



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 酵母TBPmutantsによるVP16依存性転写活性化反応の解析                                                                                                                |
| Author(s)    | 橋本, 茂                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39023">https://hdl.handle.net/11094/39023</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 橋 本 茂                                                         |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                     |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 7 7 8 号                                                 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 7 年 3 月 23 日                                               |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科病理系専攻                                |
| 学 位 論 文 名     | 酵母 TBP mutants による VP16依存性転写活性化反応の解析                          |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 岸 本 忠 三<br><br>(副査)<br>教 授 谷 口 直 之    教 授 辻 本 賀 英 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

外部刺激によって発現誘導される遺伝子は、刺激なしではクロマチン構造中に埋もれている。これが刺激によってヒストンなどのクロマチンを形作っている因子がほどこけ、プロモーター及びエンハンサー領域が、転写調節されやすい状態になる。プロモーター領域では、初めに TFIID (TBP=TATA-box Binding Protein とその associated molecules との複合体) が結合し、TFIIA, TFIIB, RNA ポリメラーゼII, TFIIF, TFIIIE, TFIIF の順に基本転写因子群が集まって転写開始複合体 (プロモーター複合体) をつくり転写開始反応の準備を完了する。エンハンサー領域には、遺伝子特異的転写調節因子が結合し、転写開始複合体に働きかけることで転写開始反応が活性化される。virus 由来の転写調節因子 VP16は転写活性化において、その酸性に富んだドメインと TBP, TFIIB などとの直接的相互作用が必要であることが報告されている。我々はこの VP16による転写開始反応に働く分子間相互作用がどのようなメカニズムで進むのかを in vitro のシステムで酵母 TBP の mutants を用いて検討した。

#### 【方法ならびに結果】

1. in vitro での VP16依存性転写活性化の解析: レポーター遺伝子として 6 x GAL 4 結合部位を含む CYC 1 遺伝子のプロモーター領域を G-less カセットに導入したものを用いた。酵母 TBP mutants 遺伝子は合成オリゴヌクレオチドを利用した人工変異導入法により TBP の種間でよく保存されている C 末側の領域の全てのロイシン及びリジンについてロイシンからリジン、リジンからロイシンへの mutant を作った。熱処理した酵母細胞の核抽出液 (内在する TBP を不活性化するため) にレポーター遺伝子と大腸菌で発現・精製した GAL 4-VP16融合タンパクと TBP mutant とを加え転写産物の量を比較することにより転写活性を調べた。

31種類の mutants の中で、基本転写及び GAL 4-VP16依存性転写活性をともに持つのが 17種類、持たないものが 11種類、そして前者の活性は持つが、後者は wild type に比べ著しく弱いものが 3種類、L114K, L189K, K211L であった。

2. TBP と VP16との相互作用の解析: in vitro で転写・翻訳して<sup>35</sup>S-メチオニンラベルした TBP mutants に精製した protein A-VP16融合タンパクを加え incubate した後、IgG セファロース・ビーズで共沈降してくる TBP mutants の量を調べた。

mutant L114K は VP16との結合能が wild type に比べ著しく低下している。一方、L189K と K211L は、wild type

とほぼ同程度の結合能がある。

3. TBP-TFIIA-TFIIIB 複合体形成能の解析: TATA ボックスを含む adenovirus major late promoter をプローブとして用い、大腸菌で発現・精製した酵母 TFIIA, TFIIIB, TBP mutant を加え電気泳動での移動度の違いにより DNA 結合能及び複合体形成能を調べた。

VP16 との結合能を持たない mutant L114K は, TBP-TFIIA, TBP-TFIIIB, TBP-TFIIA-TFIIIB いずれのプロモーター複合体も wild type と同様に形成する。一方, L189K は, TBP-TFIIA 複合体は wild type と同様に形成するが, TBP-TFIIIB 複合体は形成しない。また, TBP-TFIIA-TFIIIB 複合体は形成するが結合は弱い。K211L は, いずれの複合体も形成する能力を持たない。

4. in vitro 複合体形成 (VP16-TBP-TFIIIB-DNA) 及び転写活性能の解析: TATA-box を含む CYCI プロモーターをアガロースビーズに固定し、精製した TBP と TFIIIB とを GAL 4-VP16 存在あるいは非存在下で incubate し、イムノブロット法により TBP と TFIIIB とがプロモーター複合体にふくまれているか否かを調べるとともに、この抽出液に TBP と TFIIIB を除いた酵母核抽出液を混ぜ合わせ、in vitro 転写法により転写活性化能を調べた。GAL 4-VP16 非存在下では, wild type, mutant L114K, L189K とともに複合体に含まれる TBP 及び TFIIIB は同程度で、いずれも基本転写能を持っている。GAL 4-VP16 存在下では、複合体に含まれる TFIIIB の量が wild type において著しく増加し、転写活性も高い。しかし、mutant L114K, L189K とともに TFIIIB の複合体での含量及び転写活性は低い。K211L は、TBP-TFIIIB 複合体形成能及び転写活性化能ともに持たない。

#### 【総括】

1. VP16 依存性転写活性化能: TBP は、それ自身あるいは直接的・間接的に相互作用している因子を通して、VP16 に依存した転写活性化のシグナルを転写開始複合体に伝達しているものと考えられる。

2. VP16 と TBP との相互作用と転写活性化: L114K の結果から、TBP と VP16 との直接的相互作用が、TFIIIB の転写開始複合体への移行を促進（または、安定化）することによって転写を活性化していることが示唆される。

3. TBP と TFIIIB との相互作用と転写活性化: L189K の結果から、TBP-TFIIIB-DNA 複合体は、基本転写に必要な分子間相互作用とは異なるコンホメーションを VP16 によって誘導され、転写開始複合体への TFIIIB の移行が促進されるものと思われる。

4. 未知の分子との相互作用と転写活性化: K211L の結果から、TFIIIB, VP16 以外に転写活性化に必要な、TBP と相互作用する分子が存在することが強く示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

RNA ポリメラーゼによる転写開始反応は、開始点付近のプロモーター領域と、その点から離れたエンハンサー領域とに各々結合する因子群の相互作用で調節されている。本研究は、virus 由来の転写調節因子 VP16 による転写活性化を例に酵母の in vitro のシステムで基本転写因子 TBP の mutants を用いて転写活性化に必要な因子間相互作用を検討したものである。本研究から、転写活性化の最初のステップでは、転写調節因子 VP16 が基本転写因子 TBP と直接結合し、続いて TBP と TFIIIB との間の相互作用の質的変化が誘導され転写が活性化されるという知見が得られた。この知見は、転写開始反応に必要な分子間相互作用の本質的理解に迫るものである。よって、本研究は、学位論文に値するものと認められる。