

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目： 若手研究(B)
研究期間： 2007～2008
課題番号： 19770090
研究課題名(和文) ヒト基本転写因子 TFIIE の全体構造解明に向けた NMR によるドメイン構造解析
研究課題名(英文) Structural analysis of domains from human general transcription factor, TFIIE for the determination of the complete structure.
研究代表者
奥田 昌彦 (OKUDA MASAHIKO)
横浜市立大学・国際総合科学研究科・特任助教
研究者番号：60448686

研究成果の概要：真核生物において、タンパク質をコードする遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼ II が行うが、開始時には基本転写因子と呼ばれる少なくとも 5 種類のタンパク質の助けが必要となる。本研究では、ヒト由来の基本転写因子 TFIIE と TFIIH に対して、これまで不明であった両者の相互作用ドメインを同定した。さらに、遊離状態と会合状態の両方の立体構造を核磁気共鳴 (NMR) 装置で決定し、認識機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,700,000 円	0 円	2,700,000 円
平成 20 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	300,000 円	4,000,000 円

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：構造生物学、転写、基本転写因子、タンパク質、立体構造、核磁気共鳴法

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、タンパク質をコードする遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) が行うが、自身では正常に開始することができず、少なくとも 5 種類の基本転写因子と呼ばれるタンパク質 (TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH) の助けが必要になる。これらのタンパク質が DNA のプロモーター領域に集合して転写開始前複合体が形成され、活性化後に転写が開始される。

ヒト由来の TFIIE は 439 アミノ酸残基、分子量約 50kDa の α サブユニットと 291 アミノ酸残基、分子量約 30kDa の β サブユニットからなる異種二量体である。ヒト由来の TFIIH は RNAPII と同様、巨大な分子であり、10 個のサブユニットからなる。RNAPII の活性化に必要な複数の酵素活性を有する。TFIIE は TFIIH をリクルートし転写開始前複合体を完成させる。TFIIH は酵素活性を用いて RNAPII を転写伸長可能な状態に活性化するが、この

時に TFIIE は TFIIH の酵素活性を制御する。このように TFIIE と TFIIH は協調しながら転写の開始、及び伸長へ遷移段階において重要な役割を果たす。

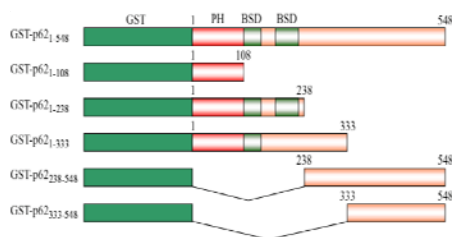
機能解析が進んでいる一方で、両者の相互作用に関しては、TFIIE α サブユニットの C 末領域の酸性アミノ酸残基に富んだ酸性 (Acidic: AC) ドメインが TFIIH の p62 サブユニットと相互作用することを示唆する結果が報告されているのみであり、詳細については不明であった。

2. 研究の目的

筆者はこれまで、ヒト TFIIE の全体構造解明を目的とし、両サブユニットのそれぞれのコアドメインの立体構造を核磁気共鳴 (NMR) 装置によって決定してきた。本研究では、ヒト TFIIE、及びヒト TFIIH の各相互作用ドメインを同定し、遊離状態、及び会合状態の立体構造を決定することにより、原子レベルで認識機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト TFIIE α AC ドメインを大腸菌発現系から調製した。また、ヒト TFIIH の p62 サブユニット、及び5つの欠損変異体の GST 融合タンパク質を大腸菌発現系から調製した。これらの試料を用いて GST-プルダウンアッセイを行い、相互作用領域を同定した。



(2) NMR 滴定実験により、TFIIE α の AC ドメインと TFIIH p62 の PH ドメインの結合部位の同定、結合のストイキオメトリー、及び解離定数を決定した。

(3) TFIIE α の AC ドメイン、及び TFIIH p62 の PH ドメインの非標識体、¹⁵N 標識体、及び ¹³C, ¹⁵N 標識体を大腸菌発現系を利用して調製した。これらの試料から、一方を標識体、

他方を非標識体の組み合わせで 1:1 比で混合し、4 種類の複合体を調製した。

(4) NMR 測定 of the optimal conditions was determined, and the following various multidimensional NMR measurements were performed.

- ① 主鎖シグナル帰属に用いた測定
CBCA(CO)NH, CBCANH, HN(CO)CA, HNCA, HN(CA)CO, HNCO
- ② 側鎖シグナル帰属に用いた測定
HBHA(CO)NH, HCCH-TOCSY, CCONH, HCCCONH, ¹⁵N-edited TOCSY-HSQC, DQF-COSY, TOCSY, (HB)CB(CGCD)HD, (HB)CB(CGCDCE)HE, CG(CB)H, CG(CD)H, CG(CDCE)H, HNHB, HN(CO)HB, HNCG, HN(CO)CG, ¹⁵N-edited NOESY-HSQC ($\tau_m=50$ ms), ¹³C-edited NOESY-HSQC ($\tau_m=50$ ms)
- ③ 分子内距離制限情報を得るための測定
NOESY, ¹⁵N-edited NOESY-HSQC ($\tau_m=50$ ms, 150ms), ¹³C-edited NOESY-HSQC ($\tau_m=50$ ms, 100ms).
- ④ 分子間距離制限情報を得るための測定
¹³C/¹⁵N filtered, ¹³C-edited NOESY ($\tau_m=120$ ms), ¹³C/¹⁵N filtered, ¹⁵N-edited NOESY ($\tau_m=150$ ms).
- ⑤ 二面角制限情報を得るための測定
HNHA, HNCA-J, HNHB, HN(CO)HB, HNCG, HN(CO)CG

(5) 各スペクトルを解析し、シグナルを帰属した。

(6) 水素原子間距離制限情報、二面角制限情報、及び水素結合情報を収集後、Xplor-NIH プログラムを用い、ディスタンスジオメトリー法により立体構造を計算した。初期構造に対し、精密化を繰り返した。最後に、水を考慮した精密計算を行い、TFIIE α の AC ドメインと TFIIH p62 PH ドメインとの複合体構造を決定した。

(7) 同様に、(4) ~ (6) の手順で、TFIIE α AC ドメインの単独構造を決定した。

4. 研究成果

(1) GST-プルダウンアッセイの結果、TFIIE α AC ドメインと TFIIH p62 の PH ドメインが特異的に結合することが分かった。

(2) それぞれのドメインの結合表面を NMR 法により調べた結果、TFIIE α AC ドメインは主に N 末のテール部、TFIIH p62 PH ドメインは第二 β シートで結合していた。

(3) 100mM NaCl 存在下にて NMR 滴定実験を行い解離定数を算出したところ、数百ナノモルオーダーであった。また、ストイキオメトリーは 1 : 1 であり、NMR 法で複合体として構造決定可能な強い結合であることが分かった。緩衝液の NaCl 濃度を下げるとさらに結合が強まった。

(4) TFIIE α AC ドメインの単独構造、及び p62 PH ドメインとの複合体構造を NMR 装置により決定し、詳細な認識機構を明らかにした。

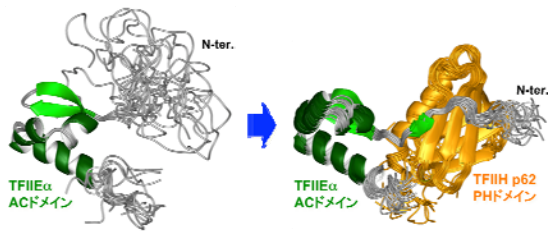


図1. TFIIE α ACドメインの単独構造(左)、及びTFIIE α ACドメインとp62 PHドメインとの複合体構造(右)

AC ドメインの酸性アミノ酸が連続した N 末テールは、未結合時には全く構造をとらない天然変性状態であったが、結合時には β ストランドを含む構造が誘起され、PH ドメインの塩基性表面に広く巻き付いていた (図 1)。ここでは、数多くの静電的相互作用が見られた (図 2)。

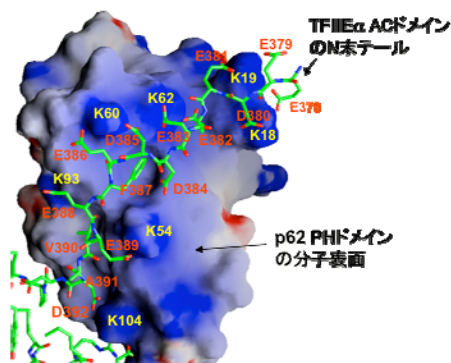


図2. TFIIE α ACドメインのN末テールがp62 PHドメインの塩基性表面に巻き付いている様子

N 末テールの酸性残基に挟まれたフェニルアラニン、及びバリン残基は、PH ドメインの分子表面の 2 カ所の窪みにそれぞれ入り込んでいた (図 3)。

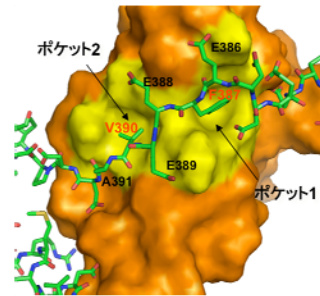


図3. TFIIE α ACドメインのN末テールの2つの酸性残基、E387、およびV390がp62 PHドメインの分子表面にある2つの深い窪み(ポケット)に入り込んでいる様子

