

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18861

研究課題名(和文)クロマチン構造変換複合体によるRNAポリメラーゼII転写開始複合体の制御機構

研究課題名(英文)Transcriptional regulatory mechanism of the RNA polymerase II initiation complex by the chromatin remodeling complex

研究代表者

田中 亜紀(Tanaka, Aki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：50432109

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):基本転写因子TFIIEと相互作用する因子としてクロマチン構造変換複合体であるSWI/SNF複合体を同定した。細胞内でTFIIEはSWI/SNF複合体と相互作用し、TFIIHが関わる可能性が示された。SWI/SNF複合体は構成サブユニットによりBAF複合体とPBAF複合体に分けられる。TFIIEは主にPBAF複合体と相互作用することが示された。TFIIEは転写開始および開始から伸長への移行段階でTFIIHと協調的に機能する。このことからTFIIE-TFIIHとSWI/SNF複合体の相互作用は、転写初期の2つの段階で協調的に機能して転写開始の活性化に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文):We performed Mass spectrometry to identify TFIIE binding proteins. It was indicated that TFIIE interacted with the SWI/SNF complex which is one of the chromatin remodeling complexes. The SWI/SNF complex can be divided into BAF and PBAF. Our immunoprecipitation study demonstrated that TFIIE interacted with the PBAF mainly and TFIIH. TFIIE recruits TFIIH to complete the PIC formation and regulates enzymatic activities of TFIIH. There is an interesting possibility that TFIIE-TFIIH act on the promoter coordinately with the PBAF complex and regulates transcription and the chromatin structure together.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子発現 転写 基本転写因子

1. 研究開始当初の背景

転写は生命現象のなかで非常に重要な現象である。しかしながら RNA ポリメラーゼによる転写初期段階の分子機構は未だ不明な点が多い。真核生物において RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は基本転写因子(TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH)と転写開始複合体(PIC)を形成して転写を開始する。これらの因子のなかで TFIIE は転写開始段階および開始から伸長への移行段階で機能する。また PIC 形成時に TFIIE α (TFIIE は α と β の2つのサブユニットからなる)は複合体の外側に位置していることから、PICの外からの情報を受け取るアンテナとして働くと考えられた。そこで我々は TFIIE α をベイトとして相互作用する因子の探索を行い、PICの制御機構を調べることにした。その結果、TFIIE と相互作用する因子としてクロマチン構造変換複合体である SWI/SNF 複合体を同定した。

2. 研究の目的

SWI/SNF 複合体による基本転写因子 TFIIE を介した Pol II の転写開始複合体の制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基本転写因子と SWI/SNF 複合体の相互作用の解析

細胞内で TFIIE と SWI/SNF 複合体の相互作用を調べるために、HeLa 細胞株より核抽出液を調製して、基本転写因子および SWI/SNF 複合体の各サブユニットの抗体を用いて免疫沈降実験を行った。

(2) タグ付き BAF47 安定発現株の樹立

哺乳類 SWI/SNF 複合体は、構成サブユニットにより、BAF 複合体と PBAF 複合体に分けられる。これまでに培養細胞の核抽出液を複数のカラムを通すことで BAF 複合体と PBAF 複合体に分離できると報告されている。そこで二つの SWI/SNF 複合体を精製して基本転写因子との相互作用を調べるために、タグ付き BAF47 安定発現株を樹立し、全細胞抽出液を調製して抗 FLAG M2 アガロースで免疫沈降実験を行った。

(3) ヒト組換え Pol II clamp (rClamp) 発現ベクターの作成

RNA ポリメラーゼはいくつかの特徴的なモジュール(protrusion, jaw, clamp, stalk)が存在し、Pol II が機能を発揮するためには構造変化が重要である。Pol II の clamp 領域は特に可動性が高く、転写の初期段階で位置が変化する。その中で、転写開始および開始から伸長への移行段階における Pol II の clamp の変化を TFIIE が引き起こすと考えられる。そこで Pol II clamp と TFIIE および他の基本転写因子や転写伸長因子との結合様式を検討するために、ヒト組換え Pol II

clamp (rClamp) を作成した。

(4) ヒト rClamp における基本転写因子と転写伸長因子の結合様式の検討

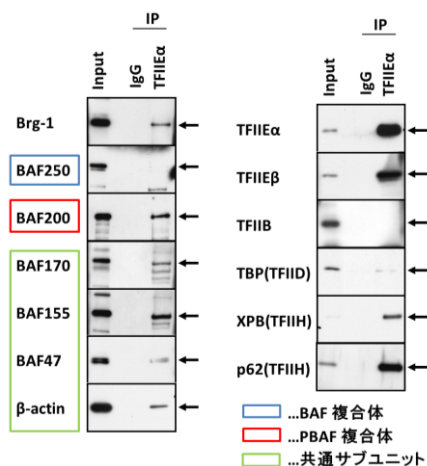
古細菌 RNA ポリメラーゼの解析で、clamp において TFE (TFIIE α ホモログ) と転写伸長因子 DSIF が競合することが報告されている。また我々は転写初期段階を解析しており、ヒト TFIIE α ウィングドヘリックス (WH) 領域と TFIIB の結合は転写開始から伸長への移行に関わることを報告している。これらのことから転写初期段階における Pol II clamp の構造変化に TFIIE だけでなく、TFIIB の関与が考えられた。そこで TFIIE, TFIIB, DSIF と rClamp の相互作用の解析を *in vitro* 結合実験で行った。

4. 研究成果

(1) 基本転写因子と SWI/SNF 複合体の相互作用の解析

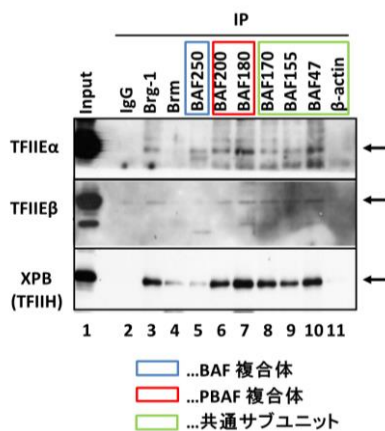
HeLa 細胞の核抽出液から抗 TFIIE α 抗体を用いた免疫沈降を行い、TFIIE α と相互作用する因子をウェスタンブロット法で検出した(図1)。BAF 複合体と PBAF 複合体の共通サブユニットである BAF170, BAF155, BAF47, β -actin は TFIIE と共沈した。また PBAF 複合体のサブユニットである BAF200 が TFIIE と共沈する一方で、BAF 複合体のサブユニットである BAF250 は TFIIE と共沈しなかった。また TFIIH のサブユニットである XPB および p62 が TFIIE と共沈した。これは PIC 形成時に TFIIE は TFIIH をプロモーターにリクルートする働きを持ち、特に TFIIE α 酸性領域と p62 PH ドメインの結合が強く、我々が共構造を報告していることとも一致する。また TFIIE と相互作用する因子を探索した時に、SWI/SNF 複合体のサブユニットだけでなく、TFIIH のサブユニットも含まれていた。これらのことから TFIIE は PBAF 複合体と直接または間接的に相互作用しており、TFIIH が関わる可能性が示された。

図1 ヒトTFIIEとSWI/SNF複合体の相互作用



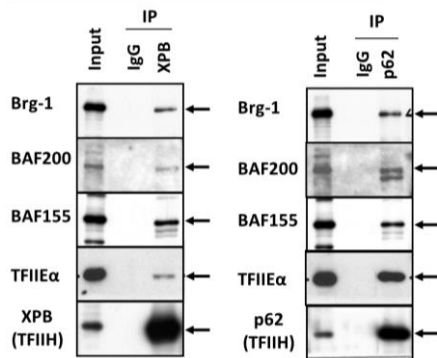
次に HeLa 細胞の核抽出液から SWI/SNF 複合体の各サブユニットの抗体を用いて、免疫沈降を行い、SWI/SNF 複合体と TFIIE または TFIIH の相互作用を検討した(図 2)。Brg-1 と Brm は ATPase 活性を有するサブユニットである。Brg-1 は TFIIE, TFIIH と共沈が検出された一方で、Brm は TFIIE と共沈せず、TFIIH とわずかに共沈した。BAF170, BAF155, BAF47 は TFIIE または TFIIH と共沈した。BAF200, および BAF180 は TFIIE と TFIIH が共沈した一方で、BAF250 は TFIIE, TFIIH とごくわずかに共沈した。このことより SWI/SNF 複合体の主に PBAF 複合体が TFIIE および TFIIH と相互作用することが分かった。また TFIIE よりも TFIIH の方が SWI/SNF 複合体とより強く相互作用すると考えられる。

図2 SWI/SNF 複合体と TFIIE, TFIIH の相互作用



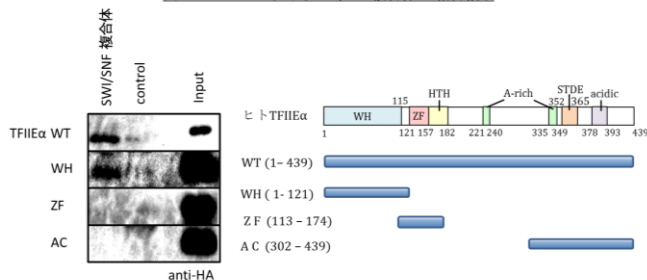
そこで TFIIH のサブユニットである XPB と p62 に対する抗体で HeLa 細胞の核抽出液から免疫沈降実験を行い、TFIIH と相互作用する因子をウエスタンブロット法で検出した(図 3)。Brg-1, BAF155 は XPB, および p62 のどちらの抗体で免疫沈降しても同程度共沈した。ところが TFIIE と BAF200 は XPB より p62 の抗体で免疫沈降を行った方がより多く共沈した。このことから TFIIE, TFIIH と PBAF 複体の相互作用は BAF200 が関わる可能性が示された。

図3 ヒトTFIIH と SWI/SNF 複合体の相互作用



さらに TFIIE α と SWI/SNF 複合体の相互作用領域を同定するために、HeLa 細胞株の核抽出液から抗 BAF170 抗体を用いて SWI/SNF 複合体を精製して、TFIIE α の 3 種類の欠失変異体と *in vitro* 結合実験を行った(図 4)。その結果、TFIIE α のウイングドヘリックス (WH) 領域が SWI/SNF 複合体との相互作用に関わることが分かった。

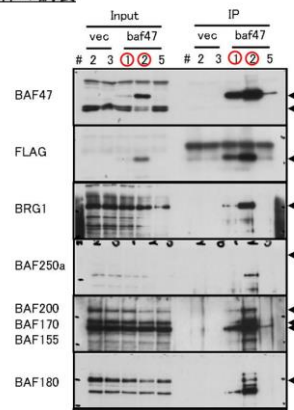
図4 ヒトTFIIEα における SWI/SNF 複合体の結合領域



(2) タグ付き BAF47 安定発現株の樹立

HeLa/BAF47-FLAG-SBP 安定発現株より調製した全細胞抽出液を用いて、anti-FLAG M2 アガロースで免疫沈降実験を行った(図 5)。その結果、BAF47-FLAG-SBP の発現量に依存して、SWI/SNF 複合体が精製された。

図5 BAF47-FLAG-SBP を利用した SWI/SNF 複体の調製

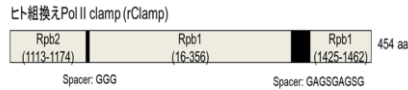


本解析から、細胞内で TFIIE と SWI/SNF 複合体は直接または間接的に相互作用し、SWI/SNF 複合体の中でも、BAF 複合体よりも主に PBAF 複合体と相互作用することが明らかとなった。また TFIIE α の基本転写活性に必要な領域である WH 領域が直接的に SWI/SNF 複合体と結合して機能する可能性が示された。その一方で TFIIH が SWI/SNF 複合体と直接または TFIIE を含めて相互作用して機能する可能性が示された。今後は樹立した細胞株より PBAF 複合体を精製して、immobilized template アッセイを行うことにより、SWI/SNF 複合体と基本転写因子 TFIIE および TFIIH との相互作用が PIC 形成や転写活性にどのように関わるのか評価を進める。

(3) ヒト組換え体 Pol II clamp (rClamp) 発現ベクターの作成

ヒト組換え体クランプ (rClamp) を作成するために、ユーロフィンジェノミクス株式会社で人工遺伝子を合成した。

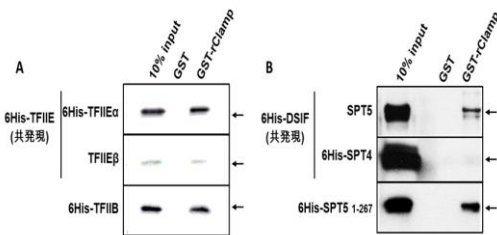
図6 ヒト組換え体clamp(rClamp)



(4) ヒト rClamp における基本転写因子と転写伸長因子の結合様式の検討

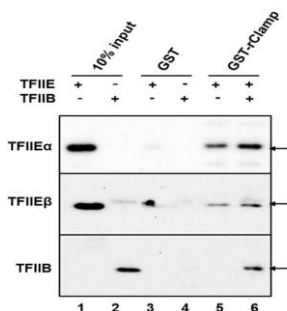
基本転写因子 TFIIE, または TFIIB と rClamp の相互作用、転写伸長因子 DSIF と rClamp の相互作用を調べるために、GST 融合 rClamp を用いた GST pull-down アッセイを行った (図 7)。TFIIE, TFIIB, DSIF はそれぞれ rClamp と結合した。

図7 TFIIE, TFIIB, XPB, DSIFはrClampと結合する



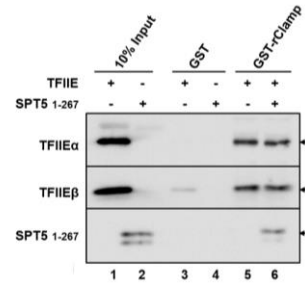
次に転写開始から伸長への移行段階で TFIIE は TFIIB と協調的に機能することから、TFIIE と TFIIB のクランプ上での結合様式を検討した (図 8)。その結果、TFIIB の添加により TFIIE の rClamp への結合が強まった。

図8 TFIIEはTFIIBによりrClampへの結合が強まる



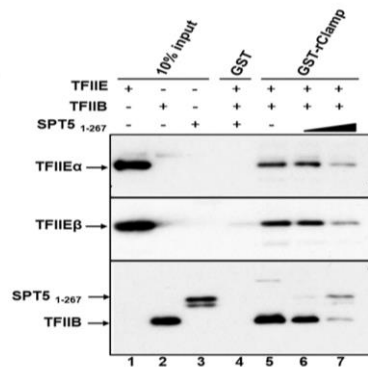
古細菌において RNA ポリメラーゼのクランプ上で TFE/TFIIE α と DSIF が競合することが報告されている。そこで TFIIE と DSIF の rClamp 上での結合様式を検討した (図 9)。その結果、SPT5₁₋₂₆₇ (RNA ポリメラーゼとの結合領域を含む欠変異体) の添加により TFIIE と rClamp の結合は変化しなかった。

図9 SPT5を添加してもTFIIEとrClampの結合は変化しない



転写初期段階における TFIIE, TFIIB, DSIF による Pol II クランプの制御を調べるために、TFIIE と TFIIB を rClamp と反応させて、そこへ SPT5₁₋₂₆₇ を添加したときの影響を検討した (図 10)。SPT5₁₋₂₆₇ の添加により、TFIIE と rClamp の結合への影響がほぼ見られない条件において、TFIIB と rClamp の結合が阻害された。さらに SPT5₁₋₂₆₇ の添加量を増やすと、TFIIB と rClamp の結合が大きく減少し、さらに TFIIE と rClamp の結合が低下した。

図10 SPT5はTFIIEとTFIIBのrClampへの協調的結合を阻害する



本解析から TFIIE の rClamp への結合は TFIIB により強まり、DSIF は TFIIE よりも TFIIB と rClamp の結合を阻害することで、TFIIE が rClamp から解離することが明らかとなった。これまでの解析で、RNA ポリメラーゼのクランプの動きは、Rpb4 と Rpb7 からなるストークの動きと連動すること、またストークにおいて TFIIE と DSIF が同じ領域に結合することが構造解析等で報告されている。今後は Pol II stalk における TFIIE と DSIF の解析を含めることで転写初期段階における Pol II の転写制御の分子機構の解明につながるかと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Kikuchi Y, Umemura H, Nishitani S, Iida S, Fukasawa R, Hayashi H, Hirose Y, Tanaka A, Sugawara K, Ohkuma Y. Human mediator MED17 subunit plays essential roles in

gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells*. 査読有、Vol.20, 2015, 191-202.

② Tanaka A, Akimoto Y, Kobayashi S, Hisatake K, Hanaoka F, Ohkuma Y. Association of the winged helix motif of the TFIIE α subunit of TFIIE with either the TFIIE β subunit or TFIIB distinguishes its functions in transcription. *Genes Cells*. 査読有、Vol.20, 2015, 203-216.

③ Yamamoto S, Hagihara T, Horiuchi Y, Okui A, Wani S, Yoshida T, Inoue T, Tanaka A, Ito T, Hirose Y, Ohkuma Y. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes Cells*. 査読有、Vol.22, 2017, 265-276.

[学会発表] (計 19 件)

① 林裕人、メダイエーター複合体と転写因子 BRD4 との機能的関連性の検討. 第 33 回日本生化学会北陸支部例会. 2015 年 5 月 23 日、富山大学 (富山県)

② 郭丹慧、基本転写因子 TFIIE による転写開始と伸長の制御機構の解析. 第 33 回日本生化学会北陸支部例会. 2015 年 5 月 23 日、富山大学 (富山県)

③ 大熊芳明、ヒトメダイエーター複合体による転写制御機構. 新学術領域研究「転写サイクル」転写サイクル合同班会議. 2015 年 8 月 3-5 日、ホテル暖香園 (静岡県)

④ 中村考秀、基本転写因子 TFIIE による転写開始から伸長への移行の制御機構解析. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 年 11 月 15 日、富山大学 (富山県)

⑤ 山本誠司、CpG オリゴ核酸による TLR9 を介した転写制御機構の解析. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会. 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑥ 中村考秀、基本転写因子 TFIIB と TFIIE による転写開始の制御機構. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会. 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑦ 田中亜紀、基本転写因子 TFIIE α winged helix 領域の機能解析. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会. 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑧ 菊地祐子、ヒトメダイエーター複合体 hMED17 サブユニットによる転写制御と DNA 損傷修復機能の解明. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会. 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑨ 秋元勇亮、転写コファクター PC4 と基本

転写因子 TFIIE の β サブユニットとの協調的な働き. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同年会. 2015 年 12 月 1-4 日、神戸国際会議場 (兵庫県)

⑩ Nakamura T, Functional analysis of archaeal DNA-binding protein Sso7d. The First International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network; 2016 Sep 12-13; Toyama, Japan

⑪ 林裕人、転写メダイエーター複合体と神経細胞分化の関係. 第 89 回日本生化学会大会; 2016 年 9 月 25-27 日、仙台 (宮城県)

⑫ 山本誠司、TLR9 活性化の際のメダイエーターキナーゼによる転写制御の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑬ 中村考秀、基本転写因子 TFIIE による転写開始から伸長への移行の制御機構解析. 第 39 回日本分子生物学会年会; 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑭ Ohkuma Y, Dynamic Switch Mechanism of RNA polymerase II by General Transcription Factor TFIIE from Transcription Initiation to the Transition Step from Intiation to Elongation. The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan; 2016 Nov 30-Dec 2; Yokohama.

⑮ 福岡瑞希、基本転写因子による転写開始から伸長への移行の制御機構解析. RNA ミーティング、2017 年 7 月 19-21 日、富山国際会議場 (富山県)

⑯ 大熊芳明、真核生物 RNA ポリメラーゼ II は転写初期段階に外側と内側からダイナミックな構造と機能の変化を誘起される. ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会)、2017 年 12 月 6-9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

⑰ 田中 亜紀、基本転写因子 TFIIE の転写開始から伸長への移行段階における役割の解析. ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会)、2017 年 12 月 6-9 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

⑱ 田中 亜紀、基本転写因子 TFIIE とクロマチン構造変換複合体による転写制御機構. 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、金沢 (石川県)

⑲ 平山 翼、基本転写因子による転写開始から伸長への移行の制御機構解析. 日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、金沢 (石川県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 亜紀 (TANAKA AKI)
富山大学・医学薬学研究部（薬学）・助教
研究者番号：50432109

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()