

令和元年6月14日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07265

研究課題名(和文) 基本転写因子TFIIEを中心とした転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Structural Study of basal transcription factor TFIIE

研究代表者

帯田 孝之(Obita, Takayuki)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：30578696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現や制御は、細胞の分化や恒常性の維持など生命現象の根幹をなす重要なステップであり、その転写制御に多くの基本転写因子が関わっている。中でもTFIIEは、RNAポリメラーゼIIを中心とした転写開始複合体の形成に必須の役割を果たしている。本研究では、ヒトTFIIEの結晶構造を決定し、サブユニット・アルファとベータがどのように相互作用しているかを原子レベルの精度で明らかにした。また、その相互作用が、酵母の成育に必須であったことから、幅広い種で保存されていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、基本転写因子TFIIEの結晶構造を原子レベルの精度で明らかにした。このことにより、基本転写因子がどのようにRNAポリメラーゼを制御しているかについて、そのメカニズムの一端を明らかにすることができた。また、基本転写因子は、古細菌からヒトまで幅広く保存されたタンパク質群であり、その詳細な構造からその機能を明らかにすることで、生物に普遍的に存在するDNAからRNAへの転写機構について、学術的に貢献できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, RNA polymerase II requires general transcription factors to initiate mRNA transcription. We have determined the crystal structure of human TFIIE at atomic resolution. In addition, mutations on the residues involved in the interactions resulted in severe growth defects in yeast. These findings provide a structural basis for understanding the functional mechanisms of TFIIE in the context of PIC formation and transcription initiation.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 基本転写因子 TFIIE ITC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転写は、セントラルドグマの最初のステップであり、ゆえに生命現象の中心を担う過程であるといえる。ヒトの細胞において転写は主に RNA ポリメラーゼ II によって行われ、その転写の開始や伸長を制御する様々なメカニズムが明らかになってきている。基本転写因子 (TBP、TFIIA、TFIIB、TFIIF、TFIIE、TFIIH など) は、RNA ポリメラーゼ II による転写開始前複合体 (Preinitiation Complex) の形成に必要であり、転写開始点の認識から伸長まで幅広く制御している。ヒトにおいて、遺伝子のプロモーター領域に TATA ボックスと呼ばれる DNA 配列が存在する場合、まず TBP (TATA box binding protein) が転写開始点の約 30bp 上流にある TATA 配列を認識する。TBP が DNA に結合することにより、二本鎖 DNA は適切な角度に曲げられ、さらに TFIIA がその結合を安定化させることで転写の起点となると考えられている。TFIIB は、TATA ボックス近傍の DNA と結合すると同時に、RNA ポリメラーゼ II と結合することによって DNA 上へと誘導する。TFIIF は、おそらく TFIIB と結合することにより、TFIIB と RNA ポリメラーゼ II の結合を安定化する因子と考えられている。近年、電子顕微鏡の発展に伴い、以前よりも分解能の高いコア転写複合体構造が明らかとなっており、TFIIF の位置についてもほぼ確定している。TFIIH は、二つのヘリカーゼと一つのキナーゼを含む 10 個のサブユニットからなる複合体であり、DNA 二本鎖をほどき転写の伸長に機能をもっている。TFIIE は、まず TFIIH を RNA ポリメラーゼ II 複合体へと誘導する役割が明らかとなっている。しかしながら、TFIIE がどのように RNA ポリメラーゼ複合体へと誘導されるかなど、機能的に不明な点が多い。興味深いことには、ヒトよりも単純な RNA ポリメラーゼ転写開始前複合体を形成すると考えられている古細菌 (スルフォバクテリウム属) には、TBP、TFIIB、TFIIE のオルソログしか見つかっておらず、TFIIE が RNA ポリメラーゼの転写制御において決定的に重要な役割を果たしていることが予想されている。

2. 研究の目的

本申請では、基本転写因子 TFIIE の立体構造を明らかにするとともに、他の転写因子との相互作用を明らかにして、TFIIE を中心とした RNA ポリメラーゼ II の転写制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。基本転写因子 TFIIE は、alpha と beta の二つのサブユニットからなり、分子量約 83kDa のヘテロ 2 量体を形成すると考えられている。申請者はまず 1) TFIIE-alpha/beta 複合体の立体構造を明らかにすることで、その相互作用の詳細を明らかにする。このことにより TFIIE のコア構造を決定することができ、例えば電子顕微鏡構造 (図 3) などの比較的分解能の電子密度にあてはめることで、RNA ポリメラーゼ上における TFIIE 位置を特定することや、その役割に関して知見を得ることができる。TFIIE の役割の一つは TFIIH を転写開始複合体へと誘導することであるが、最も大きな謎は何が TFIIE を RNA ポリメラーゼへと誘導するのか、という点である。そこで次に、2) TFIIE と他の基本転写因子との相互作用を明らかにすることで、転写開始複合体の形成メカニズムを明らかにする。古細菌 (スルフォバクテリウム属) にもオルソログとなる RNA ポリメラーゼが存在し、基本転写因子群として TBP、TFB (TFIIB)、TFE (TFIIE) などが見つかっている。一般に古細菌はヒトを簡素化したシステムを持つと考えられており、その単純な転写開始複合体に TFE (TFIIE) が保存されているというのは、大変興味深い事実である。そこで、3) 古細菌 TFE (TFIIE) の立体構造決定、および保存されている他の転写因子群との相互作用解析を行うことで、転写制御メカニズムについてヒトと古細菌の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト基本転写因子群とその古細菌 (*Sulfolobus* 属) のオルソログについて数十を超える発現系の作成、およびタンパク質の精製を行う。さらに Biacore を用いた相互作用解析を行い、ヒト TFIIE サブユニット間の結合親和性を決定することや、その複合体の結晶について、良好な反射データを得る。その後、ヒト TFIIE サブユニット複合体の結晶最適化、その立体構造の精密化、ならびに Biacore や ITC を用いた相互作用実験をまず行う。次に、ヒト TFIIE を中心に、他の基本転写因子 (TFIIF、TFIIH など) との相互作用ネットワークを、表面プラズモン共鳴や等温滴定カロリメトリーを用いて解明する。さらに、得られた相互作用のドメイン境界をもとに複合体の結晶構造に順次取り組むことを計画している。また、古細菌に保存されている基本転写因子についても同様の相互作用解析、結晶構造解析に取り組み、種を超えて保存されている転写調節機構についても解明する。

・ X線結晶構造解析

ヒト TFIIE-alpha/beta 複合体の結晶について、コンストラクトを調整することや、結晶化条件を改善することなどにより、良好な結晶を得る。X線結晶構造解析における位相決定には、セレノメチオニン置換による MAD 法や、TFIIE 複合体に配位している亜鉛イオンを利用した SAD 法などを考えている。そこでまず、放射光施設において強力なビームと可変波長により、セレノメチオニン置換型の結晶や、野生型 (Zn²⁺を含む) 結晶についての反射データを取得する。その後、上記 MAD/SAD 法により位相を決定し、高分解能での構造精密化を行う。古細菌の TFE-alpha と TFE-beta については、結晶の最適化や精製条件の検討などを行うことにより、より大きなサイズの結晶を得る。それらにより高分解能のデータが得られれば、分子置換法や MAD/SAD 法により位相を決定して、構造解析を進める。

・相互作用解析

ヒト TFIIIEalpha と TFIIIEbeta サブユニット間の相互作用解析を行う。結晶構造解析結果も有効に使用して、単点変異体等をうまく利用して相互作用の詳細を明らかにする。次に、TFIIIE と他の基本転写因子である TFIIIB、-F、-H 等との相互作用解析を行う。これらの分子についても発現系作成・タンパク質精製・予備的な結合実験は既に開始している。また、古細菌のオルソログである、TFEalpha (TFIIIEalpha)、TFEbeta (TFIIIEbeta)の相互作用解析を開始する。ヒト TFIIIE と他の基本転写因子である TFIIIB、-F、-H 等との相互作用解析、古細菌 TFEalpha と TFEbeta の相互作用解析。

4. 研究成果

ヒト基本転写因子群とその古細菌のオルソログについて数十を超える発現系の作成、およびタンパク質の精製を行った。続いて表面プラズモン共鳴や等温滴定カロリーメトリーを用いた相互作用解析を行い、ヒト TFIIIE サブユニット間において解離定数約 0.2 micro M の結合力で結合することを明らかにした。また、様々な長さのタンパク質を用いて相互作用解析することで、それぞれのサブユニットの結合境界を同定することに成功した。さらに、ヒト TFIIIE 複合体の結晶化を行い、放射光施設 SPring8 で良好な反射データ(約 2 オングストローム)を得ることに成功した。得られたデータを用いて SAD 法によって位相を決定し、精密化を行うことで TFIIIE 複合体の結晶構造を決定した。また、古細菌 TFE の結晶化を行い、約 2 オングストロームの分解能で構造決定に成功した。また、DNA ゲルシフトアッセイを行い、ヒト TFIIIE 複合体と二本鎖 DNA との相互作用を解析した。その結果、ヒト TFIIIE のアルファとベータの両サブユニットが複合体を形成することによって、DNA との相互作用が強くなることを明らかにした。さらに、ヒト TFIIIE 複合体の変異体を作成し、DNA との結合を調べた。その結果、DNA との結合に重要ないくつかのアミノ酸を同定した。酵母において、それらのアミノ酸が保存されており、アミノ酸に変異を加えることでその成長に阻害が見られることを明らかにした。

本研究により得られた結果の一部は、Journal of Molecular Biology 誌に発表し、Nature 誌を始めとする一流誌に掲載された論文から引用を受けるなど、世界的にもインパクトのある研究となった。また、未発表のデータに関しても、古細菌の TFE の結晶構造を決定するなど、大きなインパクトがあると考えている。これまで、真核細胞を中心に研究されてきた分野であるが、我々の研究成果をふまえて、今後は古細菌においても世界中で研究が進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Crystal Structure of Human General Transcription Factor TFIIIE at Atomic Resolution. Miwa K, Kojima R, Obita T, Ohkuma Y, Tamura Y, Mizuguchi M. J Mol Biol. 2016 Oct 23;428(21):4258-4266. doi: 10.1016/j.jmb.2016.09.008.

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 帯田孝之 . 基本転写因子 TFIIIE の構造生物学的研究 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ; 2017 年 12 月 6 日 ~ 9 日 ; 神戸 .
- 2) 三輪康平, 帯田孝之, 大熊芳明, 水口峰之 . 古細菌由来基本転写因子 TFE の X 線結晶構造解析 . 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 ; 2017 年 11 月 26 日 ; 金沢 .
- 3) 三輪康平, 小島理恵子, 帯田孝之, 大熊芳明, 田村康, 水口峰之 . ヒト基本転写因子 TFIIIE ヘテロ二量体の構造基盤研究 . 日本薬学会北陸支部第 128 回例会 ; 2016 Nov 27 ; 金沢 .
- 4) 三輪康平, 小島理恵子, 帯田孝之, 大熊芳明, 田村康, 水口峰之 . ヒト基本転写因子 TFIIIE 複合体の X 線結晶構造解析 . 第 89 回日本生化学会大会 ; 2016 September 25-27 ; 仙台

〔図書〕(計0件)

〔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 :
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/phypha2/index-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。