また、N 末テールに加えて、コア構造も結合に寄与していた (図 4)。

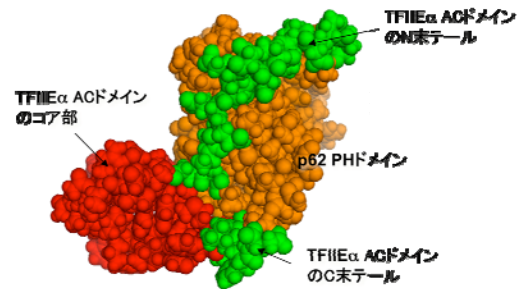


図4. TFIIE α ACドメインのN末テールに加えてコア部も結合に参与する

がん抑制因子 p53 や単純ヘルペスウイルス VP16 の酸性転写活性化ドメインも p62 PH ドメインと結合するが、TFIIE α の AC ドメインはそれらとは全く異なる新規の結合様式であった。興味深いことに、p62 PH ドメイン上の結合部位の一部が重なり合うことから、転写活性化時での転写活性化因子から基本転写因子 TFIIE への p62 PH ドメインの受け渡し機構を提案した (図 5)。

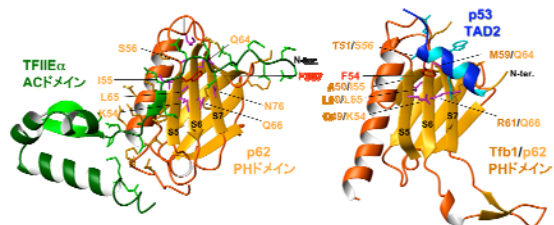


図5. TFIIE α ACドメインとp62 PHドメインの複合体構造(左)、及びがん抑制因子p53のTAD2とp62 PHドメインの複合体構造(右)；Tfb1/p62の構造番号2Y29

本研究の成果は、TFIIE-TFIIH 相互作用構造決定として世界初であり、ヒト TFIIE の全体構造解明へ大きく前進させ、また現在世界中で推し進められている転写開始複合体構造決定への有益な情報を提供する。

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 5 件)

- ① Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y., Nishimura, Y.
Structural insight into the TFIIE/TFIIH interaction: TFIIE and p53 share the binding region on TFIIH.
EMBO J. 27, 1161-1171 (2008)
- ② 奥田昌彦、西村善文
「基本転写因子 TFIIE の構造と TFIIH との相互作用」
生化学 特集号 80, 501-510 (2008)
- ③ Shimojo, H., Sano, N., Moriwaki, Y., Okuda, M., Horikoshi, M., Nishimura, Y.
Novel structural and functional mode of a knot essential for RNA binding activity of the Esal presumed chromodomain.
J. Mol. Biol. 378, 987-1001 (2008)
- ④ Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Okuda, M., Ohkuma, Y., Nishimura, Y.,
Structural characterization of human general transcription factor TFIIF in solution.
Protein Sci. 17, 389-400 (2008)
- ⑤ Okuda, M., Horikoshi, M., Nishimura, Y.
Structural polymorphism of chromodomains in Chd1.
J Mol Biol. 365, 1047-1062 (2007)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y., Nishimura, Y.
NMR Studies on the Interaction between the General Transcription Factors, TFIIE and TFIIH
XXIIIrd ICMRBS Conference
2008. 8. 26
米国、カリフォルニア州、サンディエゴ、シェラトンホテル
- ② 奥田昌彦、田中亜紀、佐藤真奈美、水田翔子、高澤学、大熊芳明、西村善文
「ヒト基本転写因子 TFIIE α の酸性ドメインとヒト基本転写因子 TFIIH p62 の PH ドメインとの複合体の溶液構造」
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会
2008. 12. 10
兵庫県神戸市、神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 昌彦 (OKUDA MASAHIKO)
横浜市立大学・大学院国際総合科学研究科・特任助教
研究者番号：60448686

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし