The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	基本転写因子TFIIEの構造と機能の解析
Author(s)	田中, 亜紀
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46551
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

【8】

氏　　名	田中亜紀（たなかあき）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　20246　号
学位授与年月日	平成18年3月24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	**基本転写因子TFIIEの構造と機能の解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　宇野　公之　　教　授　山口　明人

論文内容の要旨

生物の遺伝情報は子孫に正確に伝わることが重要であるのは勿論のことであるが、生命活動の際に、情報はDNAからRNAに転写されタンパク質に翻訳されるという流れで発現されなければならない。それぞれの遺伝子を、いつ、どこで、どのくらい転写するかを決めるのは、基本的に転写因子と呼ばれるタンパク質であり、厳密な制御がなされている。真核細胞では、タンパク質をコードする遺伝子は全てRNAポリメラーゼII（pol II）により転写される。Pol IIは転写開始の際に自身で転写開始位置を認識できないため、プロモーター上に5つの基本転写因子（TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH）と転写開始複合体を形成する段階が必要である。これらの因子の一つであるTFIIEを我々の研究室において同定し、解析を進めている。

TFIIEは転写開始複合体形成の後期にTFIIHを複合体にリクルートしつつ加わり、TFIIHを制御して、Pol IIのリン酸化修飾により転写開始複合体を活性化し、さらにATPの加水分解によって生じたエネルギーを利用してTFIIHのプロモーター開裂を誘導し、Pol IIに転写を開始させると考えられている。TFIIEは生体内で$\alpha_2\beta_2$のヘテロ4量体を形成すると推測されており、分裂酵母ではヘテロ破壊株の四分子解析により両サブユニットとも生育に必須であり、各サブユニットが明瞭に機能分担されて、片方のサブユニットのみではTFIIEの機能を相補できないことが明らかとなっている。このことからもTFIIEの機能の重要性が推測されるが、TFIIEがどのようにして転写開始複合体に加わり、細胞内シグナルを受け取って複合体の活性化に関わるのか、その分子機構はほとんど明らかにされていない。

そこで私はTFIIEを介したPol IIによる転写ネットワークの分子機構の解明を目指し、ヒトTFIIEの点変異による機能解析と、TFIIEと相互作用する因子の探索を行うことにした。本論文ではTFIIEの転写機能に必要な3つの領域の点変異による機能解析について述べる。

まずαサブユニットはN末端のwinged helix領域と中央のZnフィンガー領域、そしてβサブユニットは中央のwinged helix領域の変異体を作製することにした。これらの領域は生物間で非常に保存性が高く、これまでの欠失変異体を用いた解析から基本転写に必要とされる領域である。興味深いことに、原核生物と真核生物の間に位置する古細菌にもαサブユニットのwinged helix領域とZnフィンガー領域を含むN末半分のホモログTFEが存在することが明らかになり、この領域の転写での重要性が考えられる。このどちらの構造モチーフもタンパク質間相互作用と、DNA結合に関わるモチーフであり、αサブユニットはこれまでの解析からDNA結合活性を持たないと考えられてい

るが、winged helix 領域と Zn フィンガー領域の構造が明らかになり、その分子表面は負電荷を帯びており、DNA 結合でなくタンパク質間相互作用に関わる可能性が構造からも示された。一方、βサブユニットの winged helix 領域は DNA 結合面を持つことが明らかとなっている。これらの特徴的なモチーフは TFIIE の機能に大きく関わる領域であると考えられる。

TFIIE の点変異による解析のストラテジーは、1）*in vitro* 転写再構成系での転写活性の測定。2）これら変異体と GST 融合基本転写因子を用いた GST pull-down アッセイ。3）DNA 結合活性の測定や、Pol II のリン酸化アッセイ。本解析では行っていないが、最終的にヒト培養細胞や分裂酵母を用いた *in vivo* での解析。これらにより、TFIIE がどのように転写開始反応に機能しているのか、その分子機構を明らかにすることができると考えられる。

まずαサブユニットの winged helix 領域について、これまでの欠失変異体を用いた解析から、αサブユニットの N 末側の Zn フィンガー領域を除いたおよそ 140 アミノ酸残基からなる領域がβサブユニットとの結合に必要といわれている。本実験の結果、真核生物で保存されている芳香族アミノ酸である 25 番目のフェニルアラニンと 26 番目のチロシンがβサブユニットとの結合に必要であることが示唆された。また、45、46 番目のグルタミン酸、47 番目のアスパラギン酸は酸性アミノ酸が集まっている領域であるが、転写開始に必要な TBP、TFIIB、TFIIFβとの結合に関わる領域なのか、本解析で行っていない Pol II との結合や、DNA と直接結合しないが適切な位置に配置する役割を持つ可能性がある。また、winged helix 領域の内側に位置する 63 番目と 66 番目のロイシンは、変異により基本転写因子との結合に影響はほとんどないが、転写活性が著しく低下した。この二つのアミノ酸の変異により、winged helix 構造が変わると推測され、形成された転写開始複合体が不安定であり、効率よく転写反応を開始できない可能性が考えられる。αサブユニットの winged helix 領域の C 末側は転写開始から伸長への移行段階に関わる可能性が示唆された。

つぎにαサブユニットの Zn フィンガー領域は、はじめ以下のことが推測された。亜鉛イオンを配位する 129、132、154、157 番目のシステインに変異を入れると亜鉛イオンを配位せず、その構造が大きく変わる。しかし、βサブユニットと結合できるため TFIIE を形成して転写開始複合体に加わる。この領域はタンパク質間相互作用に関わると考えられ、転写に関わるなんらかの因子との結合が低下して転写活性が低下すると考えられた。実験の結果、これら 4 つのシステインにそれぞれ変異を入れることにより転写活性が著しく低下し、ほとんど検出できなかった。これらの変異体は構造が大きく変化するものの、予想に反して亜鉛イオンを配位していた。またβサブユニットとの結合に影響はなく、TFIIE を形成して転写開始複合体を形成すると考えられる。しかしこの領域に直接結合する因子との結合が低下したため、または複合体が不安定になり転写反応を開始できない可能性が考えられる。

βサブユニットの winged helix 領域は、実験の結果、DNA 結合面を形成する 86、129、142 番目のリジンに変異を入れると転写活性が低下し、特に 129 番目のリジンへの変異が転写活性に大きく影響した。この変異体は二本鎖 DNA との結合と Pol II のリン酸化活性も低下していた。これは、Pol II の転写開始位置の決定には TBP と TFIIB が関わるが、TFIIE が DNA と結合することで転写開始複合体を安定化し、Pol II のリン酸化が転写反応の開始に必要である可能性と、もしくは TFIIE 自身、さらに TFIIE とともに転写開始複合体に加わる TFIIH を DNA 上に留めておき、Pol II や他の基本転写因子がまさに転写反応を開始しようと形成している複合体に効率よく加わり、複合体を活性化するために必要である可能性が考えられる。

これまでいわれてきた転写に必要とされる領域の機能に関して、本解析で、より詳細な情報が得られつつある。一つのアミノ酸または数アミノ酸が TFIIE の転写機能に関わり、転写開始複合体の形成や活性化に必要である可能性が示された。今後、ヒト TFIIE の変異による機能解析をさらに進めるとともに、TFIIE と相互作用する新規因子の解析を通して、細胞核内の協調的な遺伝子発現に関わる事象の TFIIE による制御機構の解明がなされると期待している。

論文審査の結果の要旨

基本転写因子 TFIIE は、転写開始複合体形成の後期に TFIIH を複合体にリクルートしつつ加わり、TFIIH を制御して RNA ポリメラーゼ II（Pol II）のリン酸化修飾により転写開始複合体を活性化し、さらに TFIIH のプロモータ

一開裂を誘導し Pol II に転写を開始させると考えられている。本論文は、TFIIE を介した Pol II による転写ネットワークの分子機構の解明を目指し、ヒト TFIIE の点変異による機能解析と、TFIIE と相互作用する因子の探索を行い、以下に述べる結果を得た。

1）TFIIE α サブユニットの N 末端側の winged helix 領域について、真核生物で保存されている芳香族アミノ酸である 25 番目のフェニルアラニンと 26 番目のチロシンが β サブユニットとの結合に必要であることが分かった。また winged helix 領域の内側に位置する 63 番目と 66 番目のロイシンは、変異により基本転写因子との結合にはほとんど影響ないが、転写活性が著しく低下した。この二つのアミノ酸の変異により、winged helix 構造が変わると推測される。

2）α サブユニットの Zn フィンガー領域のシステインに変異を入れたところ、予想に反して亜鉛イオンは配位していたが、転写活性が著しく低下した。β サブユニットとの結合には影響なく、他の転写因子との結合が低下することにより、複合体が不安定となると推測された。

3）β サブユニットの winged helix 領域は、DNA 結合面を形成する 86、129、142 番目のリジンに変異を入れると転写活性が低下し、特に 129 番目のリジンへの変異が転写活性に大きく影響した。この変異体は、二本鎖 DNA との結合と Pol II のリン酸化活性も低下していた。これは Pol II の転写開始位置の決定には TBP と TFIIB が関わるが、TFIIE が DNA と結合することで転写開始複合体を安定化し、Pol II のリン酸化によって転写反応が開始するという考えをサポートする。

以上のように、本論文は Pol II による転写における TFIIE の機能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考える。