

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

基本転写因子 TFIIIE の構造と TFIIF との相互作用

奥田 昌彦, 西村 善文

真核生物の転写には RNA ポリメラーゼ II (Pol II) 以外にも 5 種類の基本転写因子 (TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIF) が必要である。これらの生体超分子の構造を解析することは発生、分化、老化、がん化など基本的な生命現象を分子レベルで解明するためには不可欠である。Pol II や基本転写因子の構造と機能解析が欧米の研究者を中心に精力的に行われ、2006 年にロジャー・コーンバーグは Pol II の構造解析でノーベル賞を受賞した。そのような中において我々は TFIIIE の構造に関して α と β サブユニットのストイキオメトリーの決定、各サブユニットのコアドメインの構造、TFIIIE と TFIIF の相互作用ドメイン複合体の構造など独自に先駆的な構造解析を行ってきた。その研究の一端をここに紹介する。

1. はじめに

真核生物の転写には数多くのプロセスが必要である。転写は生命の基本的な現象である発生・分化・老化等に必須なので、各プロセスで様々な因子により厳密に制御されている。鋳型となる遺伝子は核内で安定なクロマチン構造を形成している。クロマチンは DNA がヒストン (H2A, H2B, H3, H4) 八量体に巻きついたヌクレオソームコアを基本構造単位とし高度に折りたたまれている。クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾酵素 (アセチル化、メチル化、シトルリン化、リン酸化、ユビキチン化など) あるいはこれらの脱修飾酵素が折りたたまれた遺伝子領域周辺のクロマチンの高次構造をゆるめオープン状態にし、転写活性化因子やメディエーターが働き、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と基本転写因子からなる転写装置 (転写開始前複合体) をプロモーター領域にリクルートする。Pol II の活性化

後、転写が開始されるが、非常に複雑で未解明な点も多い。ここでは、裸になったプロモーター DNA で形成される転写開始前複合体 (pre-initiation complex : PIC) に焦点を絞って話を進める。

PIC は、Pol II と五つの基本転写因子、TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIF で構成される。ヒトの場合、Pol II は 12 個、TFIIB は 1 個、TFIID は 17 個、TFIIIE は 2 個、TFIIF は 2 個、TFIIF は 10 個のサブユニットからなる。

表 1 ヒト転写因子のサブユニット構成

Pol II	12
TFIIB	1
TFIID	17
TFIIIE	2
TFIIF	2
TFIIF	10
メディエーター	>20

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-29)

Structural biology of a general transcription factor, TFIIIE and its interaction mode with TFIIF

Masahiko Okuda and Yoshifumi Nishimura (Graduate School of Supramolecular Biology, Yokohama City University, 1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan)

従って PIC は 44 個のポリペプチドから形成された非常に複雑な超分子複合体である。酵母でも PIC の複雑さは基本的には変わらない。このように複雑で巨大な生体超分子複合体の立体構造を原子レベルで理解しようという試みは、機能研究とともに早い段階から開始され、1992 年の TFIID のサブユニットである TATA 結合タンパク質 (TATA-binding protein : TBP) のコア構造の決定¹⁾を皮切

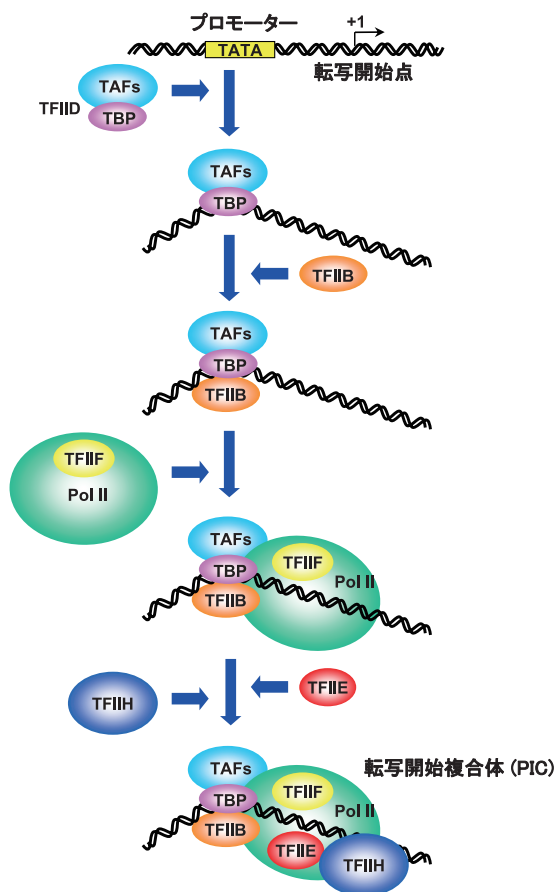


図1 転写開始複合体 (PIC) の Stepwise assembly モデル

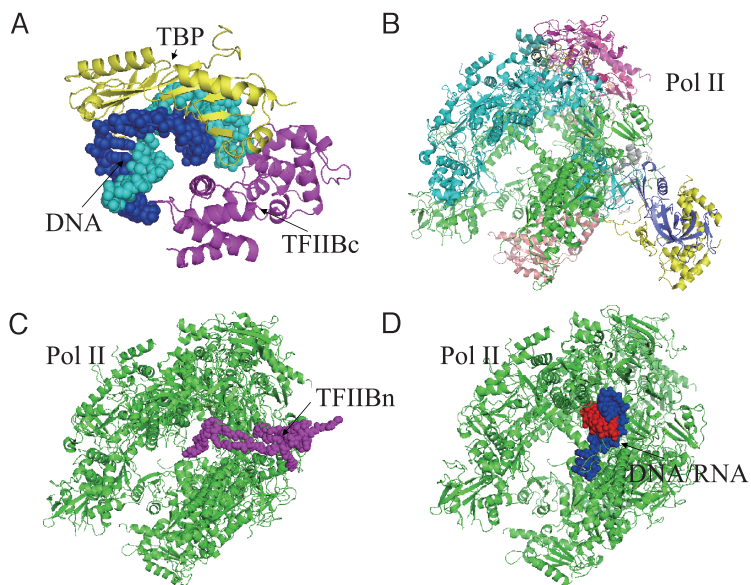


図2 PIC 構成因子の構造決定例

(A) DNA-TBP コアドメイン-TFIIB の C 末ドメイン複合体 (PDB ID: 1VOL), (B) Pol II 構造 (完全 12 サブユニット) (PDB ID: 1WCM), (C) Pol II-TFIIB 複合体 (PDB ID: 1R5U), (D) 転写伸長中の Pol II の構造 (PDB ID: 1I6H). TBP のコアドメイン, TFIIB の C 末ドメイン (TFIIBc), Pol II をリボンモデルで, DNA, RNA, TFIIB の N 末ドメイン (TFIIBn) を球体モデルで示している. 図の作製には PyMOL プログラム⁵⁷⁾を使用した.

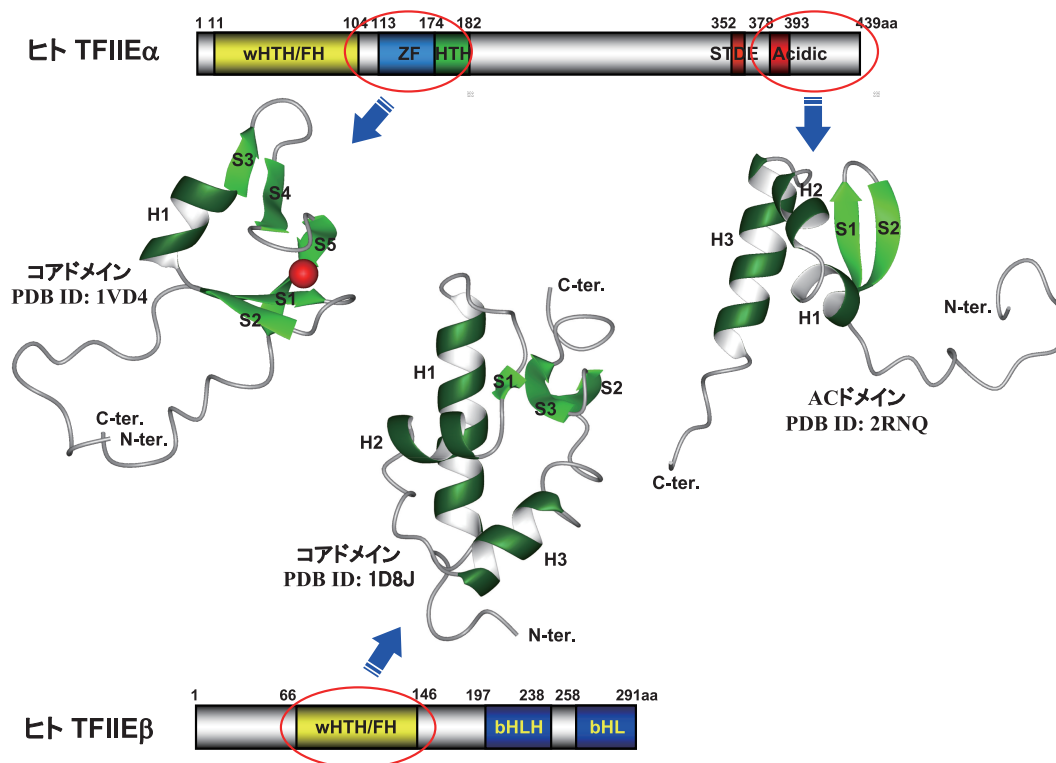


図3 ヒト基本転写因子 TFIIIE のドメイン構造

これまでに決定したドメイン構造, および配列から予想される構造モチーフ. wHTH/FH; ウィングド・ヘリックス・ターン・ヘリックス/フォークヘッド, ZF; ジンクフィンガー, HTH; ヘリックス・ターン・ヘリックス, bHLH; 塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス, bHL; 塩基性ヘリックス・ループ. STDE はセリン, トレオニン, アスパラギン酸, グルタミン酸に富んだ領域, Acidic は酸性アミノ酸に富んだ領域を示している. 構造はリボンモデルで表示している. H; α ヘリックス, S; β 鎖. 図の作製には MOLMOL プログラム⁵⁸⁾を使用した.

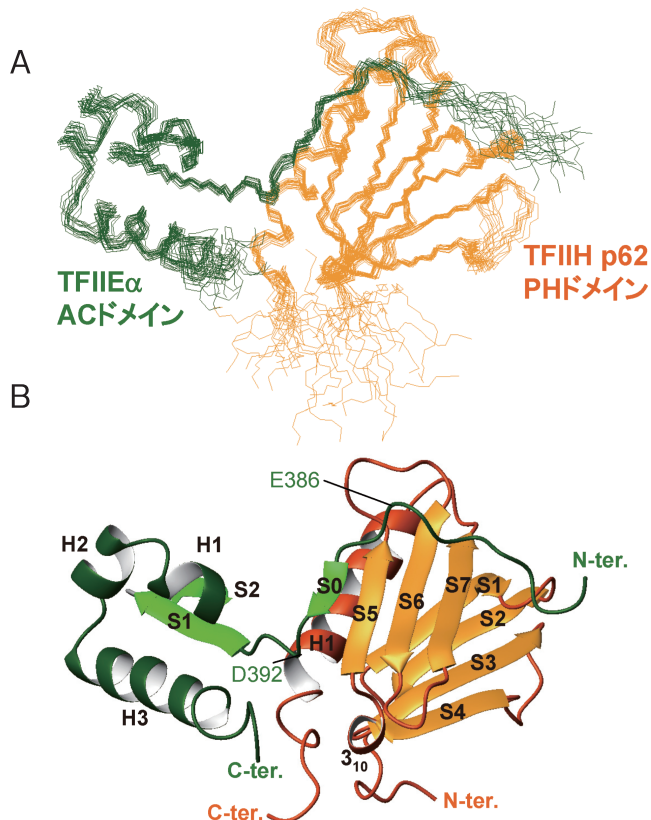


図4 TFIIIEα AC ドメインと TFIIH p62 PH ドメインとの複合体の溶液構造

(A) 20 個の NMR 主鎖構造の重ね合わせ (PDB ID: 2RNR), (B) エネルギー最小構造のリボンモデル表示. 図の作製には MOLMOL プログラム⁵⁸⁾を使用した.

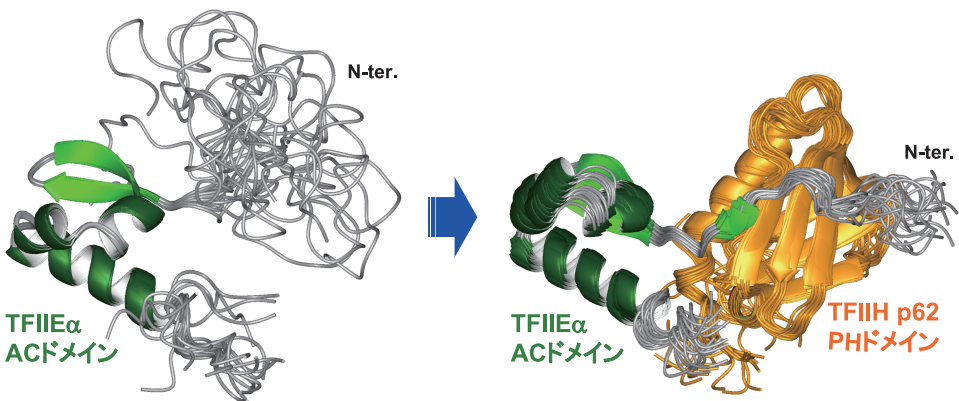


図 5

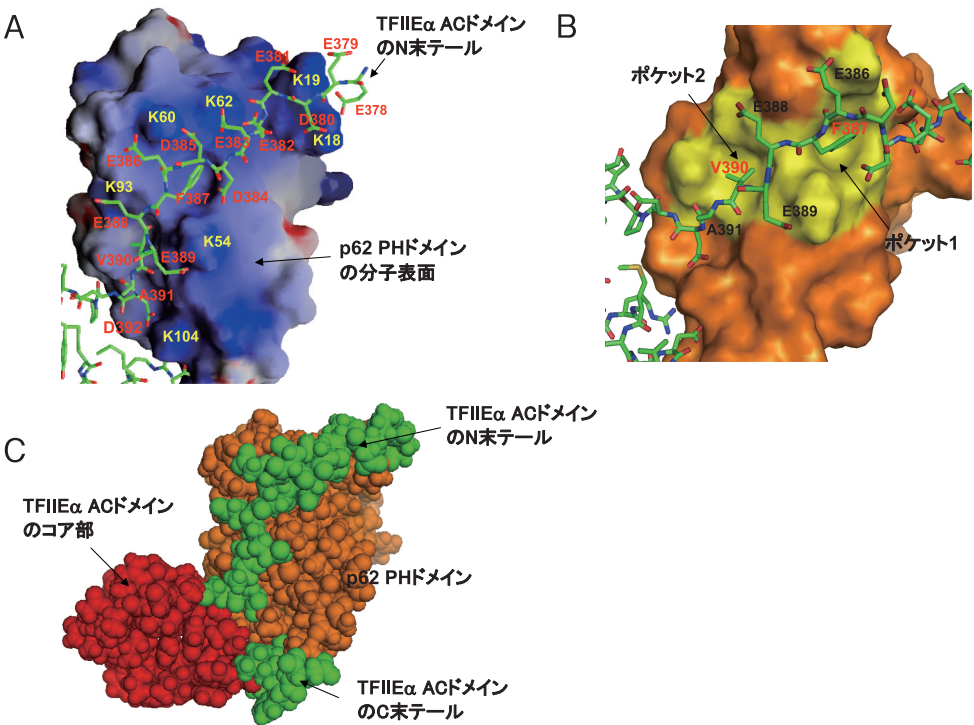


図 6

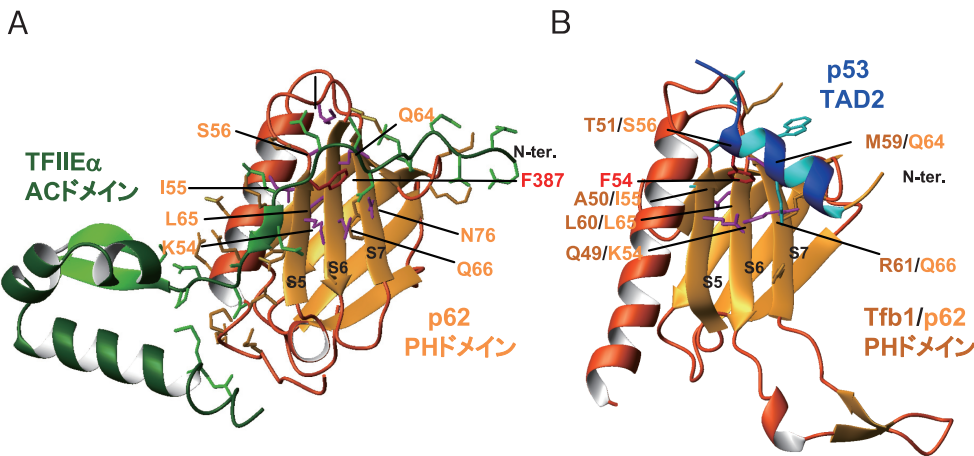


図 7

りに、これまでに多くの立体構造情報が蓄積されている^{2,3)}。2006年にノーベル化学賞を受賞したロジャー・コーンバーグのPol IIの高分解能構造決定までの研究の歴史⁴⁾を見ても分かるように、数々の困難を打開した多くの研究者によって立体構造に基づいた転写開始の議論が可能となってきた。しかしまだまだ構造情報が不足しており、転写の原子レベルでの理解にはより一層の努力、時間、技術革新が必要である。ここでは特にPICの構成因子の中のTFIIEについて筆者らがこれまでにやってきた研究を概説する。また最近解析したTFIIEとTFIIHとの相互作用構造に関して詳しく紹介したい。

2. 基本転写因子 TFIIE

2.1 転写開始複合体 (PIC)

Pol IIは自身ではプロモーターを正確に認識することも転写を開始することもできず、五つの基本転写因子を必要とする。試験管内再構成転写系によりTFIIDのTBPがDNAのプロモーターを先ず認識し、DNAを大きく曲げる(図1, 図2A)。続いてTFIIBが結合し転写開始点を規定する。この複合体にTFIIFが結合したPol IIが加わる。さらに、TFIIEが加わり、最後にTFIIEがTFIIHをリクルートしてPICが完成する。これまでにDNA-TBPコアダメイン-TFIIBのC末ドメインの三者複合体構造⁵⁾、Pol IIの単独の構造や転写伸長中の構造⁶⁻⁸⁾、Pol II-TFIIB複合体構造⁹⁾等が決定されている(図2)。これらの構造に基づいてPIC形成前半までの構造はモデル化されている。TFIIFの主なドメインの構造は決定されており、さらにPol IIとの複合体の構造解析も進行中である⁴⁾。TFIIEは様々な酵素活性をもつTFIIHのリクルートやTFIIHの酵素活性の制御、プロモーターDNAのメルティングやプロモータークリアランスの過程に必須なタンパク質であるが、他の基本転写因子に比べ構造解析は遅れていた。

2.2 TFIIEの構造解析の経緯

ヒト由来のTFIIEは439残基の α サブユニット(TFIIE α : 50kDa)と291残基の β サブユニット(TFIIE β : 34kDa)から成る(図3)。ゲルろ過クロマトグラフィーやクロスリンキングの実験からTFIIEは長らく $\alpha 2\beta 2$ のヘテロ四量体であると考えられてきた^{10,11)}。しかしこれらの手法では通常コンパクトな球状タンパク質を仮定して実験結果を解釈する。サブユニットの種類を同定することはゲル電気泳動などの分析手法やクロニングの実験から非常に確実であるが、その構成量(ストイキオメトリー)を定量化するのはそれほど確実ではない。当研究室でインタクトに近い条件下でのエレクトロスプレーイオン化質量分析法や超速心分析により、TFIIEは $\alpha\beta$ ヘテロ二量体であることを明らかにした¹²⁾。その後電子顕微鏡像からもPIC中でヘテロ二量体であることが確認された¹³⁾。X線小角散乱の実験からはTFIIEは長い棒状の分子であることが示された¹²⁾。クロスリンキングの実験ではTFIIEがもしマルチドメインが連なった細長い分子だとヘテロ二量体の可能性もあると議論していたが、ヘテロ四量体で解釈していた¹¹⁾。

ヒトTFIIFも分子量74kDaの α サブユニットと分子量30kDaの β サブユニットからなるヘテロ四量体であるとゲルろ過クロマトグラフィーやクロスリンキングの実験から言われていたが^{11,14)}、実際はヘテロ二量体であることをやはり質量分析法により最近明らかにした¹⁵⁾。このように生体超分子中の構成分子のストイキオメトリーに関しては、教科書的なことでもきちんと確認する必要がある、その同定に質量分析法が有効であることを示した。

TFIIEの立体構造を決定するために多くの研究者が結晶化を試みてきたが、TFIIEの $\alpha\beta$ 二量体自体や各サブユニットも溶解性が悪く良好な結晶を得ることに未だ成功していない。限定分解実験やNMRの実験結果の解析から、TFIIEは天然変性領域¹⁶⁻¹⁸⁾を多く含むことが示唆されている。筆者らはTFIIE中の安定なドメインを同定し、それらの構造をNMRで決定することを先ず始めた。

図5 結合前後でのTFIIE α ACドメインの構造変化

左図は未結合時のTFIIE α ACドメインの構造、右図はACドメインの構造とTFIIH p62 PHドメインとの複合体構造。それぞれ20個の構造の重ね合わせ図である。未結合時に一定の構造をとっていなかったACドメインの両末端テール、特にN末端テールが結合時に固定されている様子が分かる。図の作製にはMOLMOLプログラム⁵⁸⁾を使用した。

図6 TFIIE α ACドメインとTFIIH p62 PHドメインとの間の特異的結合の詳細

(A)TFIIE α のACドメインのN末酸性テールがp62のPHドメインの正の電荷(青)が広く分布した分子表面を静電的相互作用しながら包み込んでいる様子。赤は負の電荷。(B)TFIIE α のACドメインのF387, およびV390がそれぞれp62のPHドメインのポケットにはまり込んでいる様子。(C)TFIIE α のACドメインのコア部によるp62のPHドメインの認識。球体モデルで表示。(A), (B)は、ACドメインをワイヤーモデルで表示し、PHドメインは分子表面を表示している。図の作製にはGRASPプログラム⁵⁹⁾、およびPyMOLプログラム⁵⁷⁾を使用した。

図7 TFIIE α ACドメインとTFIIH p62 PHドメインとの複合体とp53 TAD2とTfb1 PHドメインとの複合体の構造比較

(A)TFIIE α ACドメイン-TFIIH p62 PHドメイン複合体。(B)p53 TAD2-Tfb1 PHドメイン複合体(PDB ID: 2GS0)。相互作用している残基を側鎖で示している。P62/Tfb1のポケット1を形成している残基をラベルしている。(B)ではTfb1の残基の右にp62の相等残基を示している。図の作製にはMOLMOLプログラム⁵⁸⁾を使用した。

3. TFIIIEのコアドメインの構造

両サブユニットに対してプロテアーゼ限定分解実験を行った結果、それぞれ一つずつ安定なドメイン（コアドメイン）が同定された。興味深いことに、どちらもその領域を欠損した変異体は基本転写に対してドミナントネガティブ効果を示すことから、各コアドメインは機能上非常に重要である^{19, 20}。しかし、各コアドメインがどのような機能を果たすかは不明であったので、構造を解析し構造に基づいた機能解析を試みた。

3.1 TFIIIE β のコアドメイン

最初に、ヒトTFIIIE β のコアドメインの構造を決定した（図3）²¹。アミノ酸配列からの予想に反して、コアドメインの構造は3本のヘリックスとC末における β ターンからなり、ウイングド・ヘリックス・ターン・ヘリックス（wHTH）/フォークヘッド（FH）ドメインとして知られる転写因子のDP2やHNF-3 γ のDNA結合ドメインと非常によく似ていた²¹。そこで一本鎖DNAや二本鎖DNAとの結合実験を行ったところTFIIIE β のコアドメインは二本鎖DNA結合ドメインであることを確認した²¹。それまで知られていたwHTHドメインでは3番目のヘリックスがDNAの大きな溝に結合し、ウイングが小さな溝に結合する。しかしTFIIIE β のコアドメインのDNA結合面をNMRで調べたところ、いままで報告されてきたwHTHの結合面とは反対の1番目のヘリックス側であった。高次構造（フォールド）が同じでも二本鎖DNA結合という機能性表面が大きく異なっていた。これはTFIIIEのアミノ酸配列からwHTHという構造を全く予測できなかったことと対応する。ほぼ同時期に、ヒトRFX1のwHTHは、ウイングがDNAの大きな溝に、3番目のヘリックスがDNAの小さな溝に結合することが報告された²²。その後、TFIIIE α の古細菌ホモログTFE²³や、ヒトTFIIIF α ²⁴のwHTHはDNA結合能をもたないことや、ヒトTFIIIF α のwHTHでは他のタンパク質との相互作用に使われるといった報告もなされている。タンパク質の高次構造を決定するアミノ酸とタンパク質の機能を決定するアミノ酸とは異なる場合が多いということを示している²⁵⁻²⁸。

