

機関番号：22701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21770121
 研究課題名（和文） ヒト基本転写因子TFIIEの完全長複合体のNMR法による立体構造解析
 研究課題名（英文） NMR structural analysis for the whole structure of human general transcription factor, TFIIE.
 研究代表者
 奥田 昌彦（OKUDA MASAHIKO）
 横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・特任助教
 研究者番号：60448686

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質をコードする遺伝子の転写の開始に必要な基本転写因子群の一員であるTFIIEの完全長複合体の構造を核磁気共鳴法(NMR)により解析した。ヒトTFIIEは α と β からなる異種二量体ある。約8万の高分子量に加え凝集しやすい性質の為、解析は困難であったが、最新技術を駆使したことにより、三つの機能ドメインの構造状態、広範囲に渡る天然変性領域の存在、及び動的挙動を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study was the NMR structural analysis for the whole structure of human TFIIE, a member of the general transcription factors, needed for the initiation of transcription for protein coding genes. Human TFIIE is a heterodimer, consisting of an alpha and a beta subunit. Although the tendency to aggregate besides the high molecular weight (~80kDa) made the structural analysis difficult, full use of the latest NMR technologies enabled to gain structural information on three functional domains, identify widely existing intrinsically disordered regions and reveal the dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

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が行うが、自身では転写を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(TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF、TFIIH)と呼ばれるタ

ンパク質の助けが必要とされる。これらのタンパク質が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る。TFIIBを除き全て複数のサブユニットから構成されているため、転写開始前複合体は極めて複雑な構

造である。従って、その原子レベルでの構造解析は膨大な時間と労力を要す大変困難な研究になることは容易に想像されるが、転写開始機構を詳細に理解するためには不可避であり、現在世界中で勢力的に研究が進められている。

ヒト TFIIE は約五万の α サブユニットと約三万の β サブユニットからなる約八万の異種二量体である (図 1)。



図 1 ヒト基本転写因子 TFIIE

通常このような高分子量の立体構造解析は X 線結晶回折法が用いられるが、会合しやすい性質等のため結晶化がうまく行かず、解析の見通しが立たない状況にある。そのため、私は機能上重要である三つのドメイン (TFIIE α 、および β のコアドメイン、TFIIE α の酸性ドメイン) を単離し、それらの構造を NMR 法により決定してきた (図 2~5)。



図 2 ヒト TFIIE α のコアドメインの構造



図 3 ヒト TFIIE α の酸性ドメインの構造

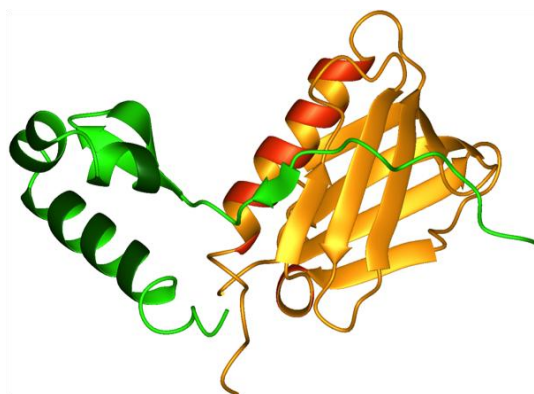


図 4 ヒト TFIIE α の酸性ドメインとヒト TFIIE β の p62 の PH ドメインとの複合体構造

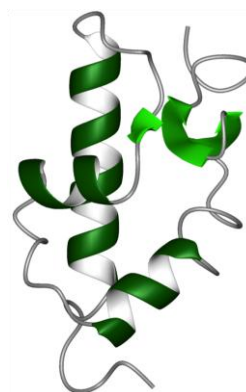


図 5 ヒト TFIIE β のコアドメインの構造

2. 研究の目的

本研究では、TFIIE の完全長複合体の立体構造を NMR 法で解析し、特にこれまでに単離して決定した三つのドメインの構造が複合体中でどのような構造であるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TFIIE の完全長複合体は、大腸菌の共発現系より調製した。 ^{13}C , ^{15}N 安定同位体標識に加え、最大感度を得るために 100% ^2H 標識体も調製した。

(2) TFIIE は会合しやすい性質のため、緩衝液、pH、塩濃度、試料濃度、および NMR 測定温度等を検討し、最適化条件を決定した。

(3) 種々の多次元 NMR 測定を行った。

- 1) 主鎖シグナルの帰属に用いた測定

TROSY-HN(CO)CACB,	TROSY-HNCACB,
TROSY-HN(CO)CA,	TROSY-HNCA,
TROSY-HN(CA)CO,	TROSY-HNCO

- 2) 側鎖シグナルの帰属に用いた測定
 HBHA(CO)NH, CC(CO)NH, H(CC)(CO)NH,
¹⁵N-edited NOESY-HSQC,
¹³C-edited NOESY-HSQC

(4) スペクトルを解析し、主鎖シグナル、および側鎖シグナルを帰属した。

(5) 同条件にて、TFIIE α のコアドメイン、TFIIE α の酸性ドメイン、およびTFIIE β のコアドメインのNMR測定を行い、完全複合体のそれぞれの構造を、周囲の環境を敏感に反映する化学シフトから比較した。

(6) TFIIEの完全長複合体に対し、¹⁵Nスピンの縦緩和速度(R1)、横緩和速度(R2)、¹⁵N-¹H定常状態核オーバーハウザー効果(NOE)を測定し、主鎖構造のナノ秒からピコ秒程度の速い内部運動を調べた。

4. 研究成果

(1) 高分子量で凝集しやすいTFIIE完全長複合体であったが、緩衝液の最適化、²H, ¹³C, ¹⁵N安定同位体標識、クライオプローブが実装された800MHz高磁場NMR装置と高分子量用に改良した測定法との組み合わせ等により、観測された主鎖シグナルのうち、約84%を帰属した(図6)。安定な構造形成を示す分散したシグナルについてはほぼ全て帰属した。

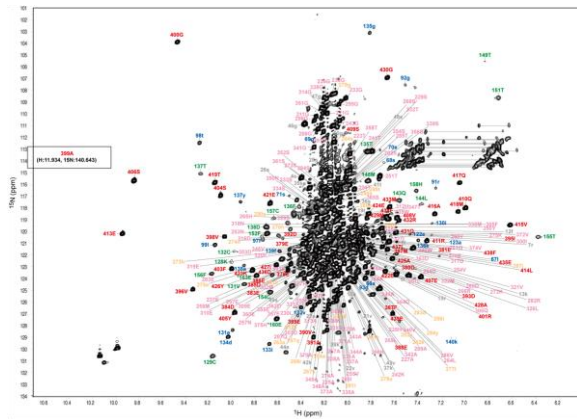


図6 TFIIE完全長複合体の2次元TROSYスペクトル

(2) TFIIE完全長複合体の化学シフトを、構造が決定されている各ドメインの化学シフトと比較した(図7-9)。その結果、どのドメインとも化学シフト差は非常に小さく、それぞれのドメインは全長においても同様の構造を保持し独立して存在していることが分かった。

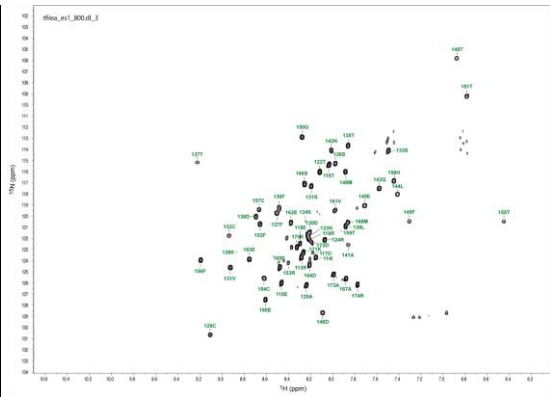


図7 TFIIE α のコアドメインの2次元TROSYスペクトル

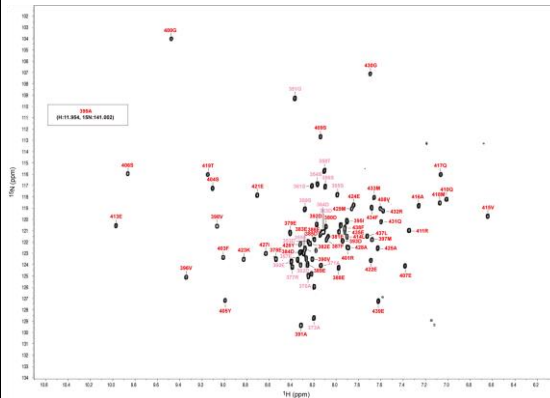


図8 TFIIE α の酸性ドメインの2次元TROSYスペクトル

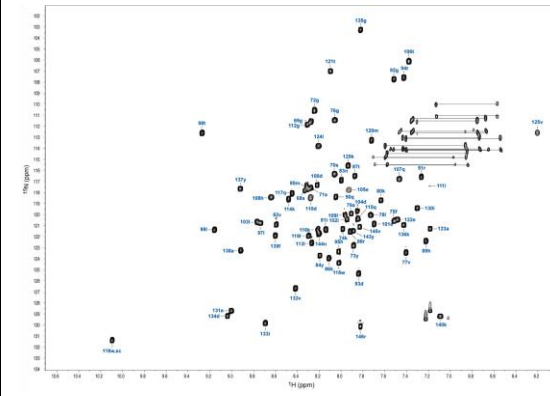


図9 TFIIE β のコアドメインの2次元TROSYスペクトル

(3) TFIIE完全長複合体に対し¹⁵NスピンのR1、R2、¹⁵N-¹HNOEを測定した結果、領域によって運動性が大きく異なることが明らかとなった。また、広範囲に渡る数カ所の天然変性領域を同定した。

本研究は、TFIIEの完全長複合体の静的お

よび動的構造解析として初の試みであり、世界に先駆けて全長構造の存在様式を明らかにすることができた。本研究の成果は、TFIIE の構造のみならず、転写開始前複合体構造の解明へ大きく歩を進める。

5. 主な発表論文等
〔学会発表〕(計7件)

(1) 西村善文, 奥田昌彦
NMR STRUCTURE OF A GENERAL TRANSCRIPTION FACTOR TFIIE
XXIVth ICMRBS(International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems)
2010.8.22 - 2010.8.27
ケアンズ、ケアンズコンベンションセンター
(オーストラリア)

(2) 長土居有隆, 奥田昌彦, 明石知子, 西村善文
転写制御因子、ピストン修飾因子の構造生物学
ターゲットタンパク研究プログラム基本生命 WG 班会議
2010.3.16 - 2010.3.17
新神戸(兵庫県)

(3) 田中垂紀, 水田翔子, 奥田昌彦, 西村善文, 大熊芳明
基本転写因子 TFIIE とそれと相互作用するタンパク質群の機能解析
ターゲットタンパク研究プログラム基本生命 WG 班会議
2010.3.16 - 2010.3.17
新神戸(兵庫県)

(4) 長土居有隆, 奥田昌彦, 明石知子, 西村善文
転写制御因子、ヒストン修飾因子の構造生物学
ターゲットタンパク研究プログラム研究交流会
2010.3.5
東京国際フォーラム(東京都)

(5) 田中垂紀, 水田翔子, 奥田昌彦, 西村善文, 大熊芳明
基本転写因子 TFIIE とそれと相互作用するタンパク質群の機能解析
ターゲットタンパク研究プログラム研究交流会
2010.3.5
東京国際フォーラム(東京都)

(6) 小松正史, 奥田昌彦, 長土居有隆, 菅

瀬謙治, 西村善文
ヒト基本転写因子 TFIIE alpha 酸性ドメインの動的構造解析
第48回 NMR 討論会
2009.11.10 - 2009.11.12
九州大学医学部百年講堂(福岡県)

(7) 奥田昌彦, 長土居有隆, 小松正史, 西村善文
Intrinsically Disordered Transcription related Proteins
第3回アジア-太平洋 NMR シンポジウム(APNMR)
2009.10.25 - 2009.10.28
Ramada Plaza Jeju Hotel(韓国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田昌彦 (OKUDA MASAHIKO)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・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