

「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

遺伝子発現は細胞の生存に必須な過程であり、細胞の増殖、分化、癌化、死滅といった現象も、全て遺伝子発現の制御段階で起こっている。遺伝子発現の中でも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。細胞内で起こる膨大な数の遺伝子の転写は、統合と多様性という両極の現象を保ちながら進められているが、その詳しい分子機構は不明である。本研究では普遍的転写因子TBPを材料に、この課題に迫ろうとしている。一方、転写は転写以外の核内反応とは無縁ではありえず、核内の遺伝情報ダイナミズム協調性の分子機構解明も重要な研究課題となっている。本研究では転写因子を含む高分子複合体の解析を通してこの問題にも迫る。研究代表者はTBPに結合する因子として複数のTIPを発見しているが、本研究によりTIPが複合体を形成すること、複合体の中には転写以外に関与する因子も含まれていた。研究代表者は上記2つの研究課題について、主にTBP側からの解析を進めている。本研究では複数の転写制御に携わる研究者との共同研究の形をとっているが、各々はTBP以外の基本転写因子についての詳細な解析を進めている。このような包括的共同研究体制を組むことにより、転写制御機構を通しての細胞機能の包括的理解がさらに加速すると考えられる。

2. 研究実施内容

1) 目的

転写制御は遺伝子発現制御の主要な要因となっており、その制御機構解明は細胞の維持や機能発現機構解明にとって重要である。本研究の一つの目的は、転写制御に多様性が生まれる分子機構を、基本転写機構の側から明らかにすることにある。具体的には、基本転写因子TBPを元に転写制御に関わる新たな因子を見出し、それら因子の解析、及びそれらと相互作用する因子を同定することにより、転写制御の統合や特異的転写制御のメカニズムを基本転写装置の側面から明らかにする。本研究のもう一つの目的は、見出した新たな転写制御因子を元に、包括的核ダイナミズムの協調という新しい問題提起を提示し、それらの検証を行う進ことにある。この目的のため、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、同時に転写開始を決定づけ、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。() TIPの一つがスプライシング因子としても知られているhnRNP-Fであり、これがTBPと直接結合し複合体を作ること、さらにはpolとも会合する事を昨年度までに明らかにした。今年度はG配列結合因子であるhnRNP-Fの性質をさらに検討した。その結果、hnRNP-Fは1本鎖、2本鎖に関わらず、2～3個のdG塩基があればDNAに結合することがわかった。RNA,あるいはribo結合には分子内のRNPモチーフが関与するが、DNAの場合はG-rich領域が重要なことを明らかにした。これによりhnRNP-FがDNA, RNAの両方に同時に結合する可能性が示唆され、hnRNP-Fが転写開始複合体に取りこまれることにより、転写/スプライシング共役反応に何らかの役割を果たすことが考えられた。() 基本転写活性化能を持つTIP120Aを同定し、活性化は基本転写装置との相互作用に依存することが明らかとなっている(昨年度までの成果)。TIP120A機能領域の詳細な解析の結果、TIP120A中に2つの機能領域(N端とC端)の存在が示唆された。ただ、細胞内では両方の領域が機能発現に必要であった。TIP120A類似遺伝子TIP120Bを見出し、この因子が筋組織特異的発現パターンを示すことが明らかになっている(昨年度の報告)。マウスを用いた解析により、TIP120Bの発現が筋分化に密接に同調して起こることを明らかにした。TIP120Bと相互作用する因子を検索したところ、転写制御因子の一つNot1関連因子が同定された。以上の結果より、本因子が新たな筋分化関連転写制御因子である事が示唆される。() TIPのある一群のものはプロテアソーム構成ATPaseである(昨年度までの成果)。このうちMSS1について詳細に検討したところ、本因子が基本転写因子TBP, TFIIH, TFIIIB, TFIIIFと複合体を形成することを見出した。既にMSS1の分布がプロテアソーム自身の分布と異なることを明らかにしており、MSS1は蛋白質分解以外、転写制御にも関与することが示唆された。() 細菌の組み換え因子RuvBに類似し、DNAヘリカーゼモチーフを持つ2つの関連蛋白質; TIP49a, TIP49bを見出した(昨年度までの成果)。本年度はこの因子について、酵母を用いた解析を行った。遺伝学的解析より、本因子が細胞周期制御に関与することが明らかとなった。他の研究グループの研究から、本因子が動物細胞中でc-Myc転写の必須因子であることが示されて

いる。以上のことから、TIP49は真核生物の細胞増殖に必須な遺伝子の発現に関わる因子と考えられた。動物細胞のみならず、TIP49は酵母細胞中でも高分子状態として存在する事が明らかとなった。TIP49aとTIP49bが強い親和力で互いに結合し、形成される複合体の大きさが単量体分子量の約6～8倍になっているという結果、さらにはその分画にはTIP49a, TIP49b以外の蛋白質が見えないことより、細胞内にはTIP49a-TIP49bからなる安定な複合体(恐らく6量体)が存在すると示唆された。注意深い観察から、さらに大きな分子量を持つ分画にもTIP49a, TIP49bが見られたが、これは未知の機能を持つ新たな複合体である可能性がある。() TBP類似因子TLPを発見した(昨年度までの結果)。試験管内でTLPは通常の条件でTBPが持つような活性は示さず、TATAボックス結合能もない。しかし細胞内では、レポーター遺伝子の種類やTLPの細胞内濃度に依存して標的遺伝子の転写を上昇あるいは下降させる機能を発揮することがわかった。これより、TLPが転写因子であることが強く示唆された。TLPはTFIIAと強く結合でき、TFIIA結合におけるTBPとTLPの競合が転写抑制に効いている可能性がある。

(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、これまでDSIFとNELF、2種類の因子を同定しているが、更なる解析の結果、DSIFによる転写抑制はp-TEFbによるCTDのリン酸化により解除される事が明らかとなった。DRBはこのリン酸化を阻止する。NELFの5つのサブユニットを精製後、各因子をクローン化した。また機能性NELFを細胞から純化する系を確立した。[転写因子研究グループ] TFIIH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、これらを用いて機能解析を行った。その結果、基本転写にはERCC3 helicaseが必要であるが、ERCC2活性やMO15 kinase活性は不要なことが明らかとなった。RNAポリメラーゼの小サブユニットRPB10とTFIIE, TFIIHとの相互作用を検討した。その結果これらのサブユニットがいずれの因子とも相互作用することを明らかにした。[TFIIH研究グループ] TFIIHのCTDリン酸化を詳細に検討し、その活性がcdk7/cyclinH, CAK等のTFIIHサブコンプレックスに比べて特異的に高いことを明らかにした。TFIIEbの構造解析を行ない、この因子が羽根状ヘリックス・ターン・ヘリックス構造をとっていることを明らかにした。

[TFIID研究グループ] TFIID機能を酵母を用いて進め、TAF(yTAF145)内のN端に存在するTANDドメインが活性に実際に関与するという証拠が得られた。yTAF145の新たな突然変異体を得、これを用いた解析より、yTAF145にプロモーター識別能があることを明らかにした。

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、さらにはこれまで同定してきた因子が、遺伝子発現制御の場で実際に機能しているかどうかを検証していく必要がある。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Ohbayashi, T., Makino, Y. and Tamura, T. (1999). Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the *Drosophila* TBP-related factor. Nucl. Acids Res., 27, 750-755.
- Ohbayashi, T., Kishimoto, T., Makino, Y., Shimada, M., Nakadai, T., Aoki, T., Kawata, T., Niwa, S. and Tamura, T. (1999). Isolation of cDNA, Chromosome mapping, and expression of the human TBP-like protein (TLP). Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 137-142.
- Konishi, Y., Ohkawa, N., Makino, Y., Okubo, H., Kageyama, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K. and Tamura, T. (1999). Transcriptional regulation of mouse type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor gene by NeuroD-Related Factor. J. Neurochem., 72, 1717-1724.
- Ohkawa, O., Konishi, N., Shimada, M., Makino, Y., Yoshikawa, S., Mikoshiba, K. and Tamura, T. (1999). Activation of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 promoter by AP-2. Gene, 229, 11-19.
- Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T. and Tamura, T. (1999). A rat RuvB-like protein, TIP49a, is a germ cell-enriched novel DNA helicase. J. Biol. Chem., 274, 15329-15335.
- Nakadai, T., Kishimoto, T., Miyazawa, Y., Makino, Y., Obinata, T. and Tamura, T. (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.
- Shimada, M., Konishi, Y., Ohkawa, N., Maruyama, C., Hanaoka, F., Makino, Y. and Tamura, T. (1999). Distribution of AP-2 subtypes in the adult mouse brain. Neurosci. Res., 33, 275-280.
- Kayukawa, K., Makino, Y., Yogosawa, S. and Tamura, T. (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.
- Nakadai, T., Okada, N., Makino, Y. and Tamura, T. (1999). Structure of rat gamma-tubulin and its binding to HP33. *DNA Res.*, 6, 207-209.
 - Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Matsu-ura, Y., Makino, Y., Masani, A., Okazaki, K., Morishita, T. and Tamura, T. (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.
 - Tamura, T., Konishi, Y., Ohkawa, O., Shimada, M., Ohbayashi, T., Aoki, T. and Makino, Y. (1999). Transcriptional regulation of the inositol1,4,5-trisphosphate receptor type1 gene in the central nervous system. In *Recent Research Development in Neurochemistry*, 2, 125-137, Research Signpost Publisher, Trivandrum, India.
 - Shimada, M., Ohbayashi, T., Nakadai, T., Makino, Y., Aoi, T., Kawata, T., Suzuki, T., Matsuda, Y. and Tamura, T. (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.
 - Aoki, T., Okada, N., Ishida, M., Yogosawa, S., Makino, Y. and Tamura, T. (1999) TIP120B: a novel TIP120-family protein that is expressed specifically in muscle tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261, 911-916.
 - Yoshida, T., Makino, Y. and Tamura, T. (1999). Association of the rat heterogeneous nuclear RNA ribonucleoprotein F with TATA-binding protein. *FEBS Lett.*, 457, 251-254.
 - Makino, Y., Yoshida, T., Yogosawa, S., Tanaka, K., Muramatsu, M. and Tamura, T. (1999). Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes to Cells*, 4, 529-539.
 - Makino, Y., Yogosawa, S., Kayukawa, K., Coin, F., Egly, J.M., Yamamoto, K., Muramatsu, M., Wang, Z., Roeder, R.G. and Tamura, T. (1999). TBP-interacting protein120, TIP120, stimulates three classes of eukaryotic transcription via a unique mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7951-7960.
 - Yogosawa, S., Kayukawa, K., Kawata, T., Makino, Y., Inoue, S., Okuda, A., Mutramatsu, M. and Tamura, T. (1999) Induced Expression, Localization and chromosome mapping of the TBP-interacting protein120A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 123-128.
 - Yoshida, T., Kokura, K., Makino, Y., Ossipow, V. and Tamura, T. (1999). Heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein F binds to DNA via an oligo(dG)-motif

- and is associated with RNA polymerase II. *Genes To Cells*, 4, 707-719.
- Kokura, K., Kishimoto, T. and Tamura, T. (2000). Identity between rat *htf* and human *xbp-1* gene: demonstration of gene structure, target sequence, and transcription promotion function of HTF. *Gene*, 241, 297-307.
 - Oda, T., Kayukawa, K., Hagiwara, H., Yudate, H.T., Masuho, Y., Murakami, Y., Tamura, T. and Muramatsu, M. (2000). A novel TBP-binding protein ABT1 activates basal transcription and has a yeast homolog being essential for growth. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1407-1418.
 - Yamamoto, K., Koga, A., Yamamoto, M., Nishi, J., Tamura, T., Nogi, Y. and Muramatsu, M. (2000). Identification of a novel 70 kDa protein that binds to the core promoter element and is essential for ribosomal DNA transcription. *Nucl. Acids Res.*, 28, 1199-1205.
 - Yamaguchi, Y., Wada, T., Watanabe, D., Takagi, T., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999). Structure and function of the human transcription elongation factor DSIF. *J. Biol. Chem.*, 274, 8085-8092.
 - Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Kano, T., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999). NELF, a multiple complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, 97, 41-51.
 - Imazawa, Y., Imai, K., Fukushima, A., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Nogi, Y. (1999). Isolation and characterization of the fission yeast gene *rpa42+* which encodes a subunit shared by RNA polymerase I and III. *Mol. Gen. Genet.*, 262, 794-757.
 - Ishiguro, A., Nogi, Y., Hisatake, K., Muramatsu, M. and Ishihama, A. (2000). The Rpb6 subunit of fission yeast RNA polymerase II is a contact target of the transcription elongation factor TFIIS. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1263-1270.