

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370077

研究課題名(和文) 基本転写因子TFIIDによるコアプロモーター認識機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of core promoter recognition by general transcription factor TFIID

研究代表者

古久保 哲朗 (Kokubo, Tetsuro)

横浜市立大学・その他の研究科・教授

研究者番号：10271587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円、(間接経費) 4,590,000円

研究成果の概要(和文)：基本転写因子TFIIDがコアプロモーター配列(CE)を認識し、特定の塩基対から転写を誘導する分子機構の詳細は未だ不明である。我々は独自にハイスループット型の遺伝子発現定量システムを開発し、出芽酵母由来のCYC1コアプロモーター内にランダム変異を導入することによって新規CEを複数同定することに成功した。またTBP機能阻害ドメインであるTANDとTBPの複合体について構造解析を行い(海外のグループとの共同研究)、転写活性化機構に関して新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：TFIID, the largest GTF composed of TBP and 14 TAFs, plays a critical role in transcription from TATA-less promoters. In metazoans, several core promoter elements (CE) other than the TATA element are thought to be recognition sites for TFIID. However, it is unclear whether functionally homologous elements also exist in TATA-less promoters in yeast.

Here we develop a novel high-throughput screening system to measure gene expression in yeast by using VT C1 as a reporter gene. This method allows us to isolate several active and novel CE by screening a randomized oligonucleotide pool for the CYC1 promoter. The TAF N-terminal domain (TAND) of the TAF1 protein plays a significant role in transcriptional activation. TAND comprises two subdomains, TAND1 and TAND2, which interact with the concave and convex surfaces of TBP, respectively. In collaboration with other groups, we determine the crystal structure of the TAND-TBP complex that provides a novel insight into transcriptional activation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：転写調節 転写因子 基本転写因子 転写開始 出芽酵母 TFIID TAF TBP

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発芽酵母を用いて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; TAF 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。

一方、TFIIDが転写開始点を正しく選択する分子機構については、これまで他の研究グループを含め、あまり有用な知見は得られていない。発芽酵母の場合、2004年にTATAボックスのコンセンサス配列が初めて決定されたが、それ以外のコアプロモーター配列(CE; core promoter element)に関する知見はほとんど存在せず、TFIIDがTATA-lessプロモーターをどのようにして認識するのかは依然として大きな謎である。また発芽酵母の場合、TATAボックスと転写開始点の距離は遺伝子ごとに様々であり(40~120bp)、一定の距離(~25bp)から転写が始まる動物細胞とは好対照を成すが、この種間の差違を明確に説明し得る分子モデルは未だ存在しない。上記の背景のもと、TFIIDによって認識される新規CE配列の同定ならびにTANDの分子機能の解明等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随伴因子(TAFs)から構成されるタンパク質複合体であり、コアプロモーター結合能(正しい位置から転写を開始させる能力)及び転写活性化能(転写調節因子に应答して転写量を調節する能力)を有する。真核細胞においてこれらの両機能を有する因子はTFIIDのみであることから、その作用機序の解明は極め

て重要と考えられる。そこで本研究では、独自の遺伝子発現定量システムを開発し、TFIIDによって認識される新規CE配列の網羅的同定を試みるとともに、TANDによるTBP機能制御の分子基盤の解明、さらにはTFIID類縁複合体であるSAGAとの機能分担に関して新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 発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)を直接発芽酵母細胞に形質転換することにより、目的の発芽酵母株(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³²P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³²P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. 研究成果

(1) ポリリン酸蓄積量に基づく新規遺伝子発現定量システムの開発とその応用

本研究では、ポリリン酸ポリメラーゼのサブユニットの一つであるVTC1をレポーター遺伝子とし、発芽酵母の細胞内に蓄積したポリリン酸をトルイジンブルー(TB)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し得る新規アッセイ法を確立することに成功した。

CYCIコアプロモーターを主な対象とし、本法を用いて詳細なシス配列解析(ランダム配列プールからの転写活性強度に基づくスクリーニング)を行ったところ、TATAボックスのコンセンサス配列として知られるTATAWAWRとは明らかに異なる新規CEを複数同定することに成功した。これらの中に

は、TFIIDに依存して転写される配列が含まれており、実際当該配列は、複数のアデニン合成関連遺伝子のプロモーターにおいてCE機能を担うことも明らかとなった。また他遺伝子 (e.g. *CLN2*) のプロモーターに対しても同様の解析を行い、プロモーター特異的なCE配列が存在することを強く示唆する結果を得た。今後は、本手法の適用により同定した複数の新規CEに対してTFIID, SAGA依存性を詳しく調べるとともに、試験管内転写反応系を併用することにより、両コア因子複合体を介した転写開始機構の違いを分子レベルで明らかにしていきたいと考えている。

(2) 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共同研究を行うことにより、TAND-TBP複合体の構造を1.97 Åの解像度で決定することに成功した。その結果、出芽酵母の場合も、ショウジョウバエ (TAND1-TBP複合体の構造を1998年に決定済み)と同様、TAND1がTATA配列を分子的に擬態することによりTBPに結合していることが明らかとなった。またTBPのconvex側のTAND2との相互作用表面は、Mot1, TFIIA, Brf1との相互作用表面とも重複していたことから、これらの転写因子は共通の分子機構によりTBPの機能を制御するものと考えられる。

(3) *PGK1* 転写における TFIID, SAGA, TATAボックスの機能解析

5種類のサブユニット (TAF5, 6, 9, 10, 12) をTFIIDと共有するSAGAは、ヒストンをアセチル化するとともにTBPのTATA配列への結合を補助する働きを有するTFIID類縁複合体である。コアプロモーター中にTATAボックスを含むストレス誘導性遺伝子ならびにTATAボックスを含まないハウスキーピング遺伝子はそれぞれSAGA, TFIIDによって転写されると考えられているが、その詳細については不明な点が多い。

本研究では、TATAボックスを有する*PGK1*プロモーターを対象とし、TFIIDとSAGAがどのように転写に関与するのかを詳しく調べた。その結果、(i) 約半量の転写がTATAボックスに依存する (残りの半量はTATAボックスに依存しない) こと、(ii) TATAボックスの有無にかかわらず、約60-70%の転写がSAGA依存的に起こること、(iii) 温度感受性*taf1*株においてもTATAボックス非依存的な転写量の低下が見られないこと等が明らかとなった。(iii)は、TATA-less転写がTFIID非依存的に起こり得る可能性を示しており、大変興味深い。また温度シフト後のキネティックを詳しく調べたところ、TFIIDがSAGA依存的なTATA転写を負に制御していることも明らかとなった。今後は、これらの結果を

TFIID, SAGAのプロモーター結合の観点からも確認するべく、ChIP法による解析を進めていきたいと考えている。

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)

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

Yamamoto-Suzuki Y, Sakurai Y, Fujimura Y, Matsumoto M, Hamako J, Kokubo T, Kitagawa H, Kawsar SM, Fujii Y, Ozeki Y, Matsushita F, Matsui T. ; Identification and recombinant analysis of botrocetin-2, a snake venom cofactor for von Willebrand factor-induced platelet agglutination. ; *Biochemistry*. 2012 Jul 3;51(26):5329-38. 査読有

Kano C, Ouchida R, Kokubo T, Wang JY. ; Rapid cell division contributes to efficient induction of A/T mutations during Ig gene hypermutation. ; *Mol Immunol*. 2011 Sep;48(15-16):1993-9. doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.218. 査読有

Kato Y, Kawasaki H, Ohyama Y, Morishita T, Iwasaki H, Kokubo T, Hirano H. ; Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. ; *Genetics*. 2011 Aug;188(4):871-82. doi: 10.1534/genetics.111.128231. 査読有

Kasahara K, Ohyama Y, Kokubo T. ; Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. ; *Nucleic Acids Res*. 2011 May;39(10):4136-50. doi: 10.1093/nar/gkq1334. 査読有

[学会発表] (計10件)

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

大山良文、和田忠士、古久保哲朗；出芽酵母のTFIIDとSAGAは細胞の極成長に関わるRAMシグナル経路と遺伝学的に相互作用する；新学術領域研究「転写代謝システム」・転写研究会共催「若手ワークショップ@湯河原」2012.2.9., 湯河原

渡邊清、矢部誠、古久保哲朗；出芽酵母における新規ハイスループット型プロモーター活性測定法の開発とその応用；新学術領域研究「転写代謝システム」・転写研究会共催「若手ワークショップ@湯河原」2012.2.9., 湯河原

古久保哲朗；基本転写因子TFIIDの機能発現における天然変性領域の役割；新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第2回公開シンポジウム. 2012.1.24., 大阪

大山良文、和田忠士、古久保哲朗；TFIID and SAGA regulate the fate of *CLN2* mRNA cooperatively with the RAM signaling network；日本分子生物学会第34回年会. 2011.12.15., 横浜

笠原浩司、大山良文、古久保哲朗；Novel regulatory mechanism for transcriptional initiation of ribosomal protein genes in *S. cerevisiae*；日本分子生物学会第34回年会. 2011.12.15., 横浜

渡邊清、古久保哲朗；A novel high-throughput screening system to measure gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*；日本分子生物学会第34回年会. 2011.12.15., 横浜

〔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：
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/mcbl/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 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：