

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22770110

研究課題名(和文) 転写因子TFIIHサブ複合体の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of transcription factor TFIIH subcomplex

研究代表者

小森 博文 (Komori, Hirofumi)

香川大学・教育学部・准教授

研究者番号：30382261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、RNAポリメラーゼIIによるDNA転写制御機構を明らかにするために、X線結晶解析によって転写因子の立体構造を決定し、転写制御の分子機構を解明することを目的としている。転写因子は様々な種類のタンパク質の複合体として機能する。結晶化に適する試料を調整するために、転写制御に関わる重要なタンパク質複合体について、昆虫細胞や大腸菌の共発現系を利用して精製を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to determine the three-dimensional structures of transcription factors by X-ray crystallographic analysis, in order to understand the molecular mechanism of the DNA transcriptional regulation with RNA polymerase II. Transcription factors function as a complex of various kinds of proteins. To prepare the sample suitable for crystallization, the purification of the significant protein complex involved in transcriptional regulation was performed by using a co-expression system of E. coli and insect cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学

キーワード：タンパク質 X線結晶構造解析 結晶 転写因子

1. 研究開始当初の背景

我々の体は多種多様な細胞から構成されているが、すべての細胞はもともと一つの細胞から分化、成長しており、すべて同じ遺伝子を持っている。特定の組織に分化するためには、遺伝子の持つ遺伝情報の発現が重要な役割を担う。すなわち、特定の細胞は、特定のタンパク質を合成しなければならない。タンパク質が合成されるには、まず、遺伝子 DNA の塩基配列が相補的 RNA (mRNA) として写しとられる (転写)。次に、mRNA の配列が解読され、タンパク質が合成される。転写は遺伝子 DNA とタンパク質の合成の橋わたしをする重要な過程の1つであり、外界からのシグナルに対応してどの遺伝子の転写をオンあるいはオフにするかによって、細胞の特性が決められる。真核生物においてこの遺伝情報を転写する酵素が RNA ポリメラーゼ II である。転写は、RNA ポリメラーゼ II と基本転写因子複合体が DNA 上に結合し、転写開始複合体を形成することによって開始する (図1)。遺伝情報の発現制御は主にこの転写の段階で行なわれる。RNA ポリメラーゼ II の構造は既に決定されており、DNA から mRNA が合成される転写のメカニズムについては原子レベルで解析されている。しかし、外界の多様なシグナルに対応して、転写がどのように制御されているかについては、未だによく分かっていない。

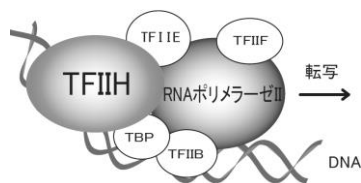


図1. 転写開始複合体

2. 研究の目的

本研究は、RNA ポリメラーゼ II による DNA 転写制御機構を明らかにするために、転写開始複合体に含まれる重要なタンパク質複合体の立体構造を X 線結晶解析によって決定し、その立体構造情報から、DNA 転写制御の分子機構を解明することを目的としている。結晶化に適する試料を調整するために、転写制御にかかわるタンパク質複合体の精製法を確立する。

3. 研究の方法

本研究の最終的な目標は、RNA ポリメラーゼ II による DNA 転写制御機構を明らかにするために、転写制御に関わるタンパク質複合体を X 線結晶解析によって決定することであるが、まず、結晶化に適する純度の試料を大量に調整する必要がある。基本転写因子の中で最も大きなタンパク質複合体である TFIIH

については、バキュロウイルスを利用し、複数のタンパク質サブユニットを昆虫細胞内で同時に発現させることで、4つのタンパク質を含む一部のサブ複合体の再構成を試みた。また、TFIIH と強く相互作用する転写因子 TFIIE や酵母において鉄の調節に関わる転写因子 Fep1 についても、大腸菌の発現系を利用して、複数のタンパク質を共発現させることによって、結晶化に向けた試料の大量調整を行った。

4. 研究成果

本研究では、転写制御に関わる重要なタンパク質複合体 TFIIH, TFIIE 及び鉄調節性転写因子 Fep1-Grx4 の結晶化試料を調整した。

TFIIH では、バキュロウイルスを利用して、昆虫細胞内で、4つのタンパク質 (SSL1, TFB1, TFB2, TFB4) を共発現することで、サブ複合体を再構成した。Strep-tag を利用した精製を試みたが、安定なサブ質複合体を大量に精製することは極めて困難であり、結晶化に適する試料を調整するには至っていない。しかし、4つのタンパク質のなかで最も安定な複合体を形成する SSL1 と TFB4 を大腸菌内で共発現したところ、大量発現することに成功した (図2)。

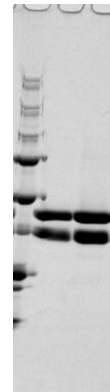


図2 SSL1-TFB4 複合体の SDS 電気泳動

TFIIE については、TFIIE を構成する二つのタンパク質 TFIIE α と TFIIE β を大腸菌内で共発現することにより、大量発現、精製に成功した。具体的には、TFIIE α と TFIIE β を、それぞれに GST-tag と his-tag をつけた組換え体として、グルタチオンカラムと Ni-NTA カラムを利用したアフィニティークロマトグラフィー後、陰イオン交換クロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、高純度なヘテロ二量体を大量に調製することに成功した。野生型 TFIIE では TFIIE α 分子表面に存在すると予想されるシステイン残基の影響で、分子間で S-S 結合が形成されていた。システイン残基をセリン残基に置換した変異体を作成することで、均一な試料の調整することも可能となった。

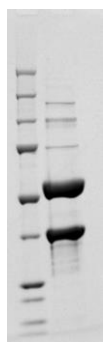


図3 TFIIE の SDS 電気泳動

酵母の鉄調整性転写因子 Fep1 については、Fep1 タンパク質単独では、大腸菌内で極めて不安定で分解されてしまうが、Fep1 と結合してはたらく Grx4 タンパク質と共発現することによって、全長の Fep1-Grx4 複合体として試料を調整することに成功した (図4)。

それぞれのタンパク質試料の結晶化と X 線構造解析が今後の課題である。

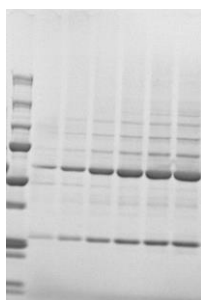


図4 Fep1-Grx4 複合体の SDS 電気泳動

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 18 件)

- ① "Crystal structures of ethanolamine ammonia-lyase complexed with coenzyme B12 analogs and substrates" N.Shibata, H.Tamagaki, S.Ohtsuki, N.Hieda, K.Akita, H.Komori, Y.Shomura, S.Terawaki, K. Mori, N.Yasuoka, Y.Higuchi & T.Toraya *J. Biol. Chem.* **285**, 26484-26493 (2010).
- ② "Cytochrome c polymerization by successive domain swapping at the C-terminal helix" S.Hirota, Y.Hattori, S.Nagao, M.Taketa, H.Komori, H.Kamikubo, Z.Wang, I.Takahashi, S.Negi, Y.Sugiura, M.Kataoka & Y.Higuchi *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 12854-12859 (2010).
- ③ "Crystallization and preliminary X-ray analysis of dimeric and trimeric cytochromes c from horse heart" M.Taketa, H.Komori, Y.Hattori, S.Nagao, S.Hirota, & Y.Higuchi *Acta Cryst. F* **66**, 1477-1479 (2010).
- ④ "Crystal structure of a PFU-PUL domain pair of

Saccharomyces cerevisiae Doa1/Ufd3" R.Nishimasu, H.Komori, Y.Higuchi, H.Nishimasu & H.Hiroaki *Kobe J Med Sci* **56**, E125-139 (2010).

- ⑤ "Crystal structure analysis of Bacillus subtilis ferredoxin-NADP+ oxidoreductase and the structural basis for its substrate selectivity" H.Komori, D.Seo, T.Sakurai & Y.Higuchi *Protein Sci.* **19**, 2279-2290 (2010).
- ⑥ "Positively charged residues located downstream of PIP-box, together with TD amino acids within PIP-box, are important for CRL4Cdt2-mediated proteolysis" M.Michishita, A.Morimoto, T.Ishii, H.Komori, Y.Higuchi, Y.Shiomi & H.Nishitani *Genes Cells* **16**, 12-22 (2011).
- ⑦ "Crystallographic characterization of the DIX domain of the Wnt signalling positive regulator Ccd1" S.Terawaki, K.Yano, T.Katsutani, K.Shiomi, K.Keino-Masu, M.Masu, Y.Shomura, H.Komori, N.Shibata & Y.Higuchi *Acta Cryst. F* **67**, 758-761 (2011).
- ⑧ "Role of π -Electron Systems in Stabilization of the Oxidized Tetraheme Architecture in Cytochrome c3 and Structural Changes in Low to High X-Ray Dose Conditions" Y.Takayama, M.Taketa-Sato, H.Komori, K.Morita, S.I. Kang, Y.Higuchi, & H.Akutsu *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **841**, 1096-1101 (2011).
- ⑨ "An O-Centered Structure of the Trinuclear Copper Center in the Cys500Ser/Glu506Gln Mutant of CueO and Structural Changes in Low to High X-Ray Dose Conditions" H.Komori, R.Sugiyama, K.Kataoka, Y.Higuchi & T.Sakurai *Angew chem* **51**, 1861-1864 (2012).
- ⑩ "Structural and enzymatic characterization of BacD, an L-amino acid dipeptide ligase from B.subtilis" Y.Shomura, E.Hinokuchi, H.Ikeda, A.Senoo, Y.Takahashi, J.Saito, H.Komori, N. Shibata, Y. Yonetani, & Y.Higuchi *Protein Sci.* **21**, 707-716 (2012).
- ⑪ "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human histidine decarboxylase" H.Komori, Y.Nitta, H.Ueno, & Y.Higuchi *Acta Cryst. F* **68**, 675-677 (2012).
- ⑫ "Structural study reveals Ser345 determines substrate specificity on human histidine" H.Komori, Y.Nitta, H.Ueno, & Y.Higuchi *J. Biol. Chem.* **287**, 29175-29183 (2012).
- ⑬ "Domain swapping of the heme and N-terminal α -helix in Hydrogenobacter thermophilus cytochrome c552 dimer" Y.Hayashi, S.Nagao, H.Osuka, H.Komori, Y.Higuchi, & S.Hirota *Biochemistry* **52**, 8608-8616 (2012).
- ⑭ "Inhibitory activity of Filipendula ulmaria constituents on recombinant human histidine decarboxylase" Y. Nitta, H. Kikuzakic, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakae, Y.Higuchi, H.Komori, & H.Ueno *Food Chemistry* **138**, 1551-1556 (2013).
- ⑮ "Photosensitivity of the Ni-A state of [NiFe] hydrogenase from D. vulgaris Miyazaki F with visible light" H.Osuka, Y.Shomura, , H.Komori, N.Shibata, S.Nagao, Y.Higuchi, & S.Hirota *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**, 284-288 (2013).
- ⑯ "Crystal structure of the CueO mutants at Glu506, the key amino acid located in the proton transfer pathway for

dioxygen reduction"
H. Komori, T.Kajikawa, K.Kataoka, Y.Higuchi &
T.Sakurai
Biochem. Biophys. Res. Commun. **438**, 686-690 (2013).

- ⑰ "Formation of Oligomeric Cytochrome c during Folding by Intermolecular Hydrophobic Interaction between N- and C-Terminal α -Helices"
PPParui, M.Deshpande, S.Nagao, H.Kamikubo,
H.Komori, Y.Higuchi, M.Kataoka, & S.Hirota
Biochemistry **52**, 8732-8744 (2013).
- ⑱ "New insights into the catalytic active site structure of multicopper oxidase"
H.Komori, R.Sugiyama, K.Kataoka, K.Miyazaki,
Y.Higuchi & T.Sakurai
Acta Cryst. D **70**, 772-779 (2014).

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小森 博文、“構造解析に向けた鉄調節性転写因子の精製”、日本生物高分子学会 2013 年度大会 (2013 年 10 月)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ed.kagawa-u.ac.jp/~komori/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 博文 (KOMORI HIROFUMI)

香川大学・教育学部・准教授

研究者番号：30382261