

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20370071

研究課題名（和文）基本転写因子 TFIID を介した転写開始反応及びその調節機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of transcriptional initiation and regulation mediated by general transcription factor TFIID

研究代表者

古久保 哲朗 (KOKUBO TETSURO)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：10271587

研究成果の概要（和文）：

基本転写因子 TFIID がコアプロモーター配列（CE）を認識し、特定の塩基対から転写を誘導する分子機構の詳細は未だ不明である。我々は出芽酵母の *RPS5* コアプロモーターに関して詳細な解析を行い、少なくとも9個以上のA,Tに富む短い塩基配列がCEとして機能することを明らかにした。また各CEには配列特異性はなく、転写の方向性についてもその特異性は低いものであった。しかしながら全体をセットとした場合には強い転写方向性を示したことから、これらのCEは複数個が協調的に働くことでTFIIDの認識配列としての機能を発揮するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In eukaryotes, protein-coding genes are transcribed by RNA polymerase II (pol II) together with general transcription factors (GTFs). TFIID, the largest GTF composed of TATA element-binding protein (TBP) and 14 TBP-associated factors (TAFs), plays a critical role in transcription from TATA-less promoters. In metazoans, several core promoter elements other than the TATA element are thought to be recognition sites for TFIID. However, it is unclear whether functionally homologous elements also exist in TATA-less promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. Here, we identify the cis-elements required to support normal levels of transcription and accurate initiation from sites within the TATA-less and TFIID-dependent *RPS5* core promoter. Systematic mutational analyses show that multiple AT-rich sequences are required for these activities and appear to function as recognition sites for TFIID. A single copy of these sequences can support accurate initiation from the endogenous promoter, indicating that they carry highly redundant functions. These results show a novel architecture of yeast TATA-less promoters and support a model in which pol II scans DNA downstream from a recruited site, while searching for appropriate initiation site(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写調節、転写因子、基本転写因子、転写開始、出芽酵母、TFIID、TAF、TBP

1. 研究開始当初の背景

すべての生命現象に必要な遺伝情報がプログラム通りに正しく発現することにより支えられている。それゆえ情報発現を司る基本的な仕組みである「転写」は、分子生物学の中心的課題として常に注目を集めてきた。TATAボックス/イニシエーター等のコアプロモーター構造を認識する基本転写因子TFIID (TBP; TATA box-binding proteinと14種類のTAFs; TBP-associated factorsから構成されるタンパク質複合体)は、転写開始前複合体(PIC; pre-initiation complex)のアッセンブリーに際して核となる分子であり、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。我々はこれまで主に出芽酵母を用いてTAFsの生体内機能について解析を進めてきたが、その過程でTAF1のN末端に存在するTBP機能阻害領域(TAND; TAF N-terminal domain)が、TFIIDによる転写活性化の分子スイッチとして機能することを見出し、“二段階ハンドオフモデル”と呼ぶ転写活性化の分子モデルを新たに提案した。このモデルでは、転写活性化ドメインがTANDの構造を分子的に擬態することによってTAND-TBP間の負の相互作用を解除し、最終的にはTBPをTATAボックスに送り込むことにより転写を活性化すると考えているが、その詳細については未だ不明な点が多い。

一方、TFIIDが転写開始点を正しく選択する分子機構については、これまで他の研究グループを含め、世界的に見ても有用な知見はほとんど得られていない。出芽酵母の場合、2004年にTATAボックスのコンセンサス配列が初めて決定されたが、それ以外のコアプロモーター配列(CE; core promoter element)に関する知見はほとんど存在せず、TFIIDがTATA-lessプロモーターをどのようにして認識するのかは依然として大きな謎である。また出芽酵母の場合、TATAボックスと転写開始点の距離は遺伝子ごとに様々であり(40~120 bp)、一定の距離(~25 bp)から転写が始まる動物細胞とは好対照を成すが、この種間の差を明確に説明し得る分子モデルは未だ存在しない。上記の背景のもと、TFIIDによって認識されるCE配列の同定を主たる目的として本研究を進め、所定の成果を得たので以下に報告する。

2. 研究の目的

基本転写因子TFIIDは、TATAボックス結合

タンパク質(TBP)と14種類のTBP随伴因子(TAFs)から構成されるタンパク質複合体であり、①コアプロモーター結合能(正しい位置から転写を開始させる能力)及び②転写活性化能(転写調節因子に応答して転写量を調節する能力)を有する。真核細胞においてこれらの両機能を有する因子はTFIIDのみであることから、その作用機序の解明は極めて重要と考えられる。そこで本研究では、TFIIDによって認識される新規CE配列の同定を行うとともに、ゲノムワイドなChIP-chip解析を通じてコアプロモーター結合における各種TAFの役割について新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母株の作製と培養

PCR法により増幅したDNA断片(栄養要求性を相補する遺伝子もしくは各種薬剤耐性遺伝子を含む)を直接出芽酵母細胞に形質転換することにより、目的の出芽酵母株(以下酵母株)を作製した。必須遺伝子を欠失する酵母株を作製する場合には、プラスミドシャフリング法を用いた。作製した酵母株の培養は、YPD, SC, SD液体培地もしくは同寒天培地を用いて行った。

(2) ノザンプロット解析

ホットフェノール法により全RNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動により分離後、ニトロセルロース膜にトランスファーした。各種プローブをランダムプライム法により³²P標識し、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後イメージングプレートに感光させ、BAS2500(富士フィルム)を用いてシグナルの検出・定量を行った。

(3) プライマー伸長法

ホットフェノール法により抽出した全RNA画分もしくは試験管内で生成した転写反応産物に対して³²P標識したプライマーを添加し、AMV reverse transcriptase XLによる逆転写反応を行った。逆転写産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500を用いてシグナルの検出・定量を行った。

(4) 試験管内転写反応

Wontnerらの開発した定法(1991)に従い、ガラスビーズを用いて細胞を破碎後、試験管内転写反応に適した細胞破碎液を調製した。ストレプトアビジンビーズ上にビオチン化

した DNA を固定化し、それを鋳型とする immobilized template assay 法を用いて、転写と PIC 形成過程の解析を行った。具体的にはプライマー伸長法により転写産物を定量するとともに、イムノプロット法により鋳型 DNA 上の各種転写因子の結合量を調べた。

(5) ChIP-chip 解析

各種転写因子をコードする遺伝子 (ORF) の C 末端側に HA もしくは PK エピトープタグを複数付加した酵母株を多数作製し、ホルムアルデヒド処理により転写因子と DNA を架橋後、クロマチン免疫沈降実験を行った。回収した DNA 画分を Katou らの開発した定法 (2003) に従い増幅後、アフィメトリックス社製の DNA チップにより解析し、ゲノムワイドな転写因子結合部位の同定を行った。

4. 研究成果

(1) メディエーター複合体サブユニット Med9p の機能解析 (論文⑦)

我々は TAND の標的遺伝子 (*taf1ΔTAND* 株において有意に発現量が低下する遺伝子) の一つとして *HIS4* を同定し、詳細なシストランス解析を行った結果、*HIS4* コアプロモーター上に結合した TAND 欠損型 TFIID は、転写調節因子 BAS1 からの転写活性化シグナルを正常に受け取ることができないことを見出した。そこで、同様の性質を有する可能性が示唆されていた Med9p についても詳細な変異体解析を行い、酵母の生育・*in vivo/in vitro* 転写に各々必要な領域を決定した。興味深いことに、*Δmed9* 株由来の細胞破碎液では転写調節因子非依存的な TBP のプロモーター結合が観察されたが、野生株由来の細胞破碎液からメディエーター複合体を特異抗体により除去した場合には同様の現象は見られなかった。従って *Δmed9* 株では *in vitro* において TBP の恒常的なプロモーター結合を誘起する何らかの未知の因子が発現しているものと考えられる。

(2) 全 TFIID サブユニットのゲノムワイドな局在解析 (論文④)

第三、四、五、六染色体を約 200bp の高解像度で網羅したタイリングアレイを用いて、TFIID の全サブユニット (TBP, Taf1-14) 及び基本転写因子群 (TFIIB, E, F, H), NC2, Mediator, SAGA の一部のサブユニットについて ChIP-chip 解析を行い、①TFIIB と NC2 の結合プロファイルは互いによく似ていること、②(Taf1, Taf7), (Taf11, Taf13) のプロモーター結合プロファイルは () 内のメンバー間

において互いによく似ていること、③TFIID はほぼ全てのプロモーター上に結合していること、④TFIID の機能は SAGA のプロモーター結合に不要であること、⑤*taf1* 変異は Taf2 のプロモーター結合にのみ正に作用し、他 Tafs のプロモーター結合には負に作用すること、⑥プロモーター (の種類) ごとに TFIID は異なるコンフォーメーションを取る可能性が高いこと、⑦SAGA と TFIID のプロモーター結合は互いに排他的ではないこと、⑧TFIIF は pol II とともに ORF 内に進入することはなくプロモーター上にとどまること等を新たに示した。また⑦の知見に基づき、複数のリボソームタンパク質遺伝子について、sequential ChIP assay を行ったところ、少なくともこれらのプロモーターには、SAGA と TFIID が同時に結合していることが示された。この結果は、「TFIID と SAGA には役割分担がある (TFIID が TATA-less プロモーターを転写し、SAGA が TATA 含有プロモーターを転写する)」という従来の概念が必ずしも正しくないことを示している。

