

真核生物ゲノムの遺伝子情報発現における基本転写因子の制御的役割の解明

●大熊 芳明^{1),2)}

1) 大阪大学細胞生体工学センター細胞構造研究分野 2) 現所属、富山大学薬学部遺伝情報制御学研究室

〈研究の目的と進め方〉

生物にとってゲノム情報は、複製の形で子孫に正確に伝わるだけでなく、その情報を発現し、細胞外部のシグナルに応答して初めて意味がある。真核生物は、核内に大量の情報をクロマチンという形で収納している。遺伝子発現では、クロマチン構造が解かれることでプロモーターに裸の領域が出来、RNAポリメラーゼII (Pol II)と基本転写因子が複合体を形成して転写が開始される。本研究は、Pol IIの転写開始に必要な基本転写因子TFIIEとTFIIHの解析を通し、真核生物ゲノムの遺伝子情報発現における基本転写因子の役割解明を目的とする。進め方は、酵母の遺伝学を用いて酵母TFIIEに変異を入れ、いかなる表現型が生じるかを調べる。一方、ヒトの系ではTFIIEとTFIIHの構造と機能解析に加え、転写メディエーターおよび伸長段階を制御する転写伸長因子等の協調的に機能する因子群、またTFIIEやTFIIHの新規相互作用蛋白質を酵母2ハイブリッド法にて同定し、解析することで転写機構解明の糸口とする。

〈研究開始時の研究計画〉

【平成12年度】

RNAポリメラーゼII (Pol II)は、その正確な転写開始のために5種の基本転写因子(TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH)を必要とする。これらの因子が遺伝子のプロモーター上で転写開始複合体を形成するのであるが、この反応はTFIIDが転写開始点の5'側上流30塩基付近に存在するTATAボックスに結合することから始まり、TFIIB、TFIIF/Pol II、TFIIE、TFIIHの順に会合して完了する。この複合体の形成には、クロマチンの構造が解かれ、プロモーター領域のコアヒストン蛋白質が除去されるという事象がまず起こっていることが前提であるが、我々は、一度ヒストンが除去されると複合体の制御はこのクロマチンの構造の変化とは直接関係しないという考えに基づき、裸のDNAを用いて解析している。転写開始複合体の形成は、既に様々な手法により解明されてきているが、この複合体がいかに活性化されるのかは未だ謎の部分が多い。我々や他の幾つかのグループは、最近になって基本転写因子の中でも最後に複合体に加わるTFIIEとTFIIHが転写開始複合体、特に転写を実際に行う際のPol IIの活性化に重要であることを見出した。更に我々は、ヒトTFIIEを用いて、これが複合体に取り込まれてTFIIHをPol IIとプロモーターの転写開始点の近傍という適切な位置に導入することが活性化のためにまず最初に重要であること、そしてTFIIEはTFIIE β サブユニットのC末の塩基性領域でPol IIやTFIIHといった蛋白質に結合してその活性制御に関与するだけでなく、winged-helixという構造をとることを我々が明らかにした、TFIIEbの中央コアドメインを用いて、プロモーターにも転写開始複合体の活性化の際に2本鎖が開裂して1本鎖になる転写開始点のすぐ上流領域に結合して重要な役割を果たしていることを示してきた。そこで本年度は、まずこのTFIIEとTFIIHの解析を中心に進めたく考えている。

具体的には、i) TFIIEの2つのサブユニットの様々な点及び欠失変異体を用いた転写活性、他の転写因子との相互作用、Pol IIのリン酸化による活性化、構造生物学による構造変化の解析、ii) 分裂酵母のTFIIEホモログを用いた変異の表現系の遺伝学的解析、iii) 遺伝病の患者の有する欠失TFIIHの転写開始複合体活性化能の欠損の生化学、分子生物学的解析の3点を柱にする。

【平成13年度】

RNAポリメラーゼII(Pol II)による転写は、転写的に不活性な状態のクロマチン構造をとったDNAを活性型にするクロマチン構造変換因子群と転写開始複合体の形成を助け、活性化する転写制御因子群の作用で制御されている。これら因子は、生化学的、遺伝学的に、またゲノムプロジェクトによるゲノム配列の解読によって驚く程の速度で次々と単離、同定されてきている。最近になり、これらのうちヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)、転写制御因子、メディエーターのあるものは一緒に巨大な複合体を形成して、総合的な転写活性化を行っていることが明らかになった。我々の注目するのは中でも転写メディエーター複合体でSMCC、TRAPあるいはNAT複合体と呼ばれ、これらは互いに同じ組成であることが明らかにされているものである。この複合体は10個以上から成るサブユニットの中にSRB10、SRB11と呼ばれるCDKとcyclinのホモログを含み、Pol IIのリン酸化を行うことが明らかにされて、転写開始複合体形成の際にTFIIHの機能と置き換える可能性が考えられている。もう一つ、転写伸長段階へのPol IIの移行の際に機能する転写伸長因子P-TEFbもCDK9、cyclin T1というCDKとcyclinのホモログで、Pol IIのリン酸化を行うことが示された。このことから、P-TEFbはTFIIHのもう一つの役割と考えられる転写開始から伸長への移行期での機能を置き換えることが推測される。実際、この推測は、Pol IIのリン酸化による分子量の変化がTFIIHとP-TEFbでも同様に見られることから裏付けられている。そこで、これらメディエーター複合体とP-TEFbの機能とTFIIHの機能の比較検討を行う。またTFIIEの方は、多くのHATによりアセチル化を受けることが報告されたので、その事象の持つ意味合いについても解析を進める。

〈研究期間の成果〉

1. TFIIEの構造と機能の解析

ヒトTFIIEは、 α と β サブユニットが $\alpha 2\beta 2$ のヘテロ4量体を形成し、Pol IIの転写に必要である。我々は、TFIIEの機能を解析する目的で線虫からTFIIEを単離しヒトTFIIEと比較検討した。ヒトと線虫TFIIEのサブユニットを組み合わせたキメラTFIIEを発現・精製し、転写再構成系にてヒトTFIIEと機能的互換性を検討したところ、線虫 β はヒト β と部分的に置き換ったが、線虫 α は置き換らなかった。原因を検討したところ、線虫 α はヒト β との結合活性が10%以下となりヒトTFIIEの様な転写活性を示さないことが分った。線虫 β はヒト転写系では

伸長への移行活性が低かった (リスト6)。一方、ヒトでの解析の結果、TFIIEはPol II最大サブユニットのCTDリピート配列の2番目と5番目セリンのTFIIHによるリン酸化を促進することを明らかにしている (リスト2)。そこで、次にヒト α と線虫 β のキメラでCTDリン酸化を調べると、5番目のセリンリン酸化活性が著しく低下していた (リスト6)。このことから以下のことが明らかになった。1) TFIIEは、転写の開始だけでなく開始から伸長の移行段階においても重要な役割を果していること。2) 転写の開始から伸長への移行段階においては、Pol IICTDの5番目のセリンリン酸化が重要であること。

2. 遺伝病の患者の有する欠失TFIIHの転写開始複合体活性化能の欠損の生化学、分子生物学的解析

TFIIHの転写におけるPol IICTDのリン酸化活性の特異性を調べたところ、転写を行うためにはCTDの5番目のセリンリン酸化が重要であることを明らかにした (リスト2)。また、転写開始の際にTFIIHのDNAヘリカーゼサブユニットXPBが遺伝子プロモーターの転写開始点周辺の一本鎖DNAへの開裂が重要であることを示した (リスト1)。また、紫外線のDNA損傷に対する修復反応を行うXPC-HR23B複合体は損傷DNAの修復の際に損傷部位にTFIIHをリクルートするために重要な役割を果していることを明らかにした (リスト4)。

<国内外での成果の位置づけ>

これらの転写とPol IICTDリン酸化の関係の解析や、TFIIHを介した、転写とDNA損傷修復のカップリングの研究を分子レベルで行っているのは、我々のグループをおいていないと考えられる。そこで、この成果は、ドイツのハイデルベルグで2000年の8月に開かれたEMBL転写ミーティングにて招待口頭講演で発表して好評を持って迎えられた。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

TFIIEによるヒト細胞核内での遺伝子発現制御ネットワークを解明する目的で、出芽酵母を用いた2ハイブリッドシステムによるTFIIE相互作用因子の検索を何度も試みたがベイトなしでTFIIEのサブユニット単独で酵母の転写活性化をしてしまうため、成功しなかった。おそらくTFIIEは単独でRNAポリメラーゼIIと結合する性質を持っているためと考えられる。

<今後の課題>

今回、転写伸長への移行活性はPol IICTDの5番目セリンリン酸化と密接な関連性があることが示唆された。ヒトのゲノム解読が完了しようという今、「その情報はいかに発現されて機能するのか」という問題が、今後の大きなテーマになる。我々の得た遺伝子発現の制御解析は、生命現象を解明する上での重要な指標と成り得ると考え、さらに進めていく。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 原著論文

1. Douziech, M., Coin, F., Chipoulet, J.-M., Arai, Y., Ohkuma, Y., Egly, J.-M. and Coulombe, B. Mechanism of promoter melting by the Xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8168-8177, 2000.
2. Watanabe, Y., Fujimoto, H., Watanabe, T., Maekawa, T.,

- Masutani, C., Hanaoka, F., and Ohkuma, Y. Modulation of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II. *Genes Cells* 5: 407-423, 2000.
3. Okuda, M., Watanabe, Y., Okamura, H., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., and Nishimura, Y. Structure of the central core domain of TFIIE β with a novel double-stranded DNA-binding surface. *EMBO J.* 19:1346-1356, 2000.
4. Yokoi, M., Masutani, C., Maekawa, T., Sugawara, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of TFIIH to damaged DNA. *J. Biol. Chem.* 275: 9870-9875, 2000.
5. Araki, M., Masutani, C., Maekawa, T., Watanabe, Y., Yamada, A., Kusumoto, R., Sugawara, K., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. Reconstitution of damage DNA excision reaction on SV40 minichromosomes with purified nucleotide excision repair proteins. *Mutation Res.* 459: 147-160, 2000.
6. 0202081339
Yamamoto, S., Watanabe, Y., van der Spek, P., Watanabe, T., Fujimoto, H., Hanaoka, F. and Ohkuma, Y. Studies of nematode TFIIE reveal a link between Ser-5 phosphorylation of RNA polymerase II and the transition from transcription initiation to elongation. *Mol. Cell. Biol.* 21:1-15, 2001.
7. 0202081435
Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugawara, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y., and Hanaoka, F. Centrosome protein cetrin2/caltractin1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, 276: 18666-18672, 2001.