

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07277

研究課題名(和文) ヒトRNAポリメラーゼIIと基本転写因子TFIIHのNMR法による複合体構造解明

研究課題名(英文) Structural study for the complex between human RNA polymerase II and the general transcription factor TFIIH by NMR

研究代表者

奥田 昌彦 (Okuda, Masahiko)

横浜市立大学・生命医科学研究科・特任准教授

研究者番号：60448686

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)：基本転写因子TFIIHのサブユニットp62は様々な因子と結合しTFIIHを機能部位へリクルートする重要な役割をもつ。我々は、これまでに決定したTFIIH、p53、XPCとの複合体構造の情報を活用し、p62の新たな標的としてRNAポリメラーゼII (Pol II) のサブユニットを見出した。本研究において、我々はPol IIサブユニットの構造、及びp62との複合体の構造をNMRで決定し認識機構を明らかにした。また、結合に重要なPol IIサブユニットの残基をアラニンに置換した変異体に対しNMRやITCでp62との結合を調べた結果、結合能の大きな低下がみられ複合体構造の妥当性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子情報の読み出し(転写)は生命の根幹をなす極めて重要な反応であり、その機構の解明には転写装置の立体構造情報が不可欠なため、世界中で精力的に構造研究が進められている。今回の我々の結果は、TFIIHとPol IIの相対配置に関する構造情報を提供するものであり、世界で進行中の転写装置の構造モデル化、反応機構の解明に多大に貢献する。

研究成果の概要(英文)：A subunit of the general transcription factor TFIIH, p62 plays an important role in recruiting TFIIH to functional sites by binding to various transcription and DNA repair factors. We have utilized structural information on the complexes of p62 with the binding partners: the general transcription factor TFIIH, the tumor suppressor p53 and the DNA repair factor XPC, and identified a new partner, a subunit protein of RNA polymerase II (Pol II). In this study, we have determined the structures of the Pol II-subunit and its complex with p62 by using NMR and revealed the recognition mechanism. Furthermore, we have prepared several Pol II-subunit mutants, in which residues important for the binding are replaced with alanine and performed binding analyses for the mutants by using NMR and ITC. Remarkable loss of the binding ability of the mutants has validated the structure we solved.

研究分野：構造生物学

キーワード：基本転写因子 RNAポリメラーゼ 複合体 NMR 立体構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子情報の読み出し(転写)は生命の根幹をなす極めて重要な反応であり、その機構の解明には転写装置の立体構造情報が不可欠なため、世界中で精力的に構造研究が進められている。転写装置は、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と 5 つの基本転写因子 (TFIIB, TFIID (TBP), TFIIE, TFIIIF, TFIIH) から構成される。2001 年に酵母の Pol II の構造が解かれて研究は大きく前進し、さらに TBP、TFIIB、TFIIF が Pol II に結合した構造のモデル化までは順調に進んだ。しかし、次の TFIIE や最後に加わる TFIIH は、分子の複雑さや溶解性の理由から複合体の構造情報が乏しく、それをどのように得るかが、転写装置の完全構造モデル化への最重要課題となっている。

TFIIE は、サブユニットからなる二量体である。X 線結晶回折法では結晶が得られず、NMR 法では高分子量、難溶性の問題から研究が停滞していた。しかし、構造様式を調べたところ、いくつかのドメインがリンカーで結ばれたピース様構造であることが分かった為、TFIIE のコアドメイン、酸性ドメイン、および TFIIE のコアドメインの構造を NMR 法で解いた。このうち、TFIIE の C 末端の酸性ドメインは、転写装置形成時に 10 個の異なるタンパクから成る TFIIH をリクルートする役割を担う。しかし、詳細は不明であったので、その標的が TFIIH の p62 サブユニットであることを突き止め、両ドメインの複合体構造を NMR 法で決定し、リクルート機構を解明した。

p62 は、様々なタンパクと結合して TFIIH を適所に導く重要な役割を担う。また、TFIIE の他にも腫瘍抑制因子 p53 などの多くの転写活性化因子やウイルスの転写活性化因子に結合する。TFIIH は DNA 修復にも機能するが、その時には p62 はヌクレオチド除去修復因子 XPC に結合する。なぜ p62 は、多くのタンパクと、しかも特異的に結合できるのだろうか？ 我々は、p62 と p53 との複合体、XPC との複合体の構造を決定し、その答えを出した。結合によらず不変である p62 の結合ドメインの構造に対して TFIIE α 、p53、XPC は皆、p62 の結合表面に最適に相補するように天然変性領域から構造を誘起し、5~13 個の酸性残基、1 個の芳香環残基、1 個の疎水性残基を使い、非常に類似した相互作用で結合していた。

この共通した結合規則を活用すれば p62 の新規の標的を同定できると考え、アミノ酸配列のホモロジー検索を行った結果、Pol II の 12 サブユニットの中の 1 つ(以下、Pol II-sub と表記。)が検出された。実際に Pol II-sub は p62 に NMR 法で複合体として構造決定するのに十分な強さで結合した。

2. 研究の目的

転写装置の完全構造モデル化に必須の Pol II と TFIIH の相対配置情報を得るために、本研究では、Pol II-sub と TFIIH p62 の複合体構造を NMR 法で決定し、認識機構を明らかにする。また、Pol II-sub の変異体解析から構造と結合活性の相関を調べ、決定した構造を評価する。

3. 研究の方法

本研究は申請者がひとりで行う。Pol II-sub と TFIIH p62 PH ドメインの複合体構造を NMR 法により決定し、認識機構を明らかにする。NMR 測定試料を調製後、一連の多次元 NMR 測定を高磁場 NMR 装置で行う。スペクトルを解析し、シグナルを帰属後、距離および角度制限情報を収集する。これらを入力情報として立体構造計算を行い、算出された初期構造を精密化し最終構造を決定する。また、分子間の相互作用に重要な Pol II-sub の残基に変異を導入し、結合能の変化を等温滴定型カロリメーター(ITC)や NMR で調べ、構造の妥当性を評価する。

(1) NMR 測定試料の調製

(2) ^{13}C , ^{15}N 標識 p62 と非標識 Pol II-sub の複合体試料を用いた、複合体中の p62 の多次元 NMR 測定、解析

(3) 複合体中の p62 の立体構造計算、初期構造の算出

(4) 複合体中の p62 の構造の精密化、及び最終構造決定

(5)~(7) 複合体中の Pol II-sub の構造決定

^{13}C , ^{15}N 標識 Pol II-sub と非標識 p62 の複合体試料に対してステップ(2)~(4)を行い、複合体中の Pol II-sub の構造を決定する。

(8) NMR 測定、解析~p62 と Pol II-sub 間の NOE シグナル帰属

(9) 複合体構造の計算、精密化、及び最終構造決定

得られた全ての制限情報から複合体構造を計算し初期構造を算出する。精密化後、最終構造を決定する。

(1 0) 変異体の調製

(1 1) 変異体解析

(1 2) 結果の統合

4 . 研究成果

Pol II-sub の単独構造と TFIIH p62 との複合体構造を NMR 法で決定し、認識機構を明らかにした。また、Pol II-sub の変異体解析では、構造と結合活性のよい相関を得た。

Pol II と TFIIH の相互作用の構造情報は皆無であり、我々が見出した Pol II-sub と TFIIH p62 の相互作用も全く報告されていない。両者の複合体構造の決定は、Pol II と TFIIH の複合体構造情報として世界初であり、転写装置の構造モデル化に大きく貢献する。

TFIIH は転写の開始だけでなく伸長段階でも Pol II に付随するという報告があるがその分子機構は不明である。また、Pol II は転写中に損傷ヌクレオチドに出会うとそこで停止し、TFIIH がリクルートされて除去修復反応が開始されるが、リクルート仕組みは分かっていない。本研究の成果は、これら未解決の問題に構造的洞察を提供することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諏訪 哲史, 鈴木 秀文, 奥田 昌彦, 西村 善文, 山口 雄輝
2. 発表標題 TFIIHの多機能性を司るPleckstrin homologyドメインと新規標的因子の機能構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----