The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II
Author(s)	渡邉, 祥規
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41746
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	渡邉祥規（わたなべ よしのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15237　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II （TFIIH関連キナーゼの複合体形成による活性の変化とそのRNAポリメラーゼII C末端領域のリン酸化との関係）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　審良　静男　　教　授　近藤　寿人

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

真核生物のRNAポリメラーゼII（Pol II）は、遺伝子発現の初発段階にmRNA合成の核として働き、5種類の基本転写因子（TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH）とともに遺伝子プロモーター上において転写開始複合体を形成して、正確な転写を開始する。基本転写因子TFIIHは、Pol IIによる転写開始と伸長への移行という2つの段階で機能することが知られている。TFIIHは9つのサブユニットからなるタンパク質複合体であり、そのうち大きい2つのサブユニットXPBとXPDが、紫外線などによるDNAの損傷を修復するヌクレオチド除去修復に直接関与することが見い出され、一方Cdk 7、サイクリンH（CycH）、MAT 1の3つのサブユニットは、細胞周期の制御に関わるCdkをリン酸化するCAK（Cdk-activating kinase）活性を有することがわかっている。転写やDNA修復や細胞周期といった事象には、TFIIHの有するDNAヘリカーゼ活性、DNA依存性ATPase活性、セリンやスレオニンをリン酸化するキナーゼ活性という3種の酵素活性が利用されており、TFIIHは、これらの生体内事象を協調的に制御する重要な因子として認識されてきた。しかしながら、TFIIHが関わるこの協調的制御機構の詳細はほとんど解明されていない。本研究は、TFIIHとCdk 7／CycHとCAKという3種のキナーゼ複合体の分離精製をおこない、転写や細胞周期に関わる因子を基質としたリン酸化の特異性を決定し、さらにリン酸化活性と転写活性が協調した反応機構の解明を目的とした。

【方法ならびに成績】

(1)　TFIIHとCAKによる細胞周期を制御するCdkへの基質特異性

CAKはその名のとおりCdc 2、Cdk 2、Cdk 4といった細胞周期を制御するCdkをリン酸化し活性化する機能を有している。本研究ではG 1サイクリンと共役するCdk 2とCdk 4を基質とし、Cdk 7／CycH、CAK、TFIIHによるリン酸化の特異性について検討した。各基質のリン酸化はSDS−PAGE後、オートラジオグラフィーにより検出した。その結果、CAKとTFIIHはCdk 2とGST−Cdk 4をリン酸化することができたが、Cdk 7／CycHは、Cdk 2に対しては弱く、GST−Cdk 4に対しては全くリン酸化することができなかった。さらに、TFIIHはCAKのキナーゼ活性よりもGST−Cdk 4を強くリン酸化し、一方でCAKはTFIIHに比べ、Cdk 2を強くリン酸化することが認められた。基本転写因子TFIIEは、TFIIHのキナーゼ活性を促進する因子として知られているが、GST−Cdk 4のリン酸化にはほとんど効果がなかった。一方、Cdk 2のリン酸化は、TFIIEにより2倍程度促進されることが

確認できた。CAKのみならずTFIIHの形でもCdk 2やCdk 4をリン酸化できることは、基本転写因子TFIIHが直接的に細胞周期を制御している可能性を示唆している。

(2) TFIIHとCAKによるPol IIのC末端ドメインのリン酸化

ヒトのPol IIの最大サブユニットRPB 1のC末端には、7個のアミノ酸（YSPTSPS）が52回に及ぶ繰り返し領域CTD（C-terminal domain）が存在し、この領域は真核細胞の生存に必須であり、TFIIHによりリン酸化されることが知られている。本研究では、CTDとGSTを融合したGST−CTDポリペプチド、およびHeLa細胞から精製した野生型Pol IIを基質としてリン酸化の特異性を検討した。CAKとTFIIHはGST−CTD、Pol IIを良い基質とし、共にリン酸化することができた。さらに、TFIIEを加えた場合、GST−CTDのリン酸化には効果がなかったが、Pol IIへのリン酸化活性を強く促進していた。

