

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570193

研究課題名(和文) p53-p21経路の新規メディエーターであるTLPの作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of TLP as a mediator in p53-p21 pathway

研究代表者

田村 隆明 (Tamura, Takaaki)

千葉大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30112692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずTLPがp53に結合することの意義について検討し、TLPのp53結合がp53を不安定化するMDM2のp53結合を阻止し、結果としてp53の核内濃度が高まり、同時にp53下流遺伝子の発現が高まる事が明らかとなった。さらにTLPがTFIIAと結合する事の意義についても検討し、TLP結合がTFIIAの限定分解/成熟を阻止し、結果、TATAボックスプロモーター上での転写開始複合体の形成が抑えられ、その帰結としてTATAプロモーターからの転写が抑えられる事が明らかとなった。これと同時にTFIIAがTLPの細胞内安定化にも寄与している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We first examined the significance of p53 binding of TLP. We found that the p53 binding of TLP prevents p53 binding of MDM2, which destabilizes p53 via ubiquitin-proteasome system. This p53 binding of TLP results in concentration of p53 in the nucleus, which is antagonized by MDM2, and potentiates various p53 downstream genes. We suggest that TLP potentiates p53 both in transcriptional activation and protein stabilization. Second, we examined the significance of TFIIA binding of TLP. We found that the TLP binding results in inhibition of Taspase1-mediated processing of the precursor TFIIA. TLP potentiates transcription of TATA-less promoters but represses TATA promoters. Moreover, mature TFIIA is preferentially used for a preinitiation complex for TATA promoters. These mechanisms can explain why TLP inhibits TATA promoters. TLP may work as a molecular tuner for genomic gene expression. We also found that TFIIA stabilizes TLP, which is degraded by ubiquitin-proteasome system.

研究分野：生物学

キーワード：転写制御因子 TLP p53 TFIIA

### 1. 研究開始当初の背景

TLP (TBP-like protein) は TBP ファミリーのうちのひとつで、TBP の必須領域である C 末端部分と約 40% のホモロジーをもつ。TBP と異なり、TLP は TATA ボックス結合能を有していないが、転写活性化能をもち、とりわけ TATA-less プロモーターに対する転写活性化能を示す。他方、TATA プロモーターに対してはプロモーター活性を抑えるように働く。TLP の特徴的な性質として、TFIIA と強く結合するという事が知られている。この結合能はそれまで知られていた TBP が示す TFIIA 結合能の約 10 倍の強さをもつ。TLP には細胞増殖抑制能やアポトーシス誘導能があるが、後者に関しては TAp63 遺伝子とその作用標的遺伝子である事を既に報告している。研究代表者らは細胞への TLP の強制発現や TLP のノックダウン実験を通して、TLP により発現が上昇する遺伝子の探索を行い、いくつかの応答遺伝子を同定したが、その中に強力な細胞増殖抑制能をもつ p21 が含まれていた。詳細な解析の結果、TLP が 2 力所ある主要な p21 転写開始部位のうち、上流の TATA-less プロモーターから起こる転写を上昇させる事を見出した。上流プロモーターの活性に特に重要な転写制御因子は p53 であるが、TLP は p53 の転写活性化に必須であり、また TLP の機能発現には p53 が必要であった。これらの事実から、明確で特異的な DNA 結合能をもたない TLP は、p53 のコアクチベーターとして働く事が示唆された。

### 2. 研究の目的

上述のように TLP は転写を活性化する働きをもち、またプロモーターの形状によっては転写を抑制する。このような現象がどのような機構によって起こるのかを本研究の一つの目標とし、特に、「TLP が p53 の機能を細胞内で高める」という点に着目し、その機能解析を進めた。さらに TLP の最も特徴的な性質として、強い TFIIA 結合能があげられるが、この強い結合能が転写制御能や TLP の機能発揮に対してどのような意味をもつのかもまだよくわかっておらず、本研究ではこの点についても詳しく検討する事とした。

### 3. 研究の方法

本研究では基本的には培養細胞を使用して TLP の機能解析を行う。転写制御能についてはレポーターとエフェクタープラスミドのコトランスフェクションにルシフェラーゼレポーターアッセイを組み合わせる方法によって解析した。また種々の因子の関与についての解析は、発現ベクターを用いる強制発現や、siRNA を用いるノックダウン法により行った。因子同士の結合性に関しては、免疫沈降法やクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いた。なお、トランジェントな核酸の導入が細胞にとってストレスとなる事を考え、そのようなストレスを避ける目的のために