(3) mRNA 結合タンパク質 Ssd1p の機能解析 (文献③)

taf1-N568Δ 株 (我々自身が単離した温度感受性 *taf1* 変異株) と *taf1-ts2* 株 (他の研究グループが単離した温度感受性 *taf1* 変異株) の比較を行い、*CLN2* の転写阻害が後者においてのみ強く起こることを見出した。またこの違いは両株の有する *SSD1* アレルの違い (*SSD1-V* vs. *ssd1-d*) に起因することを見出し、詳細な解析から Ssd1p は①TFIID 依存的な *CLN2* 転写の促進、②SAGA 依存的な *CLN2* 転写の促進、③*CLN2* mRNA の安定化の三者に参与していることを明らかにした。

(4) *RPS5* 遺伝子の TATA-less プロモーターにおけるシス配列解析 (文献②)

出芽酵母の場合、全遺伝子のうち約 80% が TATA-less プロモーターにより転写されているにもかかわらず、TATA ボックス以外の機能性 CE (core promoter element) の実体は不明である。そこで代表的な TATA-less 遺伝子である *RPS5* のコアプロモーターに関して詳細な機能解析を行い、本コアプロモーターには少なくとも 9 個以上の A, T に富む短い塩基配列 (各々が 4-6 ヌクレオチドから構成される) が重複した機能を有する CE として含まれていることを明らかにした (図 1)。また各 CE には配列特異性はなく (ただし AT-rich であることが重要)、転写の方向性についてもその特異性は低いものであった。しかしながら全体 (9 個) をセットとした場合には強

い転写方向性を示したことから、これらの CE は複数個が協調的に働くことで TFIID の認識配列としての機能を発揮するものと考えられる。

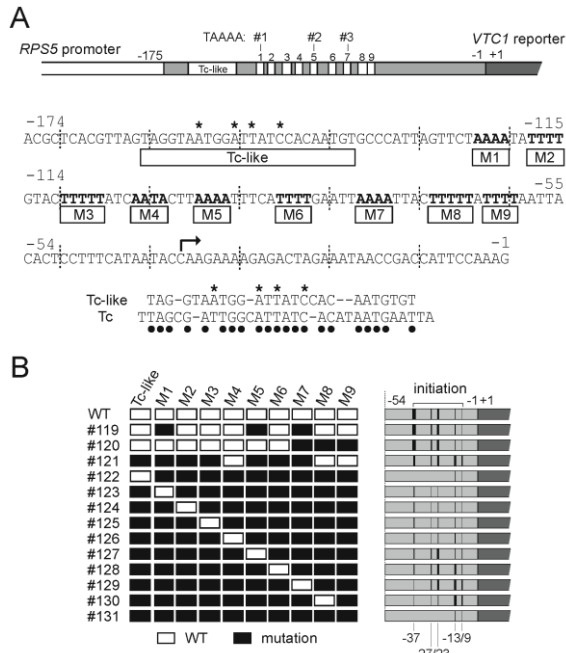


図 1. 出芽酵母 *RPS5* コアプロモーター中に存在する複数の CE の同定。(A, top) レポーター遺伝子 *VTC1* (開始コドン ATG を +1 として表示) に連結した *RPS5* プロモーター (-174 ~ -1 bp がコアプロモーター領域に相当) の模式図。(A, middle) *RPS5* コアプロモーター領域の塩基配列 (右向きの矢印は転写開始部位)。今回同定した複数の AT-rich な CE を M1 ~ M9 として、また *HIS3* の Tc 配列に相同性を示す領域を Tc-like として示した。(A, bottom) Tc-like 配列と Tc 配列間の相同性を示すアラインメント。両者で一致する塩基を下部に黒丸で示した。(B, left) Tc-like 配列もしくは M1 ~ M9 に変異 (黒四角) を有するコンストラクトの模式図。WT (白四角) は変異を持たない野生型を意味する。(B, right) 各コンストラクトにおける転写活性のまとめ。縦黒棒の位置は転写開始点を、またその太さは各転写開始点における転写量を示す。

(5) TAND と相互作用する転写因子 Hmo1p の機能解析 (文献①)
 cytotrap 法により TAND と相互作用する因子として Hmo1p を同定し、詳細な機能解析を行った。その結果、①TFIID の標的遺伝子として最大のグループを構成するリボソームタンパク質遺伝子計 138 個のうち 97 個の転写に直接関与すること、②TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIF, RNA ポリメラーゼ II と遺伝学的に相

互作用すること、③ゲノム全体では 483 個の標的遺伝子を有すること、④Rap1p, Fhl1p とはゲノム全体で各々 46%, 64% の標的遺伝子を共有すること、⑤*hmo1Δ* 株において一部の Hmo1p 標的遺伝子の転写開始点が上流側にシフトすること、⑥この転写開始点のシフトは転写開始前複合体 (PIC) の形成位置のシフトに起因すること、⑦Hmo1p は転写開始点近傍に存在する 2 個のヌクレオソーム (-1, +1) に挟まれた領域 (IVR) に結合すること、⑧Hmo1p は IVR への結合を介して正しい部位上の PIC 形成を誘導すること、⑨Hmo1p とヌクレオソーム (-1, +1) のプロモーター結合には相互依存性がないこと等を明らかにした。

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 7 件)

- ① K. Kasahara, Y. Ohyama, T. Kokubo ; Hmo1 directs preinitiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region.; *Nucleic Acids Res.*, vol.39, No.10, 4136-4150 (2011) 査読有
- ② F. Sugihara, K. Kasahara, T. Kokubo; Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less *RPS5* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*.; *Nucleic Acids Res.*, vol.39, No.1, 59-75 (2011) 査読有
- ③ Y. Ohyama, K. Kasahara, T. Kokubo; *Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes *CLN2* expression by binding to the 5'-untranslated region of *CLN2* mRNA ; *Genes to Cells*, vol.14, No.1, 53-67 (2010) 査読有
- ④ K. Ohtsuki, K. Kasahara, T. Kokubo ; Genome-wide localization analysis of a complete set of Tafs reveals a specific effect of the *taf1* mutation on Taf2 occupancy and provides indirect evidence for different TFIID conformations at different promoters.; *Nucleic Acids Res.*, vol.38, No.6, 1805-1820 (2010) 査読有
- ⑤ A. Yamazaki, S. Ki, T. Kokubo, M. Yamaguchi; Structure-function correlation of micro1 for micromere specification in sea urchin embryos.; *Mech. Dev.*, vol.126, No.8-9, 611-623 (2009) 査読有

⑥ Y. Tateishi, M. Ariyoshi, R. Igarashi, H. Hara, K. Mizuguchi, A. Seto, A. Nakai, T. Kokubo, H. Tochio, M. Shirakawa; Molecular basis for SUMOylation-dependent regulation of DNA binding activity of heat shock factor 2.; *J. Biol. Chem.*, vol.284, No.4, 2435-2447 (2009) 査読有

⑦ H. Takahashi, K. Kasahara, T. Kokubo ; *Saccharomyces cerevisiae* Med9 comprises two functionally distinct domains that play different roles in transcriptional regulation.; *Genes to Cells*, vol.14, No.1, 53-67 (2009) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① F. Sugihara, K. Kasahara, T. Kokubo; Identification of novel core promoter elements within the TATA-less *RPS5* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*.; Keystone Symposia “Dynamics of Eukaryotic Transcription during Development”. 2010.4.10., Big Sky Resort, Montana, USA

② Y. Ohyama, K. Kasahara, T. Kokubo; Deletion of the N-terminal domain of *TAF1* (*taf1-ΔTAND*) exhibits synthetic lethality with mutations of the RAM signaling network in budding yeast.; 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.9., 横浜

③ 笠原浩司、奇世媛、青山佳世、高橋宏之、古久保哲朗；出芽酵母の HMGB ファミリータンパク質 HMO1 によるリボソームタンパク質遺伝子の転写開始点決定機構；BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会 & 第 81 回日本生化学会大会) 2008.12.9., 神戸

④ 小林晶子、大槻和重、白髭克彦、古久保哲朗；出芽酵母 BEM4 に見出された転写因子としての新たな機能；BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会 & 第 81 回日本生化学会大会) 2008.12.9., 神戸

⑤ 大槻和重、笠原浩司、白髭克彦、古久保哲朗；TFIID サブユニットのゲノムワイドなプロモーター結合解析；BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会 & 第 81 回日本生化学会大会) 2008.12.10., 神戸

⑥ K. Kasahara, K. Ohtsuki, S. Ki, K. Aoyama, H. Takahashi and T. Kokubo; Molecular function of HMO1 at ribosomal protein gene promoters.; 内藤コンファレンス/Nuclear Dynamics and RNA [I] 2008.6.25., 八ヶ岳

[その他]

ホームページ等

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/dmcb/index2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古久保 哲朗 (KOKUBO TETSURO)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号：10271587

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし