

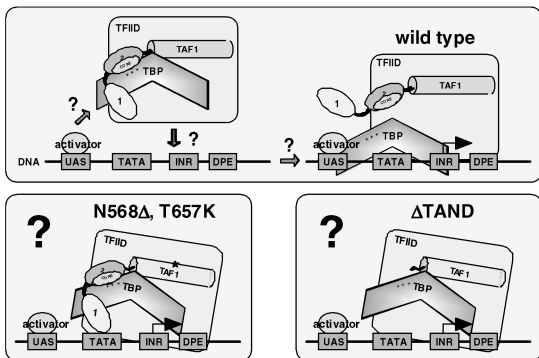
基本転写因子TFIIDに支配される標的遺伝子群の網羅的単離とそのプロモーター特性

●古久保哲朗

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科

＜研究の目的と進め方＞

コアプロモーター構造を認識する基本転写因子TFIIDは、転写調節因子から受け取った信号を転写量の増減へと変換する上で中心的な役割を果たす。我々はTAF1 (TFIIDサブユニットの一つ) のTBP (TATAボックス結合タンパク質) 機能阻害領域TAND (TAF N-terminal domain) が2個の機能ドメインから構成されること、及びそれらがTFIIDによる転写活性化の分子スイッチとして機能する可能性を示すとともに、コアプロモーターの認識能に異常をきたす*taf1*点変異体を複数単離し (N568D, T657K)、その解析を進めてきた。TFIIDを含む普遍的転写因子間の機能的ネットワークの実体を明らかにしていくためには、それぞれの標的遺伝子を網羅的に単離するというゲノム生物学的手法が極めて有効である。そこで本研究では、DTAND, N568D, T657K変異株において発現レベルの変化した遺伝子群を網羅的に単離し、様々な計測手法を駆使することによってそれぞれに共通するプロモーター構造の解明を試みる。またこれらの解析を通じて真核細胞における遺伝情報発現の選択性を支配する基本原理の解明を目指す。



*taf1*変異株 (N568Δ, T657K, ΔTAND)において影響を受けている標的遺伝子群の網羅的単離
↓
標的遺伝子群のプロモーター解析、二重変異株等の利用
↓
TFIIDサブユニット (TAFs) の機能の解明
普遍的転写因子間の機能的ネットワークの解明

＜研究開始時の研究計画＞

上記変異株について、Affimetrix社のDNAチップにより発現の変動する標的遺伝子群を網羅的に単離する。その後詳細なプロモーターマッピングを行い、発現変動の理由を明らかにする。さらにDTAND株と合成致死性を示す*taf12*変異株 (文献7,10参照) についても同様の解析を行い、普遍的転写因子間の機能的ネットワークについて新たな知見を得る。

＜研究期間の成果＞

1) DNAチップ解析

①変異株と野生株 (対照) に対して独立に三回のDNAチップ実験を行い、二回以上の試行において正負2.5倍以

上の変動を示した遺伝子を有意な標的遺伝子としてスコアした。その結果、397個 (N568D), 521個 (T657K), 49個 (DTAND) の標的遺伝子が同定された。
②N568D/T657K/DTAND株において特異的に影響を受ける遺伝子はそれぞれ375/272/26個存在し、逆にN568D/T657K/DTAND株においてのみ影響が見られない遺伝子はそれぞれ4/4/230個存在した。また全てにおいて影響の見られた遺伝子は15個であった。
③同様の解析をTFIIDとSAGAの共通サブユニットである*taf12*-L420S, -W486stop変異株 (文献7) についても行い、それぞれ429/511個の標的遺伝子を見出した。それぞれに特異的なものは220/302個,両者に共通のものは209個であった。
④上記の解析では正負2.5倍以上の変動を示したものを有意としたが、この閾値ではノザンプロットングにより検出できないほど発現レベルの低い遺伝子も数多く含まれてしまうことが明らかとなった。引き続きプロモーター解析を行うためには、変動倍率のみならず発現量を考慮して標的遺伝子を選択し直す必要があると考えられた。そこで正負1.5倍以上の変動を示すもの (閾値を1.5倍に設定することにより、発現量が低く、見かけの変動量が大きい遺伝子の占める割合が相対的に低下する) をあらためて選び直し、ゲノム全体におけるTAF標的遺伝子の割合として図1に示す結果を得た。興味深いことにいずれの*taf*変異も正負両方向にほぼ同程度の影響を与えていることが明らかとなった。