は、状況に応じて shRNA を用いた。細胞内でのタンパク質の安定性を解析する実験ではシクロヘキシミドを用いて新規タンパク質合成を止め、その後のタンパク質量をウエスタン法で検出するという方法をとった。タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系で分解される事を検討する実験ではプロテアソーム阻害剤の MG132 を使用し、in vivo ユビキチンアッセイは、タグ付きユビキチンベクターのトランスフェクションとその後の免疫沈降法との組み合わせで行った。

### 4. 研究成果

(1) TLP による p53 の細胞内活性化機構の解析に関しては、以下のような成果が得られた。

始めに p53 中の TLP 結合部位の同定を、変異解析を通して行い、N 末端側にある特定の領域を同定した。この領域は MDM2 結合部位と重複していた。またこれとは別に、TLP における p53 結合部位も同定した。

p53 と MDM2 の結合が起こる系に TLP を共存させると、MDM2 の p53 結合量が低下し、その結果として p53 の安定性が上昇した。この現象は p53 結合能を欠損した TLP では見られなかった。

因子同士の結合を解析する実験の結果、p53 結合に対し、TLP と MDM2 はそれぞれ競合的な挙動を示す事が明らかにされた。

ユビキチン化アッセイにより、p53 の MDM2 によるユビキチン化は TLP によって抑制され、さらに p53 の安定化は TLP 存在下で有意に上昇する事が明らかにされた。

TLP 存在下では p53 の核局在の程度が高まり、さらに核外輸出は低下した。

TLP は p53 依存性遺伝子の発現上昇、あるいは下降といった制御を示した。

紫外線ストレスによって p53 応答性の下流遺伝子の発現が高まり、それには TLP が重要な役割を果たしている事が明らかになった。

以上の結果により、TLP は転写制御に直接働く事以外に、p53 を MDM2 結合と競合する事により、p53 をタンパク質レベルで安定化するというユニークな働きをもつ事が明らかとなった。

これらの研究で得られた成果により、p53 の細胞内機能のフルの発現には TLP が必要な事、さらに p53 の核滞留に TLP が効くという興味ある現象も示された。

(2) TLP の TFIIA 結合性や TLP に対する TFIIA の効果に関する解析では、以下のような成果が得られた。

TFIIA は 前駆体からそれぞれのサブユニットが生成し、それが サブユニットと結合する事によって完全な形のホロ TFIIA となるが、成熟・生成系を TLP が阻害するという現象が見出された。この阻害は TFIIA 結合能をもたない TLP によっては起きない事も明らかとなった。

前駆体プロセッシングはタスパーゼに

よる限定的タンパク質分解によって起こるが示され、TLPはこのプロセッシングを阻害することも明らかとなった。

ゲルシフトアッセイの結果、TATAボックス/TBP/TFIIA複合体にはプロセス型・が関わる事が示された。

TLPはゲノムからのTATA-lessプロモーター転写は活性化するが、TATAプロモーター転写を阻害することが確かめられた。

以上の結果から、TATAボックスプロモーターがTLPによって阻害さらにメカニズムとして、TLPがTFIIAのプロセッシングを阻止し、その結果TATAボックス上に形成される活性型(TFIIAの成熟型・が必要)転写開始前複合体の形成が低下し、それによってプロセス型TFIIAを必要とするTATAプロモーターの機能が低下するという機構を提唱することができた。

以上の成果から、TLPはゲノムからの遺伝子発現をプロモーターの形状によって調節するファインチューナーとしての挙動をとるといふ新しい概念を提唱した。

TLPはユビキチン・プロテアソーム系によって分解され、不安定化することが示された。このようなTLPの不安定化はTFIIAが存在することによって解消されることが明らかとなった。TLPの機能には転写レベルでTFIIAが必要だが、本研究によって、TLPの安定化という方向性でもTFIIAが効いている事が示めされた。

上記のようなTFIIAによるTLPの安定化にはサブユニットを含んだホロTFIIAが必要であった。また、前駆体TFIIAもプロセス型TFIIAと同様にTLP安定化能があることが明らかとなった。

#### 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6件)

(1) H. Suzuki, R. Maeda, K. Ura, and T. Tamura (2015). TBP-like protein (TLP) interferes with Taspase1-mediated processing of TFIIA and represses TATA box gene expression. *Nucl. Acids Res.*, 査読有、43, 6285-6298.

DOI:10.1093/nar/gkv576

(2) H. Suzuki, R. Maeda, T. Nakadai, and T. Tamura (2014). Activity of the Upstream TATA-less Promoter of the *p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* Gene Depends on Transcription Factor IIA (TFIIA) in

Addition to TFIIA-reactive TBP-like Protein (TLP). *FEBS J.*, 査読有、281, 3126-3137.

DOI:10.1111/febs.12848

(3) R. Maeda, H. Suzuki, Y. Tanaka, and T. Tamura (2014). Interaction Between Transactivation Domain of p53 and Middle Part of TBP-Like Protein (TLP) Is Involved in TLP-Stimulated and p53-Activated Transcription from the p21 Upstream Promoter. *PLoS ONE*, 査読有、9(3): e90190.

DOI:10.1371/journal.pone.0090190

(4) H. Suzuki, A. Suzuki, Y. Maekawa, S. Shiraishi and T. Tamura (2012). Interplay between two myogenesis-related proteins: TBP-interacting protein 120B and MyoD. *Gene*, 査読有、504, 213-219.

DOI:10.1016/j.gene.2012.05.022

(5) H. Suzuki, R. Ito, K. Ikeda and T. Tamura (2012). TATA-Binding Protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of an upstream promoter of the *p21<sup>Waf1/Cip1</sup>* gene. *J. Bio. Chem.*, 査読有、287, 19792-19803.

DOI:10.1074/jbc.M112.369629

(6) T. Kitamura, H. Suzuki and T. Tamura (2012). Mouse *Wee1* Gene Is Repressed by Krüppel-Like Factor 3 (KLF3) via Interaction with Multiple Upstream Elements. *Gene*, 査読有、492, 361-367.

DOI:10.1016/j.gene.2011.11.016

[学会発表](計10件)

(1)磯貝桃子、鈴木秀文、田村隆明「TFIIAによるTLPの安定化によるDNA傷害応答制御機構」第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(2)玉城寛之、前田亮、小島和華、鈴木秀文、田村隆明「UV傷害時のp53ストレス応答におけるTLPの機能解析」第38回日本

分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(3) 中里有稀、鈴木秀文、田村隆明「TLPはマイオジェニンプロモーターを介して分化を抑制する」第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(4) 前田亮、玉城寛之、高野和儀、鈴木秀文、浦聖恵、遠藤剛、田村隆明「MDM2との結合競合を介した転写因子 TLP による p53 安定化機構」第38回日本分子生物学会年会、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(5) 前田亮、玉城寛之、高野和儀、鈴木秀文、遠藤剛、田村隆明「p53の細胞増殖制御機構における TBP-Like-Protein (TLP) の機能解析」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(6) 鈴木秀文、磯貝桃子、中里有稀、前田亮、中太知義、田村隆明「TLPによるTFIIA結合性を介した遺伝子プロモーター調節機構」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(7) 中里有稀、鈴木秀文、田村隆明「TLPはTaspase1によるTFIIA前駆体の切断を阻害する」第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(8) 鈴木秀文、前田亮、中太知義、田村隆明「エトポシドによって誘導される p21 遺伝子上流プロモーターの活性化には TLP-TFIIA の相互作用が必要とされる」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(9) 前田亮、鈴木秀文、田村隆明「p21 遺伝子転写における p53 と TBP-like protein (TLP)の相互作用の解析」第36回日本分子

生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(10) 鈴木秀文、伊藤亮、池田香織、田村隆明「TLPによる p53 依存的な p21 遺伝子発現の活性化」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計7件)

(1) 田村隆明、南山堂、スッキリわかるグングン身につく生化学ドリル、2016年、178ページ

(2) 田村隆明、講談社、大学1年生のなっとく生物学、2014年、203ページ

(3) 田村隆明、羊土社、改訂バイオ試薬調製ポケットマニュアル、2014年、275ページ

(4) 田村隆明、裳華房、コア講義・分子遺伝学、2014年、176ページ

(5) 田村隆明、裳華房、しくみからわかる生命工学、2013年、216ページ

(6) 田村隆明、講談社、バイオ実験安全ガイドブック、2012年、247ページ

(7) 田村隆明、羊土社、基礎から学ぶ遺伝子工学、2012年、252ページ

〔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

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

(1人)

田村 隆明(Takaaki TAMURA)  
千葉大学大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 30112692

(2) 研究分担者  
(0人)  
研究者番号:

(3) 連携研究者  
(0人)  
研究者番号: