

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06654

研究課題名(和文) 基本転写因子によるRNAポリメラーゼIIの構造変換の分子機構の解析

研究課題名(英文) Regulatory mechanism analysis of structural transformation of RNA polymerase II by General Transcription Factor

研究代表者

田中 亜紀 (Tanaka, Aki)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：50432109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物RNAポリメラーゼII (Pol II) は、全てのタンパク質をコードする遺伝子を転写する酵素である。転写は開始・伸長・終結の3段階を経て進行する。各段階でPol IIを制御する因子群が異なっているが、それらの因子が転写中に滞ることなく、速やかに入れ替わる機構は不明である。本解析では、伸長段階で働く因子は、開始段階で働く因子を足場とすることで、速やかにPol IIに結合して、伸長段階でPol IIの活性を制御する可能性を検討した。また転写開始段階では基本転写因子のリン酸化によるPol IIからの解離を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後生生物では発生・分化や細胞刺激に応じて、RNAポリメラーゼIIが数万種にも及ぶ多様な遺伝子を適切に発現している。RNAポリメラーゼIIは多くの転写因子と結合して、その転写活性が制御されている。転写を開始する際に働く因子の一つである基本転写因子TFIIHは、RNAポリメラーゼIIをリン酸化することで転写が開始される。このTFIIHのリン酸化活性の阻害剤が癌細胞の細胞死を誘導するとして、抗がん剤候補として注目されている。しかしながら転写の初期段階の反応機構は不明な点が多く、本解析はこの反応機構の理解を助けるものである。

研究成果の概要(英文)：RNA polymerase II (Pol II) is an enzyme that transcribes all protein-coding genes. Transcription proceeds through three stages: Initiation, Elongation, and Termination. Although a different set of factors regulates Pol II in each step, the mechanism by which these factors are rapidly replaced during transcription is unknown. In this analysis, we investigated the possibility that the factors working in the elongation, by using the factors working in the initiation as scaffolds, rapidly bind to Pol II and regulate Pol II activity in the elongation. In the transcription initiation, dissociation from Pol II by phosphorylation of general transcription factor was also examined.

研究分野：医歯薬学

キーワード：基本転写因子 転写開始から伸長への移行 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は、全てのタンパク質遺伝子と一部の非コード RNA (ncRNA) 遺伝子を転写する。後生生物では数万種にも及ぶ多様な遺伝子を、発生・分化や細胞刺激に応じて適切に発現するために、Pol II は様々な転写因子と共同して転写をおこなう。転写は開始・伸長・終結の3段階を経て進行し、それぞれの段階で Pol II は異なる因子と結合し特異的な複合体を形成する。転写の開始段階と開始から伸長への移行段階は転写制御において最も重要な段階であるが、特に後者の分子メカニズムは不明な部分が多い。また近年のクライオ電子顕微鏡解析により、巨大複合体である転写開始複合体 (PIC) の全体構造や転写伸長型 Pol II 複合体の構造が決定されて、構造的な理解が進みだしているが、Pol II に直接結合して、その活性を制御する因子が入れ替わる分子機構は不明である。

2. 研究の目的

転写開始段階と伸長段階で Pol II と相互作用して活性を制御する因子群は、TFIIF を除いて異なっている。これらの因子群が転写中に滞ることなく速やかに入れ替わる機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基本転写因子と転写伸長因子 DSIF の相互作用の解析

Pol II は正確な位置から転写を開始するために、基本転写因子 (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH) とプロモーター上で転写開始複合体 (PIC) を形成することが必要である。一方、転写伸長段階では Pol II は転写伸長因子と相互作用して、その活性を制御している。転写初期段階で、PIC を足場として転写伸長因子 DSIF が Pol II にリクルートされる可能性を検討するために、基本転写因子と DSIF の相互作用の検討を行った。

(2) 基本転写因子 TFIIH のサブユニットである p62 と DSIF の相互作用の解析

PIC 形成時に、TFIIE のサブユニットにある酸性領域と TFIIH の p62 PH ドメインの相互作用を介して、TFIIE が TFIIH をプロモーターにリクルートするとされている。一方、DSIF は Spt5 と Spt4 の2つのサブユニットから構成されており、Spt5 の N 末端に酸性アミノ酸に富んだ領域が存在する。そこで Spt5 の酸性領域と p62 PH ドメインの相互作用を介して、転写初期段階の Pol II と基本転写因子からなる PIC に DSIF がリクルートされる可能性を検討した。

(3) TFIIH による TFIIE のリン酸化および *in vitro* 転写再構成系を用いた転写活性の評価

近年の Pol II と制御因子群からなる複合体の構造解析により、TFIIE と DSIF は Pol II の同じ領域 (クランプとストーク) に結合することが明らかとなっている。転写初期段階のわずかな時間で、Pol II と相互作用する因子が入れ替わるための制御の一つとして、TFIIE のリン酸化修飾を検討した。

4. 研究成果

(1) 基本転写因子と転写伸長因子 DSIF の相互作用の解析

大腸菌で発現した GST タグを融合した基本転写因子を構成する 16 種類のサブユニット (TFIIH を構成する 10 種類のサブユニット XPB, XPD, p62, p52, p44, p34, p8, Cdk7, Cyclin H, Mat1 および TFIIB, TBP, TFIIE, TFIIF, TFIIH) を調製して、His タグ融合ヒト DSIF (His-Spt4-Spt5) を用いて、GST pull-down アッセイにより相互作用解析を行った (図 1)。

DSIF は TFIIH のサブユニットである p62 と最も強く結合し、XPB とともに強く結合した。さらに CAK を構成する Cdk7, Cyclin H, Mat1 と結合した。TFIIH 以外の基本転写因子の中では、TFIIB と TFIIE と強く結合した。

TFIIH の p62 はリング状構造を有するコア TFIIH (XPB, XPD,

p62, p52, p44, p34, p8) の構造を安定化するために複数のサブユニットに広く結合する因子であり、N 末端に PH ドメインを有する。p62 PH ドメインは転写と DNA 修復に関わる様々な因子との相互作用が報告されており、このドメインは C 末側との間にリンカーがあり、コア TFIIH の表面で動きが取れることが、構造解析により示されている (Okuda M. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2021.)。一方、XPB は転写開始段階で二本鎖 DNA を開くトランスロカーゼ活性を有するサブユニットである。また TFIIH は基本転写因子の中で、唯一酵素活性 (キナーゼ活性、トランスロカーゼ活性、ATPase 活性) を有しており、Pol II の C 末端ドメイン (CTD) をリン酸化することで転

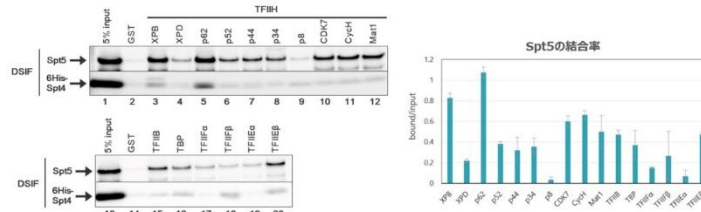


図1. 基本転写因子とDSIFの相互作用

写を制御することが知られている。さらに Pol II CTD 以外の他の基質に対して CAK が有するキナーゼ活性で機能することが報告されており、Spt5 もその一つである (Rimel JK *et al.*, *Genes Dev.*, 2020)。このことから DSIF と Cdk7, Cyclin H, MAT1 の直接相互作用はリン酸化制御に関わることが考えられる。

(2) 基本転写因子 TFIIH のサブユニットである p62 と DSIF の相互作用の解析

TFIIH と DSIF は Pol II の同じ領域 (クランプとストーク) に結合しており、TFIIH は 2 つのサブユニットからなり、DSIF は Spt5 と Spt4 の 2 つのサブユニットで構成されている。TFIIH と Spt5 には、真核生物特異的な酸性アミノ酸に富んだ領域 (酸性領域) が存在する。TFIIH の酸性領域は、TFIIH のサブユニットである p62 と強く結合し、TFIIH をプロモーターにリクルートする役割を持つ。一方、Spt5 の酸性領域の機能は不明である。転写初期段階において、p62 が Spt5 の酸性領域と結合することにより DSIF を Pol II へリクルートするという仮説を立て実験を行った。

p62 欠失変異体を用いた DSIF の相互作用領域の同定

大腸菌で発現した GST タグ融合 p62 野生型および 4 種類の欠失変異体 (PH ドメインを含む 3 種類の欠失変異体と PH ドメインを含まない 1 種類の欠失変異体) を調製して、His タグ融合ヒト DSIF (His-Spt4-Spt5) を用いて、GST pull-down アッセイにより相互作用解析を行った (図 2)。

DSIF は p62 野生型と強く結合し、p62 PH ドメインを含む欠失変異体と結合した。また p62 BSD ドメインを含む 2 種類の欠失変異体は、PH ドメインのみの欠失変異体 (1-108) よりも DSIF と強く結合した。一方 p62 PH ドメインを含まない欠失変異体は弱いながらも DSIF と結合した。これらの結果より、DSIF は p62 の PH ドメインと BSD ドメインの 2 つのドメインを介して相互作用すると考えられる。

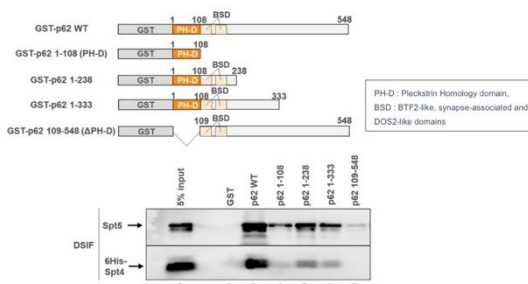


図2. TFIIH p62欠失変異体とDSIFの相互作用

Spt5 欠失変異体を用いた p62 の相互作用領域の同定

His タグ融合ヒト Spt5 野生型および 6 種類の欠失変異体が大腸菌で発現して精製し、GST タグ融合 p62 野生型または欠失変異体を用いて、GST pull-down アッセイにより相互作用解析を行った (図 3 および 4)。

Spt5 の酸性領域または NGN ドメインを欠失すると p62 PH ドメインとの結合が低下し、両方のドメインが欠失すると p62 PH ドメインとの結合が失われた (図 3)。また Spt5 の酸性領域のみ、NGN ドメインのみでも p62 と結合した (図 4)。これらの結果より、Spt5 は酸性領域と NGN ドメインの 2 つのドメインを介して、p62 と相互作用すると考えられる。

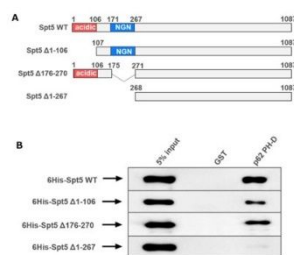


図3. Spt5欠失変異体とp62 PHドメインの相互作用

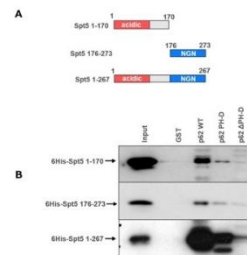


図4. Spt5 N末端とp62の相互作用

Spt5 と TFIIH の p62 PH ドメインにおける競合

GST タグ融合 TFIIH 酸性領域 (acidic) と FLAG タグ融合 p62 PH ドメインを結合させたところに、His タグ融合 Spt5 (酸性領域と NGN ドメインからなる変異体) を添加して、GST pull-down アッセイを行った (図 5)。TFIIH 酸性領域と p62 PH ドメインの結合は、Spt5 (1-267 番目アミノ酸領域) の添加により阻害された。

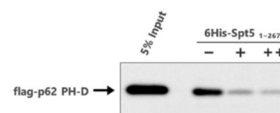


図5. Spt5はTFIIH酸性領域とp62PHドメインの結合を阻害する

転写初期段階で、PIC を構成する基本転写因子を足場として、転写伸長因子 DSIF が Pol II にリクルートされる可能性が示された。さらに DSIF のリクルートに TFIIH のサブユニットである p62 が関与する。TFIIH は PIC 内で転写開始点下流に位置しており、p62 を足場として DSIF が PIC に呼び込まれることで、転写反応を開始して DNA 上を進行する Pol II に DSIF が、滞ることなく速やかに開始因子と入れ替わることが可能である。近年、精製したタンパクを用いた生化学解析により、転写初期に起こる多段階の詳細な反応が報告された (Compe E. *et al.*, *Nat. Commun.*, 2019)。PIC が形成されて Pol II がリン酸化された後に、TFIIH と CAK (Cdk8, Cyclin H, MAT1) が PIC から解離する。その後、DNA 二本鎖が開裂するプロモーターオープニングを経て、転写が開始されると、コア TFIIH と TFIIH が PIC から除去される。これは TFIIH が他の基本転写因子より先に PIC から解離することで、p62 PH ドメインがフリーとなり、DSIF と相互作用

することが可能である。

(3) TFIIH による TFII E のリン酸化および *in vitro* 転写再構成系を用いた転写活性の評価

ヒト TFII E のリン酸化を検討するために、組換え体 TFII E および TFII E を基質とし、HeLa 細胞核抽出液および TFII H をキナーゼとして用いて試験管内リン酸化アッセイを行った(図 6)。TFII E および TFII E は HeLa 細胞核抽出液中に含まれるキナーゼによりリン酸化された(図 6A)。一方、TFII H をキナーゼとして用いた反応においても TFII E および TFII E はリン酸化された(図 6B)。

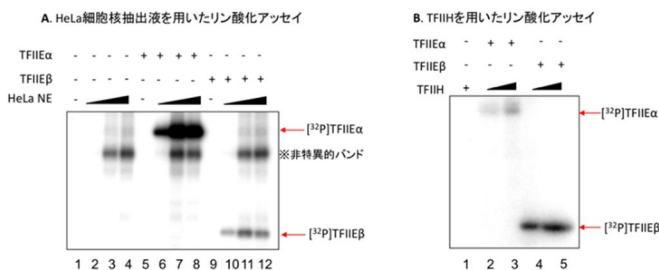


図6. 試験管内でヒトTFII EαおよびTFII Eβはリン酸化される

そこでヒト組換え TFII E 欠変異体を用いて、TFII H のリン酸化標的部位の検討を行った。その結果、TFII E 351 番目から 369 番目アミノ酸領域が、TFII H のリン酸化標的部位であることが分かった。この領域内の 365 番目セリンは CDK7 のリン酸化標的となりうる配列であり、以前に我々はヒト組換え TFII E 野生型および 2 つの点変異体 (S365A, S365E) を用いて解析を行っている (Okuda M, *et.al.*, *EMBO J.*, 2008)。TFII E 365 番目セリン残基は、*in vitro* 転写再構成系を用いた転写活性の評価により、転写開始段階ではなく、転写開始から伸長への移行段階での役割を持つことが明らかとなっている。しかしながら TFII E 365 番目セリン残基が TFII H のリン酸化標的であるのか、またリン酸化の意味に関しては今後の課題である。

試験管内リン酸化アッセイにおいて、TFII E は TFII H によりリン酸化されるが、CAK ではリン酸化されない (Rossignol M., *EMBO J.*, 1997.)。また Pol II は TFII H によりリン酸化されるが、他の転写因子は TFII H でリン酸化されず、CAK でリン酸化される。これらの報告から PIC が形成され、TFII H により Pol II がリン酸化されるタイミングで、TFII E がリン酸化されることが考えられ、PIC から TFII E および CAK が解離する引き金となることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryoya Kano, Ai Sugita, Soichiro Kuruma, Shiori Toyama, Shiho Ito, Hiroyasu Ishiguro, Aki Tanaka, Shinichiro Akichika, Tsutomu Suzuki, Yoshiaki Tabuchi, Yoshiaki Ohkuma, Yutaka Hirose
2. 発表標題 Regulation of gene expression by the phosphorylated CTD interacting factor PCIF1
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoya Kano, Ai Sugita, Soichiro Kuruma, Shiori Toyama, Shiho Ito, Hiroyasu Ishiguro, Aki Tanaka, Shinichiro Akichika, Tsutomu Suzuki, Yoshiaki Tabuchi, Yoshiaki Ohkuma, Yutaka Hirose
2. 発表標題 Regulation of gene expression by the phosphorylated CTD interacting factor PCIF1
3. 学会等名 6th Toyama-Basel Joint Syposium 2021 September 15-16
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中亜紀、依田ちづる、平山翼、廣瀬豊、大熊義明
2. 発表標題 RNAポリメラーゼIIによる転写開始から伸長への移行過程の制御機構解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神尾凌哉, 杉田愛, 車奏一朗, 外山詩織, 伊藤志帆, 石黒尋保, 田中亜紀, 穉近慎一郎, 鈴木勉, 田淵圭章, 大熊芳明, 廣瀬豊
2. 発表標題 リン酸化CTD結合RNAメチル化酵素PCIF1による遺伝子発現調節
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山皓介、前田将大、藤田智陽、安倍光姫、山崎愛実、深澤力也、田中亜紀、大熊芳明、廣瀬豊
2. 発表標題 メディエーター複合体キナーゼCDK8/19とクロマチン制御因子CHD3/4の相互作用を介した転写制御機構の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海戸優作、小黒真夢、原子空、林裕人、田中亜紀、大熊芳明、廣瀬豊
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体Kinaseモジュールの生化学的機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海戸 優作、原子 空、林 裕人、田中 亜紀、大熊 芳明、廣瀬 豊
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体Kinaseモジュールの生化学的機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中山 皓介、前田 将大、藤田 智陽、安倍 光姫、山崎 愛実、深澤 力也、田中 亜紀、廣瀬 豊、大熊 芳明
2. 発表標題 メディエーター複合体キナーゼCDK8/19はNuRDクロマチンリモデリング複合体サブユニットCHD3/4に結合する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海戸優作、原子空、丹澤円香、林裕人、藤田智陽、飯田智、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体 Kinaseモジュールの機能解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原子空、丹澤円、林裕人、藤田智陽、飯田智、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体Kinaseモジュールの機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田将大1、藤田智陽、安倍光姫、山崎愛実、深澤力也、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 メディエーター複合体キナーゼCDK8/19はNuRDクロマチンリモデリング複合体サブユニットCHD3/4に結合する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平山翼、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 転写伸長因子DSIFのPoI IIへのリクルートにおけるSpt5の酸性領域とp62の関与の検討
3. 学会等名 生化学会北陸支部第36回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原子空、丹澤円、林裕人、藤田智陽、飯田智、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体 Kinase モジュールの機能解析
3. 学会等名 生化学会北陸支部第36回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依田ちづる、平山翼、田中亜紀、廣瀬豊、大熊芳明
2. 発表標題 転写伸長因子DSIFのPoI IIへのリクルートにおけるSpt5酸性領域とTFIIH p62の関与の検討
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------