(3) TFIIHとCAKによる転写開始複合体中でのPol IIのリン酸化と転写活性の相関

転写開始複合体中でのPol IIのリン酸化を検討するために、アデノウイルス主要後期プロモーターを持つG−lessカセットを鋳型DNAとする*in vitro*転写再構成系を用いた。この系でPol IIは、TFIIHのキナーゼによりリン酸化され、その活性は、TFIIEにより強く促進されていた。一方、Cdk 7／CycHとCAKは、転写開始複合体中でのPol IIをリン酸化できないことを認めた。さらに、転写活性を検討したところ、直鎖状の鋳型DNAを用いたときに、TFIIH依存的な転写がTFIIE存在下でおこなわれ、Cdk 7／CycHとCAKでは転写活性が認められなかった。しかしながら、DNAヘリカーゼがなくても2本鎖DNAが開裂することで知られているスーパーコイル状の鋳型DNAを用いると、TFIIHが存在しなくても転写がおこなわれることが認められた。これは、転写とPol IIのリン酸化との強い関連性を支持するものである。

(4) TFIIHによるPol IIのリン酸化部位の同定

TFIIHはCTDペプチドの7アミノ酸のうち、5番目のセリンをリン酸化するという報告があるが、精製Pol IIを用いた解析はおこなわれていない。そこで、CTDのリン酸化された2番目と5番目のセリンをそれぞれ認識する抗リン酸化CTD抗体を用いて、TFIIHによるPol IIのリン酸化部位をウエスタンブロッティングにより検出した。その結果CAKが2番目のセリンをリン酸化したのに対し、TFIIHは2番目のセリンだけでなく5番目のセリンをリン酸化することが確認できた。さらに5番目のセリンのリン酸化活性は、活性化転写開始複合体中でTFIIEにより強く促進され、このリン酸化がPol IIの転写反応に対応していることが認められた。最近CTDの5番目のセリンがリン酸化されているときにのみ、転写産物のプロセシングに働く因子群が、このPol IIのCTDに結合して機能することが報告された。CTDは数あるRNAポリメラーゼの中でもPol IIにのみ存在する重要な制御領域である。今回私が得た結果は、TFIIEとTFIIHが協調的に作用することが、転写に続く過程においても重要であることを示唆している。

【総括】

本研究は、基本転写因子TFIIHとCAKが、細胞周期を制御するCdkと、転写に働くPol IIの最大サブユニットに対してリン酸化の特異性が異なることを示した。さらに、転写開始複合体中では、TFIIEにより制御されたTFIIHが、Pol IIの最大サブユニットを強くリン酸化し、このリン酸化が転写活性に対応していたことから、TFIIH依存的な転写には、TFIIHの9個のすべてのサブユニットが必要であることを認めた。また、Pol IIの最大サブユニットのC末端領域にある繰り返し配列は、2番目のセリンだけでなく、TFIIEにより促進される5番目のセリンのリン酸化がTFIIHによりなされ、この部位のリン酸化が転写に必要であることを明らかにした。これらの結果は、転写と細胞周期を繋ぐルートを解明するための指針となり、TFIIHの活性制御がその鍵となることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

基本転写因子TFIIHは転写とDNA修復に働く、9つのサブユニットから構成されるタンパク質複合体で、サブユニットの中のXPBおよびXPDはヘリカーゼ活性をもち、その変異は色素性乾皮性（XP）やコケイン症候群などの遺伝病の原因となることが知られている。本研究は、TFIIHとその構成成分であるCAK（Cdk-activating kinase）

が、細胞周期を制御するCdkと、転写に働くRNAポリメラーゼIIに対してリン酸化の特異性が異なることを体系的に解析したものである。その結果、TFIIHはCdk 4を、またCAKはCdk 2をより強くリン酸化すること、転写開始複合体中では、基本転写因子TFIIEにより制御されたTFIIHのみが、RNAポリメラーゼIIの最大サブユニットを強くリン酸化するという事実を明らかにした。

これまで、RNAポリメラーゼIIの活性化に必要なリン酸化部位の同定は、人工的に作成されたポリペプチドを基質に用いたものが多かった。しかしながら、本研究では、細胞内から精製したRNAポリメラーゼIIを基質とし、さらに9つのサブユニットからなる精製TFIIHを酵素として用いた結果、TFIIHがRNAポリメラーゼIIの最大サブユニットのC末端領域にある7つのアミノ酸からなる繰り返し配列中の2番目と5番目のセリンをリン酸化し、この部位のリン酸化が転写に必要であることをはじめて明らかにした点で高く評価できる。

以上のように、本研究は遺伝子の発現に関わる転写機構全般に関する理解に貢献するとともに、転写と細胞周期という2つの生体内事象を繋ぐルートを解明するためにも重要な知見を示したことから、学位の授与に値すると考えられる。