

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570144

研究課題名(和文) ヒト基本転写因子TFIIEのNMR法による全長構造の解明

研究課題名(英文) NMR study 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：基本転写因子は、タンパク質をコードする遺伝子の転写を行うRNAポリメラーゼIIが反応を開始するために必須のタンパク質である。本研究では、基本転写因子の一員である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 と からなる異種二量体で約8万の高分子量、且つ凝集しやすい性質の為、NMR法による解析は困難であったが、様々な技術の導入や高磁場NMR装置の利用により、完全長複合体における三つの機能ドメインのうちの1つの立体構造を高分解能で決定した。

研究成果の概要(英文)：General transcription factors are necessary for transcription initiation of protein coding genes by RNA polymerase II. In this study, I structurally analyzed the whole structure of human TFIIE, a member of the general transcription factors by using NMR. Human TFIIE is a heterodimer, consisting of an alpha and a beta subunit. TFIIE has large molecular weight (~80kDa) and shows the tendency to aggregate. Although these characters are disadvantage for structural analysis by NMR, use of the latest NMR technologies and high magnetic field NMR machines enabled to gain structural information on three functional domains of TFIIE. I was able to determine a high resolution tertiary structure of one of three functional domains in the intact TFIIE complex.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：構造生物学

キーワード：NMR 転写 基本転写 立体構造 TFIIE TFIIH

– 1 . 研究開始当初の背景

遺伝子情報の読み出し(転写)は生命の根幹をなす極めて重要な反応である。その機構を解明するためには転写装置の立体構造情報が不可欠である。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 (Pol II) が担う。2001年にコーンバーク博士により酵母の Pol II の構造が X 線結晶回折法で解かれた(2006年ノーベル化学賞受賞)。Pol II 構造の解明は転写研究を大きく前進させた。しかしながら、Pol II 単独では転写を開始することが出来ず、基本転写因子とよばれる少なくとも5種類のタンパク(TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIH, TFIIF)が必要であることから、Pol II と基本転写因子から構成される転写開始複合体の構造解明が次の課題となっている。欧米を中心に基本転写因子の構造が勢力的に解かれているが、TFIIE に関しては我が国がこれまでのところ先導している。

TFIIE は と の2つのサブユニットからなる分子量約8万4千のヘテロ二量体である。高分子量、難溶性の問題から NMR 法では解析が大変困難な為、X 線結晶回折法が試みられてきたが、良質の結晶が得られず解析の見通しが立っていない。プロテアーゼ限定分解等の実験から、TFIIE は自身では構造をとらない天然変性領域を広く有し、いくつかの安定なドメインがリンカーで結ばれたビーズ様構造であることが示唆されている。そのような構造であれば、むしろ NMR 法が適している。そこで、次に示す計画を立てた。研究の第一段階では、安定なドメインを同定、単離し、それらの立体構造を NMR 法で逐一決定する。第二段階では、全長 TFIIE 複合体中の各ドメインの静的、および動的構造を解析する。第三段階においては、全長中の各ドメインの構造を決定し、また天然変性領域についても解析する。このようにして得られた全構造情報から TFIIE の全長構造を決定、あるいはモデル化できるのではないかと考えた。以下、第一、二段階の研究成果の概要を説明した後、第三段階に位置づけている本研究について述べる。

最初に、欠損させると基本転写活性に対してドミナントネガティブ効果を示す機能上必須だがその役割が不明なヒト TFIIE のコアダメインの構造を TFIIE 初の立体構造として世界に先駆けて決定した。構造から機能を推定するために類似構造を検索したところ、羽根つきヘリックス・ターン・ヘリックス (wHTH) とよばれる DNA 結合ドメインとの類似性が認められた。実際に実験で結合能を確認したが、意外なことに wHTH とは異なる新しい DNA 結合様式であった。続いて、同様に基本転写活性に不可欠な TFIIE のコアダメインの構造を決定した。その構造は、長らく

予想されてきたものとは異なる新規の亜鉛結合ドメインであった。構造から機能の重要性が推測された残基に変異を導入したところ、野生型よりも数倍高い活性を示す変異体を得た。TFIIE の C 末端の酸性ドメインは TFIIH をリクルートして転写開始複合体を完成させる重要な役割をもつ。TFIIH の10個のサブユニットのうち p62 サブユニットと相互作用することが分かっていたが、詳細は不明であった。そこで、TFIIE の酸性ドメインの標的が p62 の N 末の PH ドメインであることを同定し、TFIIE の酸性ドメインの単独構造と、p62 の PH ドメインとの複合体構造の両方を決定し、リクルート機構の一端を明らかにした。この研究は TFIIE と他分子との初の複合体構造解明となった。

このように単離した各機能ドメインの構造から多くの有益な情報を得ることができたが、さらに理解するためには分子全体の構造を解析する必要がある。NMR 法にとって高分子量でしかも凝集しやすい TFIIE 複合体であるが、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、解析を進めることが出来た。観測された主鎖シグナルのうち、84%を帰属した。周囲の環境に敏感である化学シフトを利用して、全長構造と単離して構造決定した各ドメイン構造を比較した結果、その差は非常に小さかった。このことから、全長中の各ドメインは単離して決定したものと同様の構造を形成して独立し存在していることが分かった。また、全長構造に対し 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明らかにした。

第三段階にあたる本研究では、全長 TFIIE 複合体における各ドメインの立体構造を決定する。また、構造的に安定したドメインだけでなく、従来解析の対象から外されてきた構造をとらない天然変性領域に対しても解析する。天然変性領域は、自身では構造をとらなくとも、標的分子との相互作用により構造が誘起される場合があり、特に TFIIE は Pol II、他の基本転写因子、DNA 等、さまざまな分子と相互作用するため、広く分布している天然変性領域が相互作用に関与していることが充分考えられるからである。

2 . 研究の目的

本研究では、転写装置の構成因子である基本転写因子 TFIIE 全体構造の決定を目的とする。約8万4千の高分子量タンパクの NMR 法による解析は最新技術を駆使しても挑戦的研究になるが、得られる成果は現在世界中で

進められている転写装置の構造モデル化、及び立体構造に基づく転写開始機構の解明に多大に貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 主鎖シグナルの帰属

主鎖シグナルの帰属に必要な多次元 NMR 測定は終了している。大方のシグナルは帰属を完了しているが、未帰属なシグナルについて引き続きスペクトルを解析し帰属を進める。

(2) 側鎖シグナルの帰属

側鎖 ^{13}C シグナルは、これまで用いてきた ^2H (100%), ^{13}C , ^{15}N 標識試料に対し、多次元 NMR 測定を行い帰属する。側鎖 ^1H シグナルは、新たに、 ^2H 部分標識、あるいは ^2H 非標識 ^{13}C , ^{15}N 標識試料を調製後、多次元 NMR 測定し帰属する。

(3) NOE シグナルの帰属

(2) で調製した試料を用いて、多次元 NMR (^{13}C - ^{15}N -NOESY) 測定を行う。観測された NOE シグナルを帰属し、シグナル強度から水素原子間制限距離を見積もる。

(4) 二面角、水素結合の解析

二面角情報は、化学シフト値から収集する。水素結合は、重水素交換実験から同定する。

(5) 立体構造計算、初期構造の算出

(3) 及び (4) で収集した制限情報 (距離、二面角、水素結合) を入力情報とし、立体構造計算プログラム XPLOR-NIH を用いて、初期構造を算出する。

(6) 構造の精密化、及び最終構造決定

得られた初期構造から、NOE シグナルの見直しと構造計算を繰り返し、構造の正確さと精度を高める。

4. 研究成果

大腸菌の共発現系から調製した ^{13}C , ^{15}N 標識、及び ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識全長 TFIIIE 複合体を用いて、種々の多次元 NMR 実験を行った。シグナルを帰属後、NOE シグナルから水素原子間距離情報を収集した。重水素交換実験から水素結合を、帰属した化学シフト値から主鎖二面角を見積もった。これらを制限情報とし、XPLOR-NIH プログラムを用いてシュミレーション・アニーリング法により立体構造を計算した。以上の常法に加え、立体整列同位体標識(SAIL)した試料を利用し、更なる構造常法を得た。

予想されたように、TFIIIE は広く天然変性

領域を有していたが、それらの正確な領域を特定した。TFIIIE の C 末領域には基本転写因子 TFIIH を転写開始複合体に呼び込む際に重要な役割をもつ酸性ドメインがあるが、その全長 TFIIIE 複合体中の構造を高分解能で決定した (図 1)。また、両者の相互作用を NMR 法で観測し、結合部位の同定し、結合の強さ(Kd)を定量した (図 2)。構造を形成している他のドメイン領域については解析を続けている。

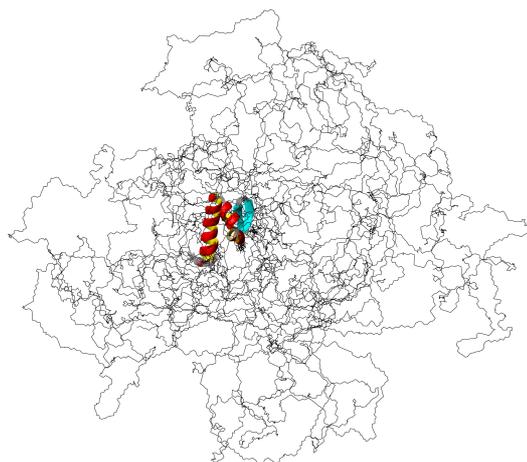


図 1 完全長 TFIIIE 複合体における TFIIIE の後半領域の構造 20 個の NMR 構造。C 末酸性ドメイン (リボンモデル表示) に対して重ね合わせている。

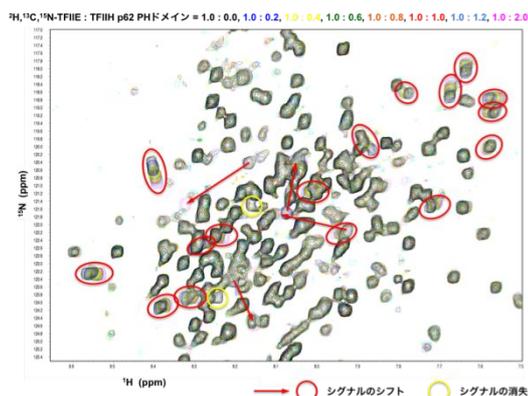


図 2 完全長 TFIIIE 複合体と TFIIH p62 PH ドメインとの相互作用実験。

^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識した TFIIIE に対し、非標識 p62 PH ドメインで滴定した際の主鎖アミドシグナルの変化を NMR ^1H , ^{15}N -HSQC 測定で観測した。図は滴定 8 ポイントからの HSQC スペクトルを重ね合わせたもの。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 奥田昌彦、廣瀬賢治、川瀬泰司、押方基二、西村 善文
基本転写因子 TFIIIE のイオンモビリティ質量分析
日本生化学学会
2011.9.23
国立京都国際会館

(2) Okuda M, Moriwaki Y, Kataoka M, Nagadoi A, Tanaka A, Ohkuma Y, Nishimura Y.
Structural analysis for 85 kDa protein complex, general transcription factor TFIIIE by NMR spectroscopy
The International Symposium on Nuclear Magnetic Resonance
2011.11.16
Osanbashi Hall (Yokohama, Japan)

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