

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657119

研究課題名(和文) コアプロモーター認識因子の選択による mRNA 運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of how core transcription factors affect the fate of mRNA

研究代表者

古久保 哲朗 (Kokubo, Tetsuro)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：10271587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：基本転写因子TFIIDはTBPと14種類のTAFから構成される巨大な複合体であり、SAGAとともにコアプロモーター上で働き、TBP-DNA相互作用を制御することによって転写の活性化を行う。最近我々は、同一のプロモーターからTFIIDまたはSAGAによって転写されるCLN2 mRNAが機能の異なる二種類のCln2pに翻訳される可能性を示した。本研究では、さらに解析を進め、TFIID内部のTBP制御領域TANDが、CLN2 mRNAの作り分けに関与すること、CLN2 mRNA[SAGA]がRAMシグナル経路とSsd1pによる局所翻訳制御を受けることを強く示唆する結果を得たので、以下に報告する。

研究成果の概要(英文)：TFIID, the largest GTF composed of TBP and 14 TAFs, and its related complex SAGA play critical roles in transcriptional activation by regulating TBP-DNA interactions. Previously, we suggested an intriguing possibility that CLN2 mRNA generated by TFIID or SAGA (designated as CLN2 mRNA[TFIID] or [SAGA], respectively) could produce two types of Cln2p that carry distinct functions. Here we demonstrate that TAND (Taf1p N-terminal domain) of TFIID may determine the production ratio between CLN2 mRNA[TFIID] and [SAGA], and also that the latter mRNA may be specifically regulated by Ssd1p and RAM (Regulation of Ace2p activity and cellular Morphogenesis) signaling pathway at the translational level. These results support the idea that the selection of core transcription factor (e.g. TFIID versus SAGA) may affect the fate of mRNA generated even from a single promoter.

研究分野：分子生物学

キーワード：transcription TFIID SAGA mRNA cyclin gene regulation cell morphogenesis GTF

## 1. 研究開始当初の背景

すべての生命現象は必要な遺伝情報がプログラム通りに正しく発現することにより支えられている。それゆえ情報発現を司る基本的な仕組みである「転写」は、分子生物学の中心的課題として常に注目を集めてきた。TATAボックス/イニシエーター等のコアプロモーター構造を認識する基本転写因子TFIID (TBP; TATA box-binding proteinと14種類のTAFs; TBP-associated factorsから構成されるタンパク質複合体)は、転写開始前複合体 (PIC; pre-initiation complex)のアッセンブリーに際して核となる分子であり、転写調節因子から受け取った信号を転写量の増減へと変換する上で中心的な役割を果たす。我々はこれまで主に出芽酵母を用いてTAFsの生体内機能について解析を進めてきたが、その過程でTaf1のN末端に存在するTBP機能阻害領域 (TAND; Taf1p N-terminal domain)が、TFIIDによる転写活性化の分子スイッチとして機能することを見出し、“二段階ハンドオフモデル”と呼ぶ転写活性化の分子モデルを新たに提案した。このモデルでは、転写活性化ドメインがTANDの構造を分子的に擬態することによってTAND-TBP間の負の相互作用を解除し、最終的にはTBPをTATAボックスに送り込むことにより転写を活性化すると考えているが、その詳細については未だ不明な点が多い。

出芽酵母の*SSD1*には、野生型*SSD1-V*とナンセンス変異 (Y698stop)をもつ*ssd1-d*の二種類のアレルが存在する。これらのアレルの違いは、細胞周期のみならず、偽菌糸形成・熱ショック耐性・細胞内輸送・細胞極性・細胞寿命等、様々な生命現象に関与する遺伝子の変異の表現型に違いを与えることから、*SSD1*は多機能性因子と呼ばれている。Ssd1p (全長1250 aa)はRNA結合モチーフ (RNB; 693-911 aa)を有し、実際種々のmRNAと結合することが明らかにされつつある。またRNAポリメラーゼII (pol II)の最大サブユニットであるRpb1pのC末端領域 (CTD)ともリン酸化型CTD相互作用ドメイン (PCID; 1-240 aa)を介して結合するとされているが、転写への寄与については長らく不明であった。一方、基本転写因子TFIIDは、コアプロモーターに結合し、転写制御を行うとされているが、個々のサブユニットの機能についてはまだよく分かっていない。また類縁複合体であるSAGAはTFIIDと重複した機能を持つとされているが、両者の機能分担については不明な点が多い。我々は、*TAF1*の温度感受性 (TS)アレル (*taf1-N568delta*)を単離し、他のグループにより単離されたTSアレルとの比較を行った結果、G1サイクリン的一种である*CLN2*の転写阻害が後者においてのみ

強く起こることを見出した。またこの違いは*TAF1*アレルの違いではなく、両研究において用いられた酵母株の*SSD1*アレルの違い (*SSD1-V* vs. *ssd1-d*)に起因することを明らかにした。さらに詳細な解析を行った結果、(i)TFIID, SAGAは同一のプロモーターから各々異なる機能を有する*CLN2* mRNAを産生すること、(ii)*CLN2* mRNA[SAGA]はSsd1p依存的に転写され、分解から保護されるとともに、RAM (Regulation of Ace2p activity and cellular Morphogenesis)シグナル経路による局所翻訳制御を受けることが強く示唆された。上記の背景のもと、*CLN2* mRNAの作り分け (TFIID or SAGA)の分子機構の解明を主たる目的として本研究を進め、所定の成果を得たので以下に報告する。

## 2. 研究の目的

基本転写因子TFIIDはTATAボックス結合タンパク質 (TBP)と14種類のTBP随伴タンパク質 (TAF)から構成される巨大なタンパク質複合体であり、その類縁複合体であるSAGA (16種類のサブユニットのうち、5種類のTAFをTFIIDと共有する)とともにコアプロモーター上で働き、TBP-DNA相互作用を制御することによって転写の活性化を行う。最近我々は、同一のプロモーターからTFIIDまたはSAGAによって転写される*CLN2* mRNAが、全く同じ一次構造を有するにもかかわらず、機能の異なる二種類のCln2pに翻訳される可能性を示した (*Genes Cells*, vol.15, p1169, 2010)。従来の常識では、同一の一次構造を有するmRNA (5'/3'-UTRを含めて全てが同じ塩基配列から構成されるmRNA)から機能の異なるタンパク質が産生されることはあり得ない。そこで本研究では、上記の可能性をさらに検証するとともにTFIIDとSAGAによるmRNAの運命決定機構を解明し、新規コンセプトの確立さらには新研究分野の創成を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 出芽酵母株の作製と培養

PCR法により増幅したDNA断片 (栄養要求性を相補する遺伝子もしくは各種薬剤耐性遺伝子を含む)を直接出芽酵母細胞に形質転換することにより、目的の出芽酵母株 (以下酵母株)を作製した。必須遺伝子を欠失する酵母株を作製する場合には、プラスミドシャフリング法を用いた。作製した酵母株の培養は、YPD, SC, SD液体培地もしくは同寒天培地を用いて行った。

### (2) ノザンプロット解析

ホットフェノール法により全RNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動により分離後、ニト

ロセルロース膜にトランスファーした。各種プローブをランダムプライム法により  $^{32}\text{P}$  標識し、ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後イメージングプレートに感光させ、BAS2500 (富士フィルム) を用いてシグナルの検出・定量を行った。

#### (3) プライマー伸長法

ホットフェノール法により抽出した全 RNA 画分もしくは試験管内で生成した転写反応産物に対して  $^{32}\text{P}$  標識したプライマーを添加し、AMV reverse transcriptase XL による逆転写反応を行った。逆転写産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、イメージングプレートに感光させ、BAS2500 を用いてシグナルの検出・定量を行った。

#### (4) 新規レポーターアッセイ法

レポーター遺伝子 (*VTC1*) の上流に測定対象となるプロモーターを組み込み、マルチウエルプレート (96 穴) にて酵母株を終夜培養した。80%エタノール処理により細胞を固定した後、0.1%トルイジンブルー染色を行った。蒸留水で洗浄後、 $\text{OD}_{638\text{nm}}$  と  $\text{OD}_{410\text{nm}}$  を測定し、その比 (前者はポリリン酸量、後者は細胞量と相関する) によりプロモーター活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規レポーターシステムの開発と *CLN2* プロモーター解析への応用

本研究では、*VTC1* をレポーター遺伝子とし、酵母株の細胞内に蓄積したポリリン酸をトルイジンブルー染色することにより、高感度かつハイスループットにプロモーター活性を測定する新規レポーターシステムを確立した。

*CLN2* プロモーターの TATA ボックスをランダム化し、本法を用いて転写活性を付与する配列を探索したところ、他のプロモーター (e.g. *CYC1*) の場合とは異なる配列が複数種単離された。今後はこれらの配列について、*CLN2* mRNA の作り分け ([TFIID] or [SAGA]) が可能か検証を進める予定である。

#### (2) *CLN2* 転写における TAND の機能解析

TBP 制御領域である TAND の *CLN2* 転写への寄与を調べたところ、(i) TAND 欠失変異体 (*taf1-deltaTAND*) 株において、Ssd1p 依存的に分解から保護される *CLN2* mRNA[SAGA] 量が有意に増加すること、(ii) RAM シグナル経路の各種変異は *taf1-deltaTAND* 変異に対して特異的な合成致死性を示すこと、さらに、(iii) 当該合成致死性は Ssd1p とは異なる他の RNA 結合タンパク質の変異により抑圧されることが明らかとなった。以上の結果は、TAND が *CLN2* mRNA の作り分け ([TFIID] or

[SAGA]) に関与すること、ならびに *CLN2* mRNA[SAGA] は複数の RNA 結合タンパク質によって制御され得ることを示している。

#### (3) TAND-TBP 複合体の構造解析

出芽酵母の TAND は、TBP の concave 側に結合する TAND1 (10-37aa) と convex 側に結合する TAND2 (46-71aa) という二種類の機能ドメインから構成される。本研究では、海外の研究グループとの共同研究により、TAND1-TAND2-TBP 複合体の構造を決定した。得られた構造から、(i) TAND1 は TATA ボックスの一部の構造を分子的に擬態すること、(ii) TAND2 は TFIIA/Brf1/Mot1 と同様に TBP 上の特定部位を認識することが明らかとなった。

以上の結果ならびに前項の結果は、TAND/TFIIA/Brf1/Mot1 に共通する未知の TBP 活性制御機構が、*CLN2* mRNA の作り分け ([TFIID] or [SAGA]) に関与する可能性を示唆している。

#### (4) *CLN2* 転写における RAM の機能解析

Ssd1p は RAM シグナル経路の下流に位置すると考えられており、*CLN2* mRNA[SAGA] は RAM-Ssd1p により局所的な翻訳制御を受けている可能性が高い。そこで、RAM シグナル経路の最終エフェクターキナーゼである Cbk1p の活性変動が、*CLN2* mRNA[SAGA] 量に及ぼす効果について調べた。

Cbk1p の活性を自在に制御し得る *cbk1-as2* 株を作製し、1-NA-PP1 (Cbk1p[as2] に対する特異的な阻害剤) 存在下における安定化型 *CLN2* mRNA[SAGA] の蓄積量を調べたところ、当該 mRNA は顕著に増加することが明らかとなった。また逆に *cbk1-S745F* 株 (構成的活性化型変異株) では有意に低下していたことから、*CLN2* mRNA[SAGA] の産生ならびに当該 mRNA の局所翻訳制御においても、Ssd1p は RAM シグナル経路の下流に位置するものと考えられる。

### 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 5 件)

Watanabe K, Yabe M, Kasahara K, Kokubo T; A random screen using a novel reporter assay system reveals a set of sequences that are preferred as the TATA or TATA-Like elements in the *CYC1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. ; *PLoS One*. 2015 Jun 5;10(6): e0129357. doi:10.1371/journal.pone.0129357. 査読有

Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirota-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y.; A novel quantitative

hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan.; *PLoS One*. 2015 May 7;10(5):e0124655. doi: 10.1371/journal.pone.0124655. 査読有

Maeshima K, Kaizu K, Tamura S, Nozaki T, Kokubo T, Takahashi K.; The physical size of transcription factors is key to transcriptional regulation in chromatin domains.; *J Phys Condens Matter*. 2015 Feb 18;27(6):064116. doi: 10.1088/0953-8984/27/6/064116. 査読有

Higashino A, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kokubo T, Kasahara K.; Both HMG boxes in Hmo1 are essential for DNA binding *in vitro* and *in vivo*.; *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79(3):384-93. doi: 10.1080/09168451.2014.978258. 査読有

Anandapadamanaban M, Andresen C, Helander S, Ohyama Y, Siponen MI, Lundström P, Kokubo T, Ikura M, Moche M, Sunnerhagen M.; High-resolution structure of TBP with TAF1 reveals anchoring patterns in transcriptional regulation. ; *Nat Struct Mol Biol*. 2013 Aug;20(8):1008-14. doi: 10.1038/nsmb.2611. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

渡邊清、矢部誠、古久保哲朗；ハイスルー  
ット型レポーターシステムを用いた出芽酵母  
由来の新規コアプロモーターエレメントの同定及  
びその機能解析；日本蛋白質科学会年会。  
2014.6.27., 横浜

岩見亮、大山良文、高井直樹、古久保哲朗；  
出芽酵母において *gal2* 変異とミトコンドリア機能  
阻害が誘起するガラクトース培地特異的な生育  
阻害効果；日本分子生物学会第37回年会。  
2014.11.26., 横浜

高井直樹、大山良文、古久保哲朗；二種類  
の異なる機能を持つG1サイクリンCln2pの転  
写段階での運命決定；転写研究会・転写サイ  
クル・転写代謝システム共催「冬の若手ワー  
クショップ2014」2014.1.31., 軽井沢

矢部誠、大山良文、高井直樹、古久保哲朗；  
出芽酵母におけるTFIIDを介したGAL遺伝子  
群の脱抑制機構；日本分子生物学会第36回  
年会。2013.12.3., 神戸

東野綺子、雲財悟、中山理紗、土屋奈穂、  
吉川博文、古久保哲朗、笠原浩司；リボソ  
ーム構成因子の発現調節に関わる酵母Hmo1  
タンパク質のDNA結合機構；日本分子生物  
学会第36回年会。2013.12.4., 神戸

茂呂華奈子、古久保哲朗、和田忠士；母性  
mRNAの3'非翻訳領域を標的としたアンチセ  
ンスモルフォリノオリゴによるpoly(A)鎖短小  
化機構の解析；日本分子生物学会第35回  
年会。2012.12.14., 福岡

〔図書〕(計3件)

T. Kokubo: Essay; Mechanisms of  
Transcriptional Activation and Repression  
(p1210-1217). Definitions; Activation Domain  
Shielding (p4-6), ATAC (p49-50), Chromatin  
Helicase DNA binding (CHD) (p402-404),  
INO80 (p1033-1035), ISWI (p1058-1060),  
Mammalian HDAC (p1173-1174), PIC  
Disassembly (p1715), Set3C (p1932-1933),  
TAND (p2121-2122), Tra1p  
(p2218-2219): *Encyclopedia of Systems Biology*,  
W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. H. Cho, H.  
Yokota (Eds.), Springer Science + Business  
Media LLC. (2013)

T. Kokubo: Essay; Transcription in Eukaryote  
(p2239-2245). Definitions; Cofactors (p436-437),  
Core Promoter Elements (p502-504), General  
Transcription Factors (p813-814), Mediator  
(p1217-1218), PIC Assembly Pathways  
(p1714-1715), RNA Polymerase I, II and III  
(p1862-1863), SAGA (p1890-1891), Type 3  
Promoters (p2306-2307): *Encyclopedia of  
Systems Biology*, W. Dubitzky, O. Wolkenhauer,  
K. H. Cho, H. Yokota (Eds.), Springer Science +  
Business Media LLC. (2013)

T. Kokubo: Essay; Transcription Initiation in  
Eukaryote (p2245-2251). Definitions;  
Immobilized Template Assay (p989-990),  
Phosphodiester Bond Formation (p1702-1703),  
Stalk of RNAPII (p1982-1984), TAF Paralogs  
(p2120-2121), TFIIA-Like Factor (ALF) (p2163),  
TRF1 (p2299-2300), TRF2 (p2300-2301), TRF3  
(p2301-2302): *Encyclopedia of Systems Biology*,  
W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. H. Cho, H.  
Yokota (Eds.), Springer Science + Business  
Media LLC. (2013)

〔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://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/dmcb/  
index2.html](http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/dmcb/index2.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

古久保 哲朗 (KOKUBO TETSURO)  
横浜市立大学大学院生命医科学研究科・教授  
研究者番号：10271587

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし