

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370050

研究課題名(和文)TFIID複合体を中心としたヌクレオソーム構造変換機構の立体構造基盤

研究課題名(英文)Mechanistic analyses of chromatin structural changes through the structure of TFIID

研究代表者

千田 俊哉 (Senda, Toshiya)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授

研究者番号：30272868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチン鑄型からの転写活性化には、必要な時期に必要な遺伝子領域のヌクレオソームのみを破壊することが必要である。我々は、転写基本因子TFIIDがヒストンのアセチル化を認識し、CIAを特定の領域にリクルートすることで、特定のヌクレオソームを破壊する分子機構を提唱してきた。本研究では、TFIIDのTAF1のHATドメインとTAF7の複合体の結晶構造解析、及び機能解析に用いる系の構築を試みた。TAF1 HAT-TAF7については、大量発現・大量精製の系を構築し、結晶化スクリーニングを行っている。機能解析については、DNA上に転写開始因子であるTBP、TFIIBを分子集合させる系の構築を進めている。

研究成果の概要(英文)：Nucleosomes are the fundamental repeating units of chromatin. To initiate the transcription reaction, histones must be removed from genomic DNA at gene coding regions. Previously, we determined the cocrystal structure of CIA and double bromodomain, and proposed a recruitment and disassembly model (hiMOST model). In this study, we established the methods for large-scale purification of the HAT domain of TAF1, and the conserved domain of TAF7. In order to perform functional analysis of TFIID in chromatin transcription, we also tried to reconstitute the complex of TBP and TFIIB on promoter DNA.

研究分野：結晶学・構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 クロマチン ヌクレオソーム 転写 TFIID

1. 研究開始当初の背景

クロマチン鑄型からの転写活性化には、必要な時期に必要な遺伝子領域のヌクレオソームのみを破壊することが必要である。我々はこれまでに、転写基本因子 TFIID がヒストンのアセチル化を認識し、ヒストンシャペロン CIA を特定のプロモーター領域にリクルートすることで、特定のヌクレオソームを破壊するという分子機構をタンパク質複合体の立体構造に基づいて提唱してきた [Natsume *et al.*, *Nature* (2007); Akai *et al.*, *PNAS* (2010)]。

このような背景において、ドメインレベルの立体構造情報から提唱された分子機構を、タンパク質複合体レベルからのモデルに伸展させることが期待された。

2. 研究の目的

研究期間内に、下記2点を達成することを本研究課題の目的とする。

- (1) TAF1 HAT ドメイン-TAF7 複合体の結晶構造解析
- (2) 機能解析に用いる TFIID の精製

3. 研究の方法

(1) 平成 24 年度

TAF7 の大量発現系・大量精製系は既に構築済みである。平成 24 年度は TAF1 の HAT ドメインの大量発現系・大量精製系の構築を行う。これらのタンパク質の精製が終わり次第、TAF1 HAT ドメイン-TAF7 が安定に複合体を形成する条件や、ドメイン領域の探索を行う。

TFIID については大量培養・大量精製を繰り返して行い、精製純度の向上を試みる。

(2) 平成 25 年度以降

TAF1 HAT ドメイン-TAF7 複合体について、平成 24 年度に見いだした安定な複合体を形成する条件やドメイン領域を参考にして複合体を調製し、結晶化スクリーニングを行う。結晶が得られ次第、放射光施設で回折データを収集して結晶構造を決定する。結晶の質に問題がある場合は、変異体の活用と結晶の凍結条件の最適化を行い、結晶の質の改善を試みる。

TFIID については、電子顕微鏡等で精製標品の均一性を確認しつつ、平成 24 年度に引き続き精製純度の向上を試みる。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度

TAF7 の精製法を既に確立していたものの純度が 90%程度と不十分だったので、純度向上のための精製法の改善を行った。その結果、純度 95%の精製標品が得られたので結晶化を行ったが、結晶を得られる兆候が見られな

かった。そこで精製後のサンプルの状態を確認するためにプロテアーゼによる限定分解・CD 解析を行ったところ、構造形成領域と変性領域が共存することが示唆された。

さらに詳細に精製標品の状態を調べるために、安定同位体ラベルしたタンパク質を用いて NMR 測定を行い、得られたシグナルを帰属したところ、大部分の領域は変性しているが、数アミノ酸の領域がいくつか、とびとびに 2 次構造を形成していることが示唆された。以上の解析から、TAF7 は単独では立体構造を形成せず、相互作用相手と相互作用することで始めて明確な立体構造を形成することが示唆された。

この結果を受けて、さらに TAF7 の立体構造を安定化させるための相互作用相手である、TAF1 の各種ドメインの精製方法の確立を行うこととした。TAF1 の HAT ドメイン周辺は、ユビキチン様ドメイン-HAT ドメイン-ユビキチン化酵素ドメイン(E1/E2 ドメイン)-RAPID ドメイン(TAF7 と直接結合するドメイン)-HMG ボックス(DNA 結合ドメイン)という構成になっているので、これらのドメイン及びその組み合わせについて精製方法の確立を行うこととした。これまでに、ユビキチン様ドメイン、HAT ドメイン、HAT ドメイン-E1/E2 ドメイン、E1/E2 ドメイン-RAPID ドメイン、RAPID ドメイン、HMG ボックス下記のドメインについて HIS タグ融合タンパク質を大腸菌にて発現させるためのコンストラクトを構築済みである。

(2) 平成 25 年度

TAF7 の立体構造を安定化するための相互作用因子の準備を進めてきた。これまでに TAF7 は、TAF1 の HAT ドメインのすぐ隣(C 末端側)に存在する RAPID ドメインと相互作用することが示されているので [Chiang & Roeder, *Science* (1995)], RAPID ドメインを含む TAF1 の各種領域等(ユビキチン様ドメイン・HAT ドメイン・HAT-E1E2 ドメイン・HAT-E1E2- RAPID-HMG ドメイン・E1E2-RAPID-HMG ドメイン・RAPID-HMG ドメイン・HMG ドメイン)について、大腸菌でのリコンビナントタンパク質の発現と可溶化の確認を行った。結果、ユビキチン様ドメイン・E1E2-RAPID-HMG ドメイン・RAPID-HMG ドメイン・HMG ドメインについて、発現と可溶化を確認することができた(図 1,2)。

HAT ドメインを含む領域については、大腸菌内で発現はするものの可溶化されなかったため、無細胞系での発現を試みた。結果、HAT ドメインについて、わずかながら発現・可溶化を確認できた。さらに、TAF7 と TAF1-RAPID ドメインのモル比が揃った複合体を精製する目的で、TAF7-TAF1-RAPID 融合タンパク質の発現コンストラクトを作成した。

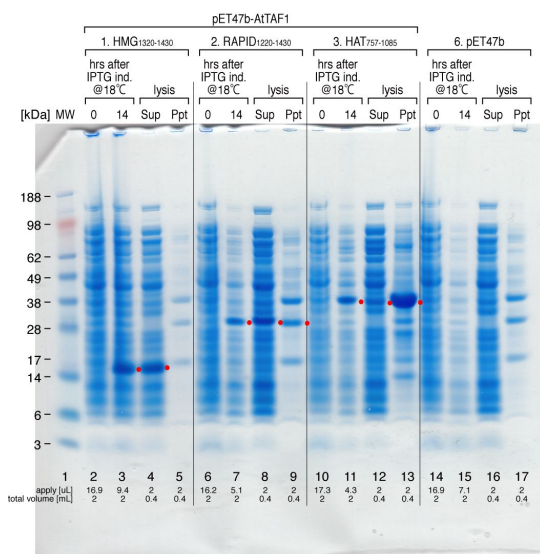


図1 TAF1の各種領域の発現実験(その1)
左上から順に、HMGドメイン・RAPIDドメイン・HATドメイン・mockに関する結果。

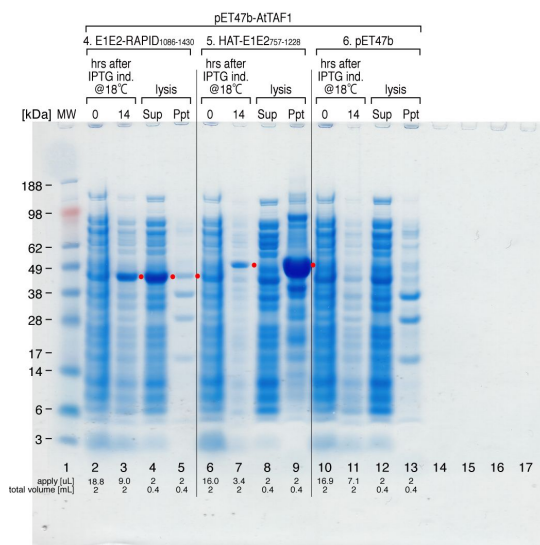


図2 TAF1の各種領域の発現実験(その2)
左上から順に、E1E2+RAPIDドメイン・HAT+E1E2ドメイン・mockに関する結果。

(3) 平成26年度

TAF1, TAF7の精製と結晶化を進めると同時に、TAF1HAT-TAF7複合体の機能解析を行うための実験系の立ち上げを行った。
TFIIDはプロモーターDNA上に分子集合して機能することから、プロモーターDNA上に、TAF1, TAF7を含む転写関連複合体を分子集合させることを試みた。まず、TFIIDのDNA結合サブユニットであるTBPを精製し、さらにTBPのDNAへの結合を安定化するTFIIB, TFIIAを精製した。
TFIIBはシングルポリペプチドなので、大腸菌で単独で発現させて精製した。TFIIAについては2サブユニットの因子であるためか、サブユニット単独では大腸菌内では全く可溶化しない。そこで、TFIIAの2 subunitを

融合して発現させるコンストラクトを作製し、発現・精製した。精製タンパク質とプロモーターDNAを順次混合して、TBP-DNA-TFIIBが複合体を形成することを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)
Nishizawa, A., Harada, A., Senda, M., Tachirara, Y., Muramatsu, D., Kishigami, S., Mori, S., Sugiyama, K., **Senda, T.** and Kimura, S., Complete pyridine-nucleotide-specific conversion of an NADH-dependent derredoxin reductase. *Biochem. J.*, 査読有、462巻、2014、257-265

〔学会発表〕(計 6件)
安達成彦、**千田俊哉**、他、転写基本因子TFIIDを中心とした転写活性化の分子機構の解析、第12回日本蛋白質科学会年会(名古屋国際会議場)、2012年6月

安達成彦、**千田俊哉**、他、Purification and crystallization of TAF subunits of general transcription initiation factor TFIID、コールドスプリングハーバー研究所国際学会(アメリカ合衆国)、2012年9月

安達成彦、**千田俊哉**、他、Purification and crystallization of TAF subunits of general transcription initiation factor TFIID、名古屋シンポジウム(名古屋大学)、2013年1月

相沢恭平・安達成彦・**千田俊哉**、転写基本因子TFIIDのユビキチン活性化/結合酵素活性制御ドメインの結晶化に向けた精製、第86回日本生化学会大会(パシフィコ横浜)、2013年9月

安達成彦、**千田俊哉**、他、Large-scale purification of general transcription factor TFIIF、コールドスプリングハーバー研究所国際学会(アメリカ合衆国)、2014年9月

千田俊哉、エピジェネティックおよび疾病関連タンパク質の構造生物学研究、日本結晶学会(東京大学)(招待講演)、2014年11月

〔図書〕(計 1件)
安達成彦、**千田俊哉**、他、Springer、Encyclopedia of Systems Biology "Histone posttranslational modification to nucleosome structural change."、2013、896-899

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pfweis.kek.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千田 俊哉 (SENDA, Toshiya)
高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授
研究者番号：30272868

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：