ヒトメディエーターサブユニットhMed18の転写抑制機構の解明

○熊藤　将之、梅村　啓靖、古元　義、深澤　力也、大熊　芳明

（富山大学大学院医学薬学研究部・遺伝情報制御学）

【背景･目的】メディエーター複合体（メディエーター）は、真核生物に広く保存されている20個以上のタンパク質の巨大複合体である。このメディエーターはHead, Middle, Tail, CDK/cyclinの４つのモジュールからなる。このうちHeadモジュールは、RNAポリメラーゼII(Pol II)と直接相互作用するため、転写に密接に関わるサブユニットであると考えられている。Headモジュールのサブユニットのうち、MED18はまず最初に酵母のPol IIのCTD欠失変異の抑制遺伝子産物のSrb5として発見された。本研究室では10年前にこのアミノ酸配列を基にヒトで検索を行うことで、ヒトオルソログを同定した(hMED18)。私は、異なる生物間でこのタンパクが保存されていることから、MED18が生物のなかで重要な役割を果たしていると考え、解析を進めている。

【方法】HeLa細胞を用いてsiRNAによりhMED18の発現をノックダウンした後、(1)ルシフェラーゼassay、マイクロアレイ解析でhMED18の転写制御について調べ、(2)マイクロアレイで同定されたhMED18標的候補遺伝子について、qRT-PCR、ChIP assayで解析した。

【結果･考察】(1)siRNAでhMED18をノックダウン(以下KD-hMED18)させた結果、VP16依存的な転写が増大した。またマイクロアレイ解析により、ネガティブコントロール(NC)よりもKD-hMED18では多くの遺伝子の転写が増幅していることが判明した。これらからhMED18は転写を主に負に制御することが示唆された。この機構を解析するため、まずヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)とSirtuinの阻害剤、TSAとNicotinamideで処理をしたが、hMED18による転写の阻害活性は影響を受けなかった。(2)複数遺伝子をピックアップし、コントロールとhMED18でのmRNAの発現量変化をqRT-PCRで解析した結果、hMED18のノックダウンによりmRNA発現量が増加する遺伝子が見つかった。さらにそれらの遺伝子上でのhMED18の存在を確認する為にChIP assayを行ったところ、hMED18やその他のサブユニットがそれらの遺伝子上に存在することが判明した。この結果、まず(1)ではhMED18の転写抑制機能が明らかになった。しかし、それはヒストン脱アセチル化によるものではなかった。次に(2)のqRT-PCRの結果は、(1)での実験結果を補佐するものであると考えられる。さらに、ChIP assayの結果により、hMED18がただ遺伝子の転写を負に制御するのみならず、特定の遺伝子においてその遺伝子との相互作用に直接関連する可能性が示唆されたので、ここに紹介し、議論したい。