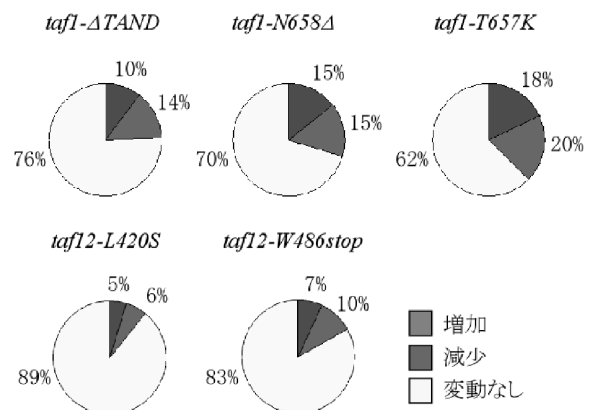


図1. 各種*taf*変異株において特異的に発現が変動する遺伝子のゲノム全体に占める割合

⑤上記の方法により、DTAND1+2, DTAND3 (文献5), DTAND1+2+3, dmTAND1 (キメラ型, 文献1) [以上TANDに変異を有する*taf1*変異株], Y570N, N568D, T657K [以上TAND以外の領域に変異を有する*taf1*変異株], L420S, W486stop [以上ヒストンフォールドドメインに変異を有する*taf12*変異株] の合計9株について標的遺伝子を網羅的に同定した。またクラスター解析によって実際に影響を受けた遺伝子群を相互に比較し、[DTAND1+2, DTAND1+2+3, dmTAND1] グループ間、

[N568D, T657K] グループ間, [L420S, W486stop] グループ間において生じる変化が互によく似ていること、及び[DTAND1+2, DTAND1+2+3, dmTAND1] グループは[N568D, T657K], [L420S, W486stop] 両グループの中間的な性質を示すこと等を明らかにした。

2) TAND標的遺伝子のプロモーターマッピング

① まずTANDが転写調節因子に対する分子スイッチとして機能していることを確かめるため、各種TAFタンパク質のN, C両末端への異所移植を行い、TANDが自律的な活性（分子スイッチとしての性質）を有することを示した（図2, 文献3）。またTANDとTBPの相互作用を構造生物学、遺伝学的な手法により詳しく解析し、TAND1がTBPのDNA結合ドメイン側と、またTAND2がTBPのTFIIA結合ドメイン側と相互作用していることを示した（文献2）。

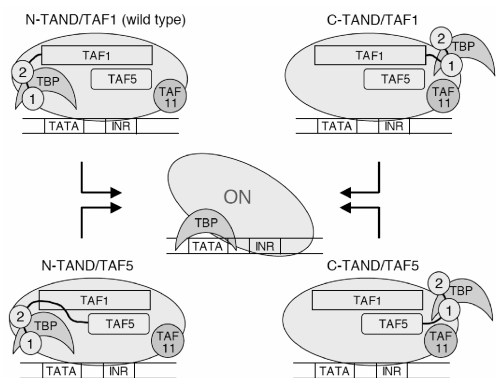
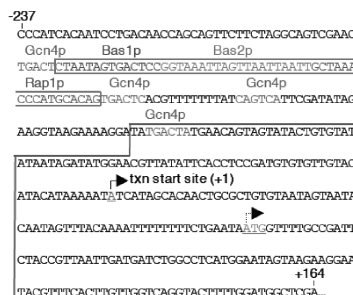
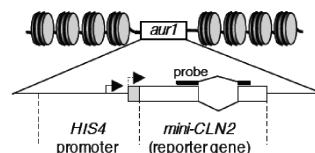


図2. TANDはTAF1のN末端のみならず、TAF1のC末端、TAF5のN, C両末端においても機能することができる。

- ② DNAチップ法を用いて同定したTANDの標的遺伝子の一つであるHIS4についてプロモーターマッピングを行い、TANDが転写因子BAS1による転写活性化に必要であること（図3）、またBAS1はTAND依存性及びMED9（mediator複合体のコンポーネントの一つ）依存性の二種類の転写活性化ドメインを有することを明らかにした。さらに大多数の遺伝子の転写活性化にはTANDあるいはMED9のいずれかがあれば十分であるが、BAS1とHIS4コアプロモーターの組み合わせにおいてのみ両機能が必要であることを示した。
- ③ BAS1によるTAND依存的な転写活性化におけるコアプロモーターの役割を明らかにするため、HIS4のコアプロモーターをCYC1, CUP1, HIS3, ADH1, ADE2, ADE5,7等異種遺伝子のコアプロモーターで置換したところ、ADE2のコアプロモーターにおいてのみHIS4と同様のTAND依存的な転写活性化が観察された。このことは塩基配列特異的なTFIIDの構造変化がBAS1による転写活性化に重要であることを示している。
- ④ in vitro実験系を用いた解析から、BAS1によるTAND依存的な転写活性化は、BAS1とTATAボックスが協調的に作用して、TAND-TBP複合体を解離させるために起こることが明らかとなった（図3）。

A



B

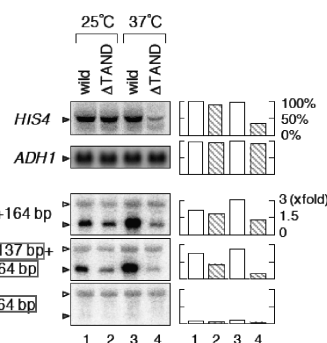
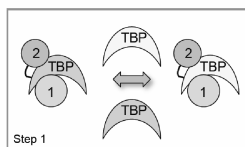


図3. A) HIS4プロモーターの構造（下パネル）と活性測定に用いたレポーター遺伝子（mini-CLN2）の構造（上パネル）。B) ノーザンブロットティング。コントロールのADH1遺伝子と比べてHIS4遺伝子の内在性転写産物量はDTAND株において有意に低下する（37°C, 上パネル）。プロモーターマッピングの結果、Bas1, Bas2, Rap1結合部位を含むUAS (-187~-137bp, 緑色枠) からコアプロモーター配列 (-87~+164bp, 赤色枠) への転写活性化シグナルの伝達に欠損があることが明らかとなった。

TFIID OFF (アイドリング状態)



Step 1

RD2 AD2 BAS1*

Step 2

TBP BAS1*

RD2 AD2

+ TATA

+ GAGA

Step 3

TBP TATA

transcription ON

BAS2

TFIID ON

Step 3

図3. BAS1とTATAボックスの協調作用によるTANDとTBPの解離機構

またHIS4プロモーターが活性化するためには、TAND-TBP複合体解離後に、引き続きBAS2 (BAS1と相互作用する転写因子) が作用する必要があることが示された（図3）。

3) コアプロモーター配列の転写制御における重要性

前項③で述べたように、転写調節因子がコアプロモーター配列特異的に機能する例が近年知られつつある。以下に我々自身が明らかにした他の事例をまとめる。

① *taf1-N568D*, *-T657K*株においてはRPS5, TUB2遺伝子等TATA-lessプロモーターからの発現が顕著に低下する。その原因を詳細に解析したところ、TUB2プロモーターの場合、TAF1依存性を付与する領域は上流配列(UAS)ではなくコアプロモーター配列であること、またコンセンサスなTATAボックスの挿入によりTAF1依存性はほぼ完全に失われることが明らかとなった。一方、RPS5プロモーターの場合には主にUASがTAF1依存性を付与しており、わずかながら検出されるコアプロモーターのTAF1依存性はTUB2の場合と同様にコンセンサスなTATAボックスの挿入によってほぼ完全に失われることが示された(文献9)。以上の結果はTAF1の機能が基本転写のみならずコアプロモーター構造に依存した転写活性化にも重要であることを示している。

さらに高等真核生物においても同様のコアプロモーターの機能特異性が見られるか否かについて調べるため、以下の解析を行った。

② バウンユニのOtx遺伝子は互いに異なるプロモーターにより支配される二種類のタンパク質(初期型HpOtxEと後期型HpOtxL)をコードする。HpOtxEはTATA-lessプロモーター、HpOtxLはコンセンサスなTATAボックスを含むプロモーターにより制御されており、それぞれの発現は未孵化胎胚期、孵化胎胚期に始まる。種々のプロモーターコンストラクトを作成してウニ胚への遺伝子導入実験を行ったところ、HpOtxLプロモーターの場合にはTATAボックスの欠失により発現時期が早まり、逆にHpOtxEプロモーターの場合にはTATAボックスの挿入により発現時期が遅れることが明らかとなった。興味深いことに、このTATAボックスによるOtx遺伝子の発現の遅れには、上流に存在するCACGTG配列が必要であることが示された。従ってOtx遺伝子の発現時期の決定には、CACGTG配列(に結合する因子→おそらくはUSFと考えられる)とTATAボックス(に結合する因子→おそらくはTFIIDと考えられる)の相互作用が関与するものと考えられる(図4, 文献8)。同様の転写制御におけるコアプロモーター配列の機能特異性はマウスの細胞においても示された(文献4)。

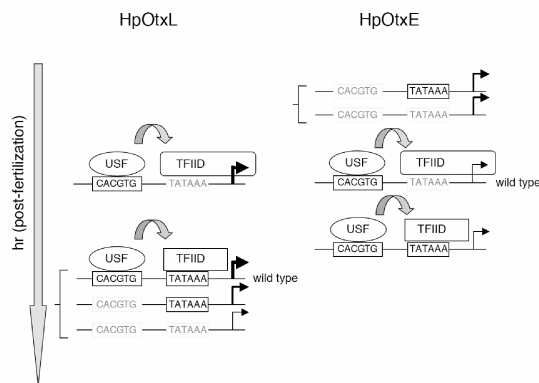


図4. HpOtxL, HpOtxE プロモーターの転写制御機構

4) ポリリン酸を指標とする遺伝子発現モニタリング法の開発と応用

出芽酵母が液胞に著量蓄積しているポリリン酸を³¹P-NMRによりイメージングすることにより、非破壊的にプ

ロモーター活性を測定する新規アッセイ系の開発を試みた(京都大学・白川昌宏教授のグループとの共同研究)。ポリリン酸合成に関与する複数の遺伝子の中からレポーター遺伝子として使用可能なものを検索し、発現誘導、発現抑制それぞれに有効と考えられるものを同定した。実際にこれらを用いて新規アッセイ系の感度を調べたところ、ノーザンブロット法と同等もしくはそれ以上であることが明らかとなった。

5) TFIID, SAGA複合体のプロモーター結合状態に関するゲノムワイドな解析

出芽酵母の3,4,5,6番染色体について、TAF1~14, Spt8, GCN5, TFIIE, TFIIF, TFIH, RNAポリメラーゼII (pol II) のプロモーターに対する結合状態を調べるため、ChIP on chip解析を行った(東京工業大学・白髭克彦助教授のグループとの共同研究)(一例を図4に示す)。その結果、TFIIDはほぼすべての転写されている遺伝子のプロモーター上に結合していること、プロモーターへの結合量にはTFIIDサブユニットごとに若干の違いが見られること、TFIIDとSAGAの結合は互いに排他的なものではないこと、等が明らかとなった。これらの知見は、*taf*変異株における転写解析結果に基づき提唱されてきた従来の考え方は異なるものであり、普遍的転写因子間の役割分担を再度見直す必要があると考えられる。

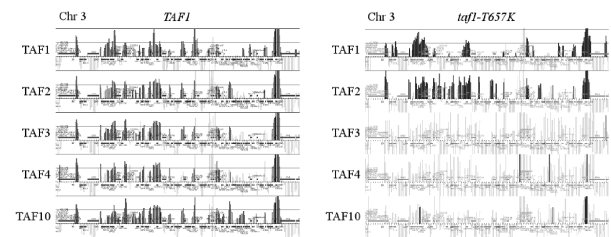


図5. ChIP on chip 解析(一部を示す)

6) TFIIDとSWR-C複合体の遺伝学的な相互作用

*taf1DTAND*に対して合成致死性を示す遺伝子のスクリーニングにおいて、SWR-C複合体のサブユニットであるVPS72を同定した。SWR-C複合体は、ヒストンH2AとヒストンH2A.Zの交換反応を触媒することにより、転写を制御することが知られている。特にVPS72はH2A.Zと直接結合するサブユニットであり、SWR-C複合体の機能に必須である。またH2A.Zは転写開始点に局限して存在することから、基本転写装置と密接な関係にあると考えられるが、その詳細については未だ不明な点が多い。今回の結果は、TFIIDとSWR-C複合体間に何らかの制御ネットワークが存在する可能性を示唆しており、本研究の今後の進展が期待される。

またSWR-C複合体の他のサブユニットであるRvb2については、TAF1との機能的類似性、TBPとの合成致死性等を明らかにした(奈良先端科学技術大学院大学・河野憲二教授のグループとの共同研究)(文献6)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

真核細胞において、いつどの遺伝子がどれだけ発現するかは、転写調節因子とTFIIDの相互作用によって最終的に決定される。すなわち、転写調節因子のシグナルをどのようにRNAポリメラーゼIIに伝えるかは、コアプロモーターに結合したTFIIDの立体構造によって大きく支配されるといってもよい(コアプロモーター配列に応じて、TFIIDの立体構造は大きく変化する)。従って遺伝子

発現選択の分子機構を根本的に理解するためには、コアプロモーター構造をゲノムワイドに解析し、そこに隠されたシス配列に関するルールをまず明らかにする必要がある。そのための第一歩として、本研究ではまず出芽酵母、ウニ、マウス等の細胞を用いて、転写調節因子がコアプロモーター配列特異的に機能する複数の例を示した。さらに遺伝学的な手法を駆使することが可能な出芽酵母細胞を主な材料として、転写がTFIIDの機能により強く依存する遺伝子群の同定を行い、全プロモーターに対するTFIIDサブユニットの結合状態を詳細に調べた。得られた成果の中には従来の考え方では説明できない知見もいくつか含まれており、今後解析を進める上で極めて有用な材料を得ることができたと考えられる。

その他、TANDの転写活性化における分子スイッチとしての機能に注目してゲノムワイドな研究を行い、得られた標的遺伝子の一部について詳細な解析を行った。その結果、転写調節因子の活性化シグナルは、TAND, TBP, TATAボックス三者間の相互作用の変化によって解読されるという新しい分子モデルを構築することに成功した。転写調節因子が基本転写装置に接触して何が起るのかという古くからある未解決の問題について、分子レベルで何らかの示唆が得られたのは今回が初めてであり、大きな意義があると考えられる。また詳細なプロモーターマッピングを可能とするために、NMRを用いたバイオイメージング技術の開発を試みているグループも我々のみであり、その点についても独創的な成果が得られつつある。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

残念ながら多数のプロモーターについてマッピングを進め、共通構造を抽出するまでには至らなかった。その主な理由としては、解析対象とすべき標的遺伝子が莫大な数であったため、従来のノーザンブロット法ではマッピングに多大な時間と労力が必要となったことが挙げられる。この困難を克服するため、NMRを用いて極めて簡便かつ非破壊的に酵母コロニー中の遺伝子発現をモニタリングする新技術の開発を試みた。方法論はほぼ確立したものの、転写オフのキネティクスを測定できるレポーター遺伝子の同定に手間取ったため、実際にハイスループットにサンプル処理を行うまでには至らず、期間内に解析できたプロモーター数が限られたものとなってしまった点については、誠に残念であった。

＜今後の課題＞

31P-NMRによるイメージング技法を完成させるとともに、形質転換体をトレイ上に多数整列させるため、自動化システムの導入を図る。またこのシステムを用いて、実際にプロモーターマッピングを進める（現在数個の解析が進行中）。当面は、細胞の増殖速度と密接に関連して制御されている138個のリボソームタンパク質（RP）遺伝子群（TAF標的遺伝子の一部）について、その協調的制御の分子基盤を明らかにすべく、解析を進める予定である。最終的には数百個の全TAF標的遺伝子についてプロモーター解析を行い、TFIIDのシグナルプロセッサとしての機能の全容解明を目指したい。

標的遺伝子ごとにプロモーター上にリクルートされるサブユニットの種類や量には少なからず違いが見られたことから、転写における各TFIIDサブユニットの役割は様々であると考えられる。今後はMot1, NC2等TFIIDの機能に強く関連する他の普遍的転写因子群についてもChIP-chip解析をゲノムワイドに行うことにより、TAF標的遺伝子の発現量の変化（野生株 vs taf変異株）が各TFIIDサ

ブユニットのみならず、これらの普遍的転写因子群のDNA結合量の変化に起因するものかどうかについても新たな知見を得たいと考えている。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

1. K. Kasahara, M. Kawaichi, T. Kokubo
In vivo synthesis of Taf1p lacking the TAF N-terminal domain using alternative transcription or translation initiation sites
Genes to Cells, vol.9, No.8, 709-721 (2004)
2. T. K. Mal, Y. Masutomi, L. Zheng, Y. Nakata, H. Ohta, Y. Nakatani, T. Kokubo, M. Ikura
Structural and functional characterization on the interaction of yeast TFIID subunit TAF1 with TATA binding protein.
J. Mol. Biol., vol.339, No.4, 681-693 (2004)
- 3.0403051116 S. Takahata, K. Kasahara, M. Kawaichi, T. Kokubo
Autonomous function of the amino-terminal inhibitory domain of TAF1 in transcriptional regulation.
Mol. Cell. Biol., vol.24, No.8, 3089-3099 (2004)
- 4.0403051056 A. Kobayashi, T. Kokubo, Y. Ota, S. Yokoyama
Promoter-specific function of the TATA element in undifferentiated P19 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., vol.310, No.2, 458-463 (2003)
- 5.0403051001 S. Takahata, H. Ryu, K. Ohtsuki, K. Kasahara, M. Kawaichi, T. Kokubo
Identification of a novel TBP-binding region at the amino terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* TAF1 protein
J. Biol. Chem., vol.278, No.46, 45888-45902 (2003)
- 6.0305121648 H. Ohdate, C. R. Lim, T. Kokubo, K-i. Matsubara, Y. Kimata, K. Kohno
Impairment of the DNA-binding activity of the TATA-binding protein (TBP) renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth
J. Biol. Chem., vol.278, No.17, 14647-14656 (2003)
- 7.0303151351 A. Kobayashi, T. Miyake, M. Kawaichi, T. Kokubo
Mutations in the histone fold domain of the TAF12 gene show synthetic lethality with the TAF1 gene lacking the TAF N-terminal domain (TAND) by different mechanisms from those in the SPT15 gene encoding the TATA binding protein (TBP)
Nucleic Acids Res., vol.31, No.4, 1261-1274 (2003)
- 8.0303151346 A. Kobayashi, K. Akasaka, M. Kawaichi, T. Kokubo
Functional interaction between TATA and upstream CACGTG elements regulates the temporally specific expression of Otx mRNAs during early embryogenesis of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*
Nucleic Acids Res., vol.30, No.14, 3034-3044 (2002)

9.0202262337

Y. Tsukihashi, M. Kawaichi, T. Kokubo

Requirement for yeast TAF145 function in transcriptional activation of the RPS5 promoter that depends on both core promoter structure and upstream activating sequences

J. Biol. Chem., vol.276, No.28, 25715-25726 (2001)

10.0303151342

A. Kobayashi, T. Miyake, Y. Ohyama, M. Kawaichi, T. Kokubo

Mutations in the TATA binding protein, affecting transcriptional activation, show synthetic lethality with the TAF145 gene lacking the TAF N-terminal domain in *Saccharomyces cerevisiae*.

J. Biol. Chem., vol.276, No.1, 395-405 (2001)