される現象である。このときPol IIのCTDは、Ser-5は高リン酸化状態だが、Ser-2は低リン酸化状態である。ここでP-TEFbがCTD Ser-2をリン酸化すると、一時停止が解消されて転写伸長が再開する。リン酸化によってNELFがPol IIから解離するからである。転写阻害剤DRBはP-TEFbのキナーゼ活性の特異的阻害剤として働き、このリン酸化を阻害することによって転写伸長の初期段階で転写を阻害する。

P-TEFbはまた、DSIFのサブユニットの一つであるSpt5のC末端領域（C-terminal region, CTR）をも強くリン酸化する（図7）²⁶⁾。興味深いことに、Spt5のCTRはPol IIのCTDに類似した繰り返し構造をしており、他の相互作用因子の足場として機能している可能性が高い。つまり、転写伸長複合体上にはPol II CTD以外にSpt5 CTRというもう一つの足場が存在しているらしい。いずれにせよ、P-TEFbによるSpt5のリン酸化が、DSIFの機能をリプレッサーからアクチベーターへと変換することは確かである。最近明らかとなったところでは、リン酸化型のDSIFは他の転写伸長因子（Paf1CとTat-SF1）を転写伸長複合体上へとリクルートし、それらが協調的に転写伸長を活性化するようだ²²⁾。しかしまだ説明のつかない点も残されており、未知のCTR結合因子が重要な役割を果たしている可能性が高い。

いくつか例を挙げて説明したように、転写伸長因子はい

くつかの研究室によってバラバラに精製、同定されてきたものである。それら相互の関係などは当初ほとんど不明だったが、上述した新しい知見から、多数見つかってきている転写伸長因子が機能的に、そして物理的に協調して転写伸長を正負に制御していることが明らかとなってきている。ここで転写開始と転写伸長のメカニズムを比較してみたい。一群の基本転写因子も転写伸長因子と同様、生化学的に見つかってきたわけだが、特異的な転写開始はRNAポリメラーゼ単独では起こらず、一群の基本転写因子を厳密に必要とする。それに対し、転写伸長は基本的にRNAポリメラーゼ単独で進行しうる反応であり、転写伸長因子は調節的役割を果たしているに過ぎない。しかし実際に細胞内で起こる転写伸長の過程では、複数の転写伸長因子それぞれが（転写開始時における基本転写因子のように）重要な役割を果たしており、転写伸長因子の間には一定の役割分担が存在しているようだ。

4. 転写伸長の制御メカニズム

上述したプロモーター近傍での一時停止の誘導とその解消は、転写のデフォルト機構として普遍的な役割を果たす一方、その過程は遺伝子特異的な、あるいはシグナル依存的な制御の標的ともなっている。以下では転写伸長制御のメカニズムと、その生物学的側面について順に見ていきたい。

一時停止の誘導とその解消はおそらくほぼすべての遺伝子の転写サイクルで起こっているが、一時停止の位置や強度は遺伝子によって異なるようだ。一時停止を引き起こす主な因子は前述したようにDSIFとNELFだが、一時停止を制御する他の要因が調べられ、+1ヌクレオソーム（転写開始点下流の最初のヌクレオソーム）が一時停止の位置決めに重要な役割を果たしていることが報告されている^{27,28)}。ヌクレオソームによる転写伸長速度の低下によってDSIFとNELFがPol IIを捕まえやすくなるというアイデアはいかにも尤もらしい。しかし、ヌクレオソーム構造を持たない「裸の」DNA鋳型を用いた*in vitro*転写系でも*in vivo*で見られるのと同様なプロモーター近傍での一時停止が観察されることから、ヌクレオソームが一時停止の誘導に必須とまでは言えない。一方、一時停止が塩基配列特異的に誘導される（DNAやRNA上のシスエレメントによって制御される）という証拠は今のところ得られていない。

一時停止の強度は、主にP-TEFb活性の調節を通じて制御されているようだ。ある遺伝子上でP-TEFb活性が低ければ一時停止状態が長く続き、P-TEFb活性が高ければ一時停止は速やかに解消される。P-TEFb活性は少なくとも二通りの方法で制御されているらしい。第一に、遺伝子上へのリクルート段階での制御であり、P-TEFbの特定遺伝

子上での占有率がシグナル依存的に制御されている例がいくつか報告されている。例えば、ショウジョウバエの P-TEFb は熱ショック依存的に熱ショック遺伝子のプロモーター上へ速やかにリクルートされる（後述）。また、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）が潜伏感染した細胞において、P-TEFb は HIV タンパク質である Tat 依存的に HIV プロモーター上へとリクルートされる（後述）。P-TEFb はいくつかの転写アクチベーターとタンパク質-タンパク質間相互作用をすることが示されており、こうした相互作用を通じて標的遺伝子上にリクルートされるのかもしれない。また、ヒストンの化学修飾が P-TEFb のリクルートに関与している可能性も指摘されている。

第二に、P-TEFb の相互作用因子による活性制御である。P-TEFb の生化学的解析から、P-TEFb が細胞内で多数の因子と相互作用しており、それらとの結合・解離によって細胞内のキナーゼ活性がダイナミックに調節されていることが明らかとなっている²⁹⁾。細胞を穏やかな条件で溶解し、分子量に基づいて分画すると、P-TEFb は大複合体と小複合体に分かれる。大複合体には P-TEFb に加えて 7SK snRNA と Hexim タンパク質その他、何種類かのタンパク質が含まれており、大複合体中の P-TEFb はキナーゼとして不活性である。一方、小複合体中の P-TEFb は P-TEFb 単独か、または Brd4 と相互作用した状態にあり、キナーゼとして活性である。プロモドメインを持った Brd4 タンパク質は、アセチル化ヒストンを含む活性化されたプロモーター領域に P-TEFb をリクルートする役割を果たすといわれている³⁰⁾。大複合体と小複合体の量比は、例えば通常の培養条件下の HeLa 細胞では 50 : 50 程度だが、その量比は培養条件などによってダイナミックに変動し、とりわけ P-TEFb 活性が必要とされる条件下ではほとんどが小複合体の側にシフトする。このように、大複合体は P-TEFb の貯蔵用プールとして働いているようだ。

上述したように、一時停止の誘導とその解消はほぼすべての遺伝子の転写サイクルで起こるデフォルト機構だと考えられるが、いくつかの推計によると、実際にこのステップが転写の主要な律速段階となっているのは、全遺伝子の 30% 程度ようだ^{31,32)}。Pol II がプロモーターに結合すらしない、完全に抑制された遺伝子では一時停止も起きないので、これは驚くに当たらない。一時停止が起きるのは、むしろプロモーターが活性化され、転写開始が起こっている（そして、mRNA が多少なりとも合成されている）遺伝子である。DSIF と NELF によって誘導される Pol II の一時停止には、mRNA 合成を負に調節するという役割がある一方で、転写の活性化シグナルに応じた迅速な誘導を可能にするという側面もあることが分かっている。一時停止によって負に調節されている遺伝子は、すでにプロモーター活性化のステップを経ているので、そうでない遺

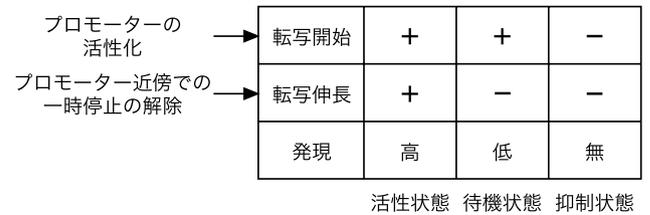


図8 転写サイクルにおける二つの律速段階

遺伝子はおおまかに次の三種類に分類できる。プロモーターが活性化されておらず（大概はクロマチンレベルで）抑制されている「抑制状態」の遺伝子、プロモーターは活性化されているが一時停止によって遺伝子発現が制限されている「待機状態」の遺伝子、一時停止も効率よく解除される「活性状態」の遺伝子。

伝子に比べて迅速な応答が可能だと理解することができる。あるいは一時停止した Pol II は、同じ領域にヌクレオソームが形成されるのを阻害するので、プロモーター近傍のクロマチンを開いた状態に保つのに直接関わっているのかもしれない。いずれにせよ、一時停止状態 (paused state) は潜在的に活性な待機状態 (poised state) であるというアイデアが一般化しつつある (図8)。

ChIP-chip や ChIP-seq といった近年の技術革新により、Pol II をはじめとする DNA 結合因子のゲノムワイドの動態を簡単に解析できるようになってきた。ヒト IMR90 細胞における Pol II の動態を GRO-seq という新しい手法で解析した Lis らのデータ³²⁾を例に挙げて説明すると、全遺伝子の約 44% が効率的な転写開始と一時停止の解消を経て、活発な転写を行っている。一方、全遺伝子の約 31% は上述した待機状態にあり、全遺伝子の約 25% は不活性な状態にある。すなわち、25% の遺伝子はヘテロクロマチン構造をとっていたり、アクチベーターが結合していないなどの理由でプロモーターが活性化されておらず、Pol II がそもそも結合できない状態にある。31% の遺伝子ではプロモーターの活性化と Pol II のリクルートまでは起こるが、プロモーター近傍での一時停止がボトルネックとなっている。44% の遺伝子では一時停止の解消までが効率よく進むようだ。このように、転写サイクルの中で少なくともプロモーターの活性化と一時停止の解除という二つのステップが、発現制御の上で重要な役割を果たしているようだ (図8)。転写の活性化がプロモーターやエンハンサーに結合するアクチベーターなどの転写装置を中心にして行われるという従来からのアイデアは揺るがないが、その活性化シグナルの受け手側が開始前複合体の形成だけでないことが明らかになってきている。

5. 転写伸長制御の生物学的意義

転写伸長段階の制御が個別の遺伝子発現や生物学的過程に果たす役割について、詳しく明らかになっている例がいくつかあるので、それらをかいつまんで紹介したい。

(1) 前初期遺伝子の発現制御

転写伸長の制御は様々な細胞外刺激に対する迅速な応答、いわゆる前初期応答に重要な役割を果たしている。例えば生体が高温に曝されると、分子シャペロンであるHsp70などをコードする熱ショック遺伝子群が速やかに誘導発現し、熱による障害を回避するように働くが、この熱ショック誘導は転写の伸長段階で制御されている^{33,34)}。つまり非誘導時には、熱ショック遺伝子の発現はDSIFとNELFによる一時停止によって抑制されている。熱ショックを受けるとP-TEFbやその他の正の転写伸長因子が熱ショック遺伝子上に速やかにリクルートされ、一時停止が解消される。類似の制御は他にも、増殖因子に応答した増殖関連遺伝子の誘導や、性ホルモンに応答した標的遺伝子の誘導などで見られる^{26,35)}。

(2) ウイルス増殖における役割

転写伸長の制御はHIVの生活環に重要な役割を果たしている。HIVはAIDSの原因となるレトロウイルスで、そのRNAゲノムは感染後、DNAに逆転写されて宿主細胞のゲノムに組み込まれる。プロウイルスゲノムDNAの末端はPol II転写のプロモーターとして働くが、潜伏感染時には転写伸長が抑制されており、短いRNAしか合成されない。しかし転写量がある閾値を超えてウイルスタンパク質の一つであるTatが合成されると、ウイルス感染は一転して再活性化のモードに移行する。TatはHIVプロモーター特異的に転写伸長を活性化し、全長のウイルスRNA(mRNAとしてもゲノムRNAとしても働く)の合成を誘導することにより、子孫ウイルス粒子の形成を可能にする³⁶⁾。HIVプロモーター近傍の新生RNAはTARと呼ばれるステムループ型のRNAエレメントをコードしており、RNA結合タンパク質であるTatはそこに結合する。そしてP-TEFbやその他の正の転写伸長因子をリクルートすることによって、HIVの転写伸長を特異的に活性化するのである。

伸長制御はD型肝炎ウイルス(HDV)の増殖にも関与している。このウイルスは罹患率こそ低いだが、B型肝炎ウイルスと共感染して重篤な肝疾患を引き起こすことが知られている。HDVを分子生物学的な側面で捉えたとき、非常に興味深い点の一つがある。それは、そのRNAゲノムの複製・転写(RNA依存性RNA合成)を宿主細胞のPol II(DNA依存性RNAポリメラーゼ)が担うという事実であり、Pol IIはどのようなわけか本来の基質でないRNAを鋳型とした転写を行い、結果的にHDVの複製を手助けしている。筆者らはこの過程にHDAg(hepatitis delta antigen, D型肝炎抗原)というウイルスタンパク質が中心的な役割を果たすことを見出している³⁷⁾。HDAgはPol IIに結合し、典型的な転写伸長因子として働いて、本来の基質でないウイルスRNAを鋳型とした転写伸長を促進しているようだ。

(3) 発生・分化過程における役割

転写伸長因子は発生や分化の過程でも重要な役割を果たしている。DSIFのサブユニットの一つであるSpt5は進化的に保存された1,000アミノ酸以上の大きなタンパク質である。Spt5の出芽酵母での欠失は致死となり、またヒトHeLa細胞でのノックダウンも致死となることから、Spt5が必須遺伝子にコードされているのは明らかだが、Spt5のいくつかの点突然変異体が特異的な発生・分化異常を示すことが示されている。例えば、ゼブラフィッシュSpt5のVal-1,012がAspに置換した*foggy*変異体は、中枢神経系のニューロンの特異的な分化異常(例えば視床下部でドーパミン作動性ニューロンが著しく減少する一方でセロトニン作動性ニューロンが増加するなど)を呈する³⁸⁾。また、ショウジョウバエSpt5のGly-1,002がAspに置換した*W049*変異体は、体節形成に異常を示す³⁹⁾。このようにSpt5変異体がアリル特異的な表現型を示すことの説明として、DSIFがモジュール状の機能・構造を持ち、特定の機能・構造(もしかしたら単一の転写因子との相互作用)の欠損が上述したような表現型を引き起こした、と解釈することが可能である。これらの遺伝型-表現型相関の分子基盤はいまだ不明であり、今後の解析が待たれるところである。

(4) mRNA合成のチェックポイントとしての機能

紙面の都合上、本稿では詳しく立ち入らないが、DSIFとNELFによるPol IIの一時停止は、mRNA合成のチェックポイントとしても機能しているかもしれない。プロモーター近傍での一時停止が起こる場所(転写開始点の下流25~50塩基程度)は、mRNA 5'末端のキャッピングが転写と共役して起こる場所とオーバーラップしているため、一時停止がキャッピングのための時間的猶予を与えているのではないか、あるいはキャッピングが適切に起こるまで一時停止が解消されないような仕組みが存在するのではないか、とのアイデアが提出されている⁴⁰⁾。しかし、それらについて実験的に確たる証拠はいまだ得られていない。一方、少数の遺伝子上では例外的にDSIFとNELFが遺伝子の3'末端領域に結合し、それらの3'プロセシングに関与することが示されており、DSIFとNELFによって誘導される一時停止が3'プロセシングのチェックポイントとして機能していることが示唆されている⁴¹⁾。

6. ま と め

本稿では、転写伸長に関与する因子や反応制御機構論から、クロマチン制御との関連、RNAプロセシングとの共役、そして*in vivo*での役割に至るまで、転写伸長分野における各注目ポイントを努めて幅広く紹介した。これらのポイントはどれも活発に探求され、新しい成果が次々と産み出されており、生化学の教科書に記載されているレベル

の10年以上前の知見に基づく理解と、最新の知見に基づく現状認識との間には大きなギャップがある。本稿が当該研究分野の現状把握に少しでもお役に立てば幸いである。

文 献

- 1) Phatnani, H.P. & Greenleaf, A.L. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 2922–2936.
- 2) Nonet, M., Sweetser, D., & Young, R.A. (1987) *Cell*, **50**, 909–915.
- 3) Li, Y. & Kornberg, R.D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2362–2366.
- 4) Proudfoot, N.J., Furger, A., & Dye, M.J. (2002) *Cell*, **108**, 501–512.
- 5) Buratowski, S. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 679–680.
- 6) Egloff, S. & Murphy, S. (2008) *Trends Genet.*, **24**, 280–288.
- 7) Baillat, D., Hakimi, M.A., Naar, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005) *Cell*, **123**, 265–276.
- 8) Saunders, A., Core, L.J., & Lis, J.T. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 557–567.
- 9) Uptain, S.M., Kane, C.M., & Chamberlin, M.J. (1997) *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 117–172.
- 10) Fish, R.N. & Kane, C.M. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 287–307.
- 11) Sekimizu, K., Kobayashi, N., Mizuno, D., & Natori, S. (1976) *Biochemistry*, **15**, 5064–5070.
- 12) Kettenberger, H., Armache, K.J., & Cramer, P. (2003) *Cell*, **114**, 347–357.
- 13) Thomas, M.J., Platas, A.A., & Hawley, D.K. (1998) *Cell*, **93**, 627–637.
- 14) Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., & Reinberg, D. (1998) *Cell*, **92**, 105–116.
- 15) Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y., Dohmae, N., Seyama, Y., Shibata, T., & Murofushi, H. (1999) *Curr. Biol.*, **9**, 341–350.
- 16) Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Handa, H., & Hirose, S. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1605–1616.
- 17) Shi, X., Finkelstein, A., Wolf, A.J., Wade, P.A., Burton, Z.F., & Jaehning, J.A. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 669–676.
- 18) Latham, J.A. & Dent, S.Y. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 1017–1024.
- 19) Carrozza, M.J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K.K., Shia, W.J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M.P., & Workman, J.L. (2005) *Cell*, **123**, 581–592.
- 20) Krogan, N.J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M.A., Dean, K., Ryan, O.W., Golshani, A., Johnston, M., Greenblatt, J.F., & Shilatifard, A. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 721–729.
- 21) Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A., & Struhl, K. (2003) *Mol. Cell*, **11**, 709–719.
- 22) Chen, Y., Yamaguchi, Y., Tsugeno, Y., Yamamoto, J., Yamada, T., Nakamura, M., Hisatake, K., & Handa, H. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 2765–2777.
- 23) Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B., & Price, D.H. (1997) *Genes Dev.*, **11**, 2622–2632.
- 24) Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., & Handa, H. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 343–356.
- 25) Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., & Handa, H. (1999) *Cell*, **97**, 41–51.
- 26) Yamada, T., Yamaguchi, Y., Inukai, N., Kamijo, S., Mura, T., & Handa, H. (2006) *Mol. Cell*, **21**, 227–237.
- 27) Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., Gilmour, D.S., Albert, I., & Pugh, B.F. (2008) *Nature*, **453**, 358–362.
- 28) Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., & Zhao, K. (2008) *Cell*, **132**, 887–898.
- 29) Peterlin, B.M. & Price, D.H. (2006) *Mol. Cell*, **23**, 297–305.
- 30) Hargreaves, D.C., Horng, T., & Medzhitov, R. (2009) *Cell*, **138**, 129–145.
- 31) Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J. S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., & Adelman, K. (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 1507–1511.
- 32) Core, L.J., Waterfall, J.J., & Lis, J.T. (2008) *Science*, **322**, 1845–1848.
- 33) Andrulis, E.D., Guzman, E., Doring, P., Werner, J., & Lis, J.T. (2000) *Genes Dev.*, **14**, 2635–2649.
- 34) Wu, C.-H., Yamaguchi, Y., Benjamin, L.R., Horvat-Gordon, M., Washinski, J., Enerly, E., Larsson, J., Lambertsson, A., Handa, H., & Gilmour, D.S. (2003) *Genes Dev.*, **17**, 1402–1414.
- 35) 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., & Li, R. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 2134–2146.
- 36) Zhou, Q. & Yik, J.H. (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 646–659.
- 37) Yamaguchi, Y., Filipovska, J., Yano, K., Furuya, A., Inukai, N., Narita, T., Wada, T., Sugimoto, S., Konarska, M.M., & Handa, H. (2001) *Science*, **293**, 124–127.
- 38) Guo, S., Yamaguchi, Y., Schilbach, S., Wada, T., Lee, J., Goddard, A., French, D., Handa, H., & Rosenthal, A. (2000) *Nature*, **408**, 366–369.
- 39) Jennings, B.H., Shah, S., Yamaguchi, Y., Seki, M., Phillips, R. G., Handa, H., & Ish-Horowicz, D. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 1680–1684.
- 40) Wen, Y. & Shatkin, A.J. (1999) *Genes Dev.*, **13**, 1774–1779.
- 41) Narita, T., Yung, T.M.C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2007) *Mol. Cell*, **26**, 349–365.