構造と機能の多様性の例としてクロマチンリモデリング因子CHD1の例もある²⁹。ヒトCHD1と酵母Chd1は二つのクロモドメインをタンデムに含みアミノ酸配列もよく似ている。クロモドメインはヒストンのメチル化リシンを認識するドメインとして知られている。我々は酵母Chd1のクロモドメインはメチル化リシンを認識しないことを実験的に確認していたが、酵母Chd1のクロモドメインがメチル化リシンを認識するという間違った報告が出た³⁰。しかしその後酵母ではなくヒトCHD1の二つのクロモドメ

インがヒストンH3のトリメチル化された4番目のリシン残基を特異的に認識することが構造的に確認された³¹。酵母Chd1の二つのクロモドメインの構造はヒトCHD1の結合部位に相当する構造が異なっていることが分かった^{29, 32}。酵母とヒトで同じホモログであっても機能が同じとは限らない。機能の詳細な差異は構造を解析し機能性アミノ酸を比較することにより解明できる。

TFIIHはそのヘリカーゼ活性により、転写開始点付近のDNAの二重らせんをほどき、転写のための泡を生成する（プロモーターメルティング）。TFIIIEはその領域のDNAに結合する³³。構造解析から見出されたTFIIIE β コアドメインの二本鎖DNA結合能とC末塩基性領域（bHL）（図3）の一本鎖DNA結合能¹⁹の両方がプロモーターメルティングに関与していると考えられる。

3.2 TFIIIE α のコアドメイン

次に、TFIIIE α のコアドメインの構造を決定した（図3）³⁴。四つのシステインが一つの亜鉛イオンを配位するC4タイプの亜鉛結合ドメインであったが、いままで数多く報告されてきたどのジンクフィンガーにも属さない新規なフォールドであった。構造機能相関を明らかにするために、いくつかの変異体を作成した。野生型では亜鉛イオンの配位は構造保持に必須であるが、亜鉛イオンを配位しているC129, C132, C154, 及びC157をそれぞれアラニンに置換した四つの変異体の構造を円二色性（CD）やNMRで解析したところ、どれも構造は壊れていたものの亜鉛イオンを配位し部分的にフォールドした構造とランダム構造との平衡状態にあった³⁵。興味深いことに、N末の二つの変異体どうし、またC末の二つの変異体どうしはそれぞれ互いに類似した特徴を示した。この構造非対称性はスーパーコイルDNA鑄型を用いた際の転写活性にも反映されていた³⁴。変異体を用いて他の基本転写因子との相互作用を調べたが、目立った結合の損失は認められない³⁴。このことから、他の基本転写因子との相互作用に積極的に関わっている可能性は低いが、この部位の欠損はドミナントネガティブである。コアドメインの表面には際だった酸性アミノ酸の領域が存在する。これらのアミノ酸のうち164番目のアスパラギン酸を置換すると野生型よりも転写が活性化する変異体を得たので³⁴、コアドメインは転写を負に制御している可能性がある。今後引き続き機能を解析して行く必要がある。

4. TFIIIEとTFIIHの相互作用

4.1 TFIIH

前述したように、TFIIIEはTFIIHをリクルートしPICを形成する。ヒトTFIIHは10個のサブユニットで構成され、Pol IIと同様に巨大な複合体（480kDa）である。TFIIH

はコア複合体 (XPB, p34, p44, p52, p62, p8/TTDA) と CAK (CDK activating kinase) 複合体 (Cdk7, cyclin H, MAT1) が XPD サブユニットで連結されている³⁶⁾。TFIIH は Pol II の活性化に必要な三つの酵素活性である ATP 依存性 DNA ヘリカーゼ、DNA 依存性 ATP アーゼおよび CTD (Pol II の最大サブユニット Rpb1 の C 末ドメイン) キナーゼ活性をもつ。このうち、TFIIE は ATP アーゼおよび CTD キナーゼ活性を促進し、ヘリカーゼ活性を抑制する^{37~39)}。これらの酵素活性は、PIC 形成後のプロモーターメルティングやプロモータークリアランス (Pol II がプロモーターから離れる過程) に使われる。TFIIE と TFIIH は協調しながら、転写の開始段階だけでなく、転写開始から伸長段階への遷移段階においても重要な役割を果たす。

4.2 TFIIE α C 