

Title	RNAポリメラーゼIIの転写における分裂酵母TFIIEの機能解析
Author(s)	林, 和洋
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44791
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	はやし 林	かず 和	ひろ 洋
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)		
学位記番号	第 18632 号		
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻		
学位論文名	RNA ポリメラーゼ II の転写における分裂酵母 TFIIE の機能解析		
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄		
	(副査) 教授 前田 正知 教授 西原 力 教授 山口 明人		

論文内容の要旨

生物の様々な生命現象は、遺伝子発現により生成されたタンパク質が機能することにより引き起こされる。遺伝子発現の最初で最も重要な過程は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写である。Pol II が転写を効率よく開始させるためには、まず 5 種類の基本転写因子 (TFIIB、-D、-E、-F、-H) の助けで転写開始複合体が形成されることが重要で、続いて転写伸長段階へと移行する。この過程で基本転写因子 TFIIE は酵素活性を有する TFIIF と協調して転写開始複合体形成の後期から転写伸長への移行に関わる。当研究室では、ヒト TFIIE の試験管内における解析を進め、ある程度の構造と機能の情報を得ることが出来た。ところが、転写開始と伸長への移行の際にいかに TFIIE と TFIIF が機能して Pol II の機能と構造変換と呼応しているかという分子メカニズムは、試験管内の生化学的解析のみでの解明は不可能である。また生命活動においてどのような機能を果たすかについても明らかになっていない。分裂酵母は、転写制御機構や細胞周期といった基本的な生命現象がヒトに近く、また生化学的、遺伝学的に解析が容易である等の利点がある。そこで本研究において私は、TFIIE の新たな機能の解明を目的として分裂酵母を用いて遺伝学的、生化学的な解析を進めた。

TFIIE の 2 つのサブユニット α 、 β の分裂酵母ホモログの cDNA を単離し、推測されるアミノ酸配列をヒトと比較したところ、アフリカツメガエル、ショウジョウバエ、線虫に比べて相同性は低く、出芽酵母と同程度であった。しかしながら、機能ドメインごとでは比較的保存度が高いことが分かった。次に、分裂酵母 TFIIE の生化学的な解析を進めるため、 α 、 β 各サブユニットの N 末端にヒスチジンタグが付加した組換えタンパク質を大腸菌内にて発現、精製した。 α サブユニットは可溶性が低く安定性が悪いため、両サブユニットの共発現系により複合体として精製したところ、可溶性良く精製できた。このことから α サブユニットは β サブユニットと複合体を形成することで安定な状態を保っていると推測される。また、内在性の TFIIE について、分裂酵母の全細胞抽出液から各サブユニットの抗血清を用いたウエスタンブロット法によりその発現を確認した。さらに、サブユニット間の結合様式を Far Western Blot 法で調べたところ、 α - β 間、 β - β 間は結合し、 α - α 間の結合は見られなかった。ヒトの結果も考えあわせると、TFIIE は $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ 4 量体を形成し、ホモ 2 量体を形成した β サブユニットに α サブユニットが各々 1 分子ずつ結合した構造をとっていると考えられる。

RNA ポリメラーゼ II は 12 個のサブユニット (RPB1~12) からなる巨大な複合体である。特に、大きい 2 つのサブユニット RPB1 と RPB2 からなる Pol II 内の二本鎖 DNA を挟み込むクランプ構造が、転写開始前には転写複合体

を形成してプロモーター領域に結合しやすいように開いており、転写開始後には DNA を安定に保持して転写を行うために閉じていることが明らかにされている。これまでにヒトの TFIIE および Pol II の解析から β サブユニットが、野生型 Pol II と結合することを我々は明らかにしている。ところが、Pol II のどのサブユニットと結合して Pol II の機能制御を行っているのか分かっていない。そこで、FLAG タグのついた Pol II 複合体 (f-Pol II) を分裂酵母より精製し、GST 融合 TFIIE サブユニットと GST pull-down アッセイにより相互作用を確認した。その結果、分裂酵母においても f-Pol II とは β サブユニットのみが相互作用することが分かった。次に、Pol II のどのサブユニットと結合しているかを調べた。TFIIE は、転写開始点付近に位置する Pol II の活性中心近傍に結合することが出芽酵母を用いて電子顕微鏡で観察されている。そこで大きい 2 つの Rpb1 と Rpb2 を除く、Rpb3~12 の 10 サブユニットとの GST 融合タンパク質を用いて、TFIIE サブユニットとの間で GST pull-down アッセイを行ったところ、TFIIE β サブユニットは Rpb12 との相互作用が見られた。一方、TFIIE α も Rpb5 と結合することが明らかとなった。さらに、大きいサブユニット Rpb1、2 に対しても相互作用の解析を行った。方法として、 β サブユニットを [³⁵S]-メチオニンを用いて標識した後に精製し、f-Pol II を電気泳動して Rpb1 と 2 に対し Far Western Blot 法で相互作用の確認を行った。その結果、Rpb2 と有意な相互作用がみられた。また、Rpb1 ともかなり弱く結合していた。ヒトの解析において β サブユニットは、その C 末側で Pol II や他の基本転写因子との相互作用に関与していることが分かっている。以上の結果から、転写開始複合体は転写開始前から転写開始、さらに伸長へ移行するに伴って構造変化を起こすが、それに伴って TFIIE も Pol II との結合様式を変化させているのかもしれない。出芽酵母の Pol II の結晶構造から Rpb1、2 および 5 は活性中心に位置することが明らかにされている。これらの結果を総合して、私は、TFIIE が β サブユニットで Rpb2 と結合して、自身が結合したプロモーター-DNA の転写開始点近傍の 1 本鎖への予定開裂領域に Pol II を誘導し、Pol II のクランプ領域を調節する Rpb5 に α サブユニットと結合することで Pol II の活性化に伴うクランプの DNA を抱え込む構造変化を引き起こすのではないかというモデルを考えている。

分裂酵母における TFIIE の生理的必要性は、四分子解析により確認した。 α 、 β 両サブユニットの ORF の内部領域を *ura4* 遺伝子で置き換えた DNA 断片を用いて相同組み換えにより遺伝子破壊を行い、各サブユニットのヘテロ破壊株を作成した。これより α 、 β サブユニットはいずれも生育に必須な遺伝子であることが分かった。次に、ヒト TFIIE において解明された結果をもとに、 β サブユニット C 末側の点変異体を細胞内で発現させて非制限温度下での表現型を調べた。ヒト TFIIE β 変異体の解析から、基本転写活性の低下が見られた変異に相当する変異を分裂酵母 TFIIE β に導入した。その結果、転写活性と良く呼応して、20°C で生育が遅くなる低温感受性が見られるという興味深い結果が得られた。今後さらに解析を進めて、TFIIE における転写活性と生理機能の関連を明らかにできると期待される。

論文審査の結果の要旨

生物が様々な機能を果たすためには、まずそれに働く遺伝子が転写され、それがタンパク質として翻訳されることが必要である。転写には RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が主要な役割を果たすが、それを助けて転写開始複合体を形成するのが基本転写因子である。その中で、TFIIE は酵素活性を有する TFIIF と協調して転写開始複合体形成の後期から転写伸長への移行に関わっている。しかし TFIIE がどのようにして Pol II の機能や構造変換に働いているか、その詳細は明らかでない。そこで著者は TFIIE の詳細な機能解明を目的として、遺伝学的な解析に有利な分裂酵母を用いて主として Pol II との相互作用を中心に研究を行い、以下のような結果を得た。

まず TFIIE の分裂酵母ホモログの cDNA を単離し、大腸菌内にて発現・精製した。TFIIE は α および β の二つのサブユニットからなるが、Far Western Blot 法により、ホモ二量体を形成した β サブユニットに α サブユニットが各々 1 分子ずつ結合したヘテロ四量体をとっていることが示唆された。次に TFIIE と Pol II を構成する 12 個のサブユニットとの結合を調べた。TFIIE の β サブユニットは Rpb2 および Rpb12 と結合した。一方、 α サブユニットのほうは Rpb5 と相互作用した。更に TFIIE の β サブユニットと α サブユニットとの結合に必要なと考えられている塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス領域で特定のトリプトファンをアラニンに置換した変異体や、 β サブユニットのホモ

ダイマー形成やDNA結合に必要とされる塩基性ヘリックス-ループ領域のアルギニンやリジンをグルタミン酸やアラニンに置換した変異体が、いずれも増殖の低温感受性を示すなど、生化学的なデータと遺伝学的なデータを結びつけることが出来た。

以上のように、本論文は分裂酵母 **TFIIE** タンパク質に関して新たな知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものとする。