

「生命活動のプログラム」

平成9年度採択研究代表者

田村 隆明

(千葉大学大学院自然科学研究科 教授)

「核内因子による遺伝情報発現制御機構の解明」

1. 研究実施の概要

細胞機能は遺伝子発現の強弱により制御されている。DNA を元にした RNA の合成（転写）は遺伝子発現の基本であり、その制御機構の解明は生命活動の本質を理解する上で必須である。一つの細胞の中では、多くの転写が統合性と多様性という、一見あい反する機構に従って行われているが、その詳しい分子機構は不明である。本研究では転写制御で普遍的に用いられる因子 TBP を材料にしてこの課題に迫ろうとしている。TBP に結合する因子を検索したところ、新規の転写制御因子 TIP120 が得られた。この因子は多くの遺伝子を活性化する能力を持つ、新しいものであった。さらに研究を進めていく過程で、TBP 類似因子の一つである TLP を世界に先駆けて発見した。TLP は TBP ような機能は持たないが、TBP が担当しないある一群の遺伝子の発現に関わると考えられた。遺伝子発現の統合と多様性に関わる可能性のある因子を発見されたが、今後はこれらの材料を元に、遺伝子発現機構の調和と細胞機能の維持という課題をさらに追求する。

2. 研究実施内容

1) 目的

遺伝子発現制御は一義的には転写制御に依存し、その制御機構を理解することは細胞の維持や機能発現にとって必須である。本研究の目的の一つは細胞機能維持に関わる転写制御の多様性の分子機構を明らかにすることにある。具体的には基本転写因子の性質を詳細に解析し、それらと相互作用する因子を検索し、転写制御の統合や特異的転写制御を基本点転写装置の側面から明らかにしようと考えている。転写は細胞内で常に起こっているが、その他の核ダイナミズムとは無関係に進むことはない。細胞機能に必要な核内反応のクロストークを基本転写因子の解析から明らかにすることが本研究のもう一つの目的である。このために、基本転写因子を含む蛋白質複合体の実体を明らかにし、中に含まれる核ダイナミズム関連因子個々の解析を進める。

2) 研究成果

(研究代表者)

基本転写因子 TBP を材料に上の問題にアプローチしている。TBP は全ての転写系にとって必須と考えられ、同時に転写開始をコミットし、また多くの因子と結合して複合体を形成することができ、本研究目的の材料に適している。既に複数の TBP 結合性蛋白質 (TIP) の同定を報告してきたが、本年度は以下のような成果を得た。(i) TIP の一つがスプライシング因子の hnRNP-F であった。hnRNP-F は TBP と直接結合し、複合体を作っていたが、さらに pol II とも会合していた。本因子が連続した G 配列に結合することが明らかとなり、転写因子/スプライシング因子複合体の DNA 結合を介する安定化機構が想定される。(ii) 基本転写活性化能を持つ TIP120 を同定し、活性化が基本転写装置との相互作用に関連することが明らかとなっている (昨年度の成果)。TIP120 の組織間での発現は不偏的ではあるが、かなりのばらつきが見られた。増殖能の高い組織に特に高いわけではなく、むしろ筋や能肝臓といった組織に高い遺伝子発現が見られた。P19 細胞の筋/神経分化の系で分化の初期に TIP120 の遺伝子発現が高まり、また POD などの局在の一致も見られている。以上のことから、TIP120 は分化に関連する遺伝子発現に関わる可能性が示唆された。研究の過程で TIP120 類似遺伝子 TIP120B を見出した。この因子は筋組織特異的発現パターンを示し、筋分化に伴ってその発現が変化する。(iii) TIP のある一群のものはプロテアソーム構成 ATPase であった (昨年度の成果)。このうち MSS1 について詳細に検討したところ、本因子が DNA ヘリカーゼであることを見出したと共に、その細胞内分布がプロテアソーム自身と異なること、そして複数の基本転写因子と会合していることを明らかにした。以上のことから、MSS1 が転写制御に関わる可能性が示唆された。(iv) 細菌の組み換え因子 RuvB に類似する 2 つの蛋白質 ; TIP49a, TIP49b を見出した (昨年度の成果)。いずれの因子とも DNA ヘリカーゼ活性があることを明らかにし、DNA ヘリカーゼ反応の方向性が逆であり、しかも両者がヘテロ 2 量体として結合すること、さらにはそれらを含む複合体が細胞内に存在することを見出した。(v) 世界に先がけて発見した、マウスの TBP 類似因子 TRF (昨年度の成果) を TLP と名称変更し、さらに検討を加えた。多くの動物から TLP を同定し、ハエ TRF や TBP と比較した。TLP は通常の場合では TBP が示すような活性は示さず、TATA ボックス結合能もない。遺伝子や蛋白質の構造の比較から、TLP は古典的 TRF とは進化的には別の系譜に属する事が示唆された。

(他共同研究チーム)

[転写機構研究グループ] 転写阻害剤 DRB の作用機構を *in vitro* 系で解析し、以下の事柄を明らかにした。(1) DRB による阻害には DSIF と NELF が関与し、阻

害はキナーゼである pTEFb により解除される。(2) pTEFb は CTD をリン酸化し、このリン酸化が阻害因子 (DSIF と NELF) の pol II への結合を阻害するため、結果として転写抑制の解除される。(3) DRB により CTD のリン酸化が阻害されると阻害因子が pol II に結合し、RNA 合成が阻害される。(4) DSIF は Tat-SF1 や TFIIF と共に複合体を形成し、HIV の Tat 依存的転写促進に関与する。(5) DSIF は相互作用する因子により転写を正や負に制御することができ、NELF の場合は負に、Tat-SF1 では正に背御する。[転写因子研究グループ] TFIIF 複合体をバキュロウイルス発現系を用いて細胞内で再構成し、高純度の因子を得ることに成功し、期待される DNA ヘリカーゼ活性や転写活性化能が確認された。変異体サブユニットの発現により TFIIF 複合体の機能解析を行い、ERCC3 機能が転写に必須であることを明らかにした。[TFIIF 研究グループ] TFIIF サブユニットに欠陥を持つ患者細胞から 因子を精製した。変異 XP-D 由来 TFIIF では CKA 活性が減少し、転写促進能とリン酸化の促進も低下することを明らかにした。TFIIF をセンチウより単離し、TFIIFb はヒトのものと置き換わることができる。[TFIID 研究グループ] TFIID 機能を酵母を用いて進め、yTAF145 の N 端に存在する TBP 機能阻害活性領域を転写活性化スイッチと想定し、制御機構モデルを構築した。yTAF145 遺伝子の変異解析により、この分子が TATA ボックス識別能を有することを示した。

3) 今後の展望

本年度は個々の転写因子の基本的な性質の一部が明らかにされたが、次年度はさらなる解析が必要となる。転写伸長に関する新たなメカニズムが解きあかされつつあるが、今後は転写開始と転写伸長の連携の分子機構の解明が必要とされる。基本転写因子を含む複合体のアウトラインが描き出されたので、今後はさらに転写複合体個々の因子の構造と性質を解析していく必要がある。特に転写制御因子以外の因子が抽出される可能性もあるため、その準備が必要である。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Toshihiko Kishimoto, Kenji Kokura, Noriaki Ohkawa, Yasutaka Makino, Mitsuaki Yoshida, Setsuo Hirohashi, Shin-ichiro Niwa, Masami Muramatsu, and Takaki Tamura (1998). Enhanced expression of a new class of liver-enriched B-zip transcription factor, HTF, in hepatocellular carcinomas of rats and humans. *Cell Growth Different.*, 9, 337-344.
- Yasutaka Makino, Tsuneyo Mimori, Chika Koike, Yumiko Kurokawa, Masato

- Kanemaki, Satoshi Inoue, Toshihiko Kishimoto, and Taka-aki Tamura (1998). TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB acts as an autoantigen in human. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 819-823.
- Kenji Kokura, Tomoyoshi Nakadai, Toshihiko Kishimoto, Yasutaka Makino, Masami Muramatsu, and Taka-aki Tamura (1998). Gene expression in hepatomas. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 13, 132-141.
- Tomoyoshi Nakadai, Toshihiko Kishimoto, Kenji Kokura, Noriaki Ohkawa, Yasutaka Makino, Masami Muramatsu, and Taka-aki Tamura (1998). Cloning of a novel gene, DB83, that encodes a putative membrane protein. *DNA Res.*, 5, 315-317.
- Tetsuya Ohbayashi, Yasutaka Makino, and Taka-aki Tamura (1999). Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the *Drosophila* TBP-related factor. *Nucl. Acids Res.*, 27, 750-755.
- Tetsuya Ohbayashi, Toshihiko Kishimoto, Yasutaka Makino, Miho Shimada, Tomoyoshi Nakadai, Tsutomu Aoki, Takefumi Kawata, Shin-ichiro Niwa and Taka-aki Tamura (1999). Isolation of cDNA, Chromosome mapping, and expression of the human TBP-like protein (TLP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 137-142.
- Yumiko Kurokawa, Masato Kanemaki, Yasutaka Makino, and Taka-aki Tamura (1998) A notable example of an evolutionary conserved gene: studies on a putative DNA helicase TIP49. *DNA Sequence*, 10, 37-42.
- Yoshiyuki Konishi, Noriaki Ohkawa, Yasutaka Makino, Hiroaki Okubo, Ryoichiro Kageyama, Teiichi Furuichi, Katsuhiko Mikoshiba, and Taka-aki Tamura (1999). Transcriptional regulation of mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene by NeuroD-Related Factor. *J. Neurochem.*, 72, 1717-1724.
- Noriaki Ohkawa, Yoshiyuki Konishi, Miho Shimada, Yasutaka Makino, Shingo Yoshikawa, Katsuhiko Mikoshiba and Taka-aki Tamura (1999). Activation of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 promoter by AP-2. *Gene*, 229, 11-19.
- Yasutaka Makino, Masato Kanemaki, Yumiko Kurokawa, Takehiko Koji, and Taka-aki Tamura (1999). A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. *J. Biol. Chem.*, 274, 15329-15335.

- Tomoyoshi Nakadai, Toshihiko Kishimoto, Yaeko Miyazawa, Yasutaka Makino, Takashi Obinata, and Taka-aki Tamura (1999). HP33: hepatocellular carcinoma-enriched 33-kDa protein with similarity to mitochondrial N-acyltransferase but localized in a microtubule-dependent manner at the centrosome. *J. Cell Sci.*, 112, 1353-1364.
- Miho Shimada, Yoshiyuki Konishi, Noriyuki Ohkawa, Chiaki Maruyama, Fumio Hanaoka, Yasutaka Makino, and Taka-aki Tamura (1999). Distribution of AP-2 subtypes in the adult mouse brain. *Neurosci. Res.*, 33, 275-280.
- Kentarō Kayukawa, Yasutaka Makino, Shingo Yogosawa and Taka-aki Tamura (1999). A serine residue in the N-terminal acidic region of rat RPB6, one of the common subunits of RNA polymerases, is exclusively phosphorylated by casein kinase II in vitro. *Gene*, 234, 139-147.
- Tomoyoshi Nakadai, Nami Okada, Yasutaka Makino and Taka-aki Tamura (1999). Structure of rat gamma-tubulin and its binding to HP33. *DNA Res.*, 6, 207-209.
- Miho Shimada, Tetsuya Ohbayashi, Tomoyoshi Nakadai, Yasutaka Makino, Tsutomu Aoi, Takefumi Kawata, Tomohiro Suzuki, Yoichi Matsuda and Taka-aki Tamura (1999). Analysis of the chicken TBP-like protein (tlp) gene: evidence for a striking conservation of vertebrate TLPs and for a close relationship between tlp and tbp genes. *Nucl. Acids Res.*, 27, 3146-3152.
- Masatō Kanemaki, Yumiko Kurokawa, Toru Matsu-ura, Yasutaka Makino, Abdull Masani, Katsu-ichiro Okazaki, Takashi Morishita, and Taka-aki Tamura (1999). TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase TIP49a. *J. Biol. Chem.*, 274, 22437-22444.
- Taka-aki Tamura, Yoshiyuki Konishi, Noriaki Ohkawa, Miho Shimada, Tetsuya Ohbayashi, Tsutomu Aoki, and Yasutaka Makino (1999). Transcriptional regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene in the central nervous system. In *Recent Research Development in Neurochemistry*, 2, 125-137, Research Signpost Publisher, Trivandrum.

- Tsutomu Aoki, Nami Okada, Michiko Ishida, Shingo Yogosawa, Yaustaka Makino, and Taka-aki Tamura (1999) TIP120B: a novel TIP120-family protein that is expressed specifically in muscle tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 911-916.
- Tatsushi Yoshida, Yasutaka Makino, and Taka-aki Tamura (1999). Association of the rat heterogeneous nuclear RNA ribonucleoprotein F with TATA-binding protein. *FEBS Lett.*, 457, 251-254

他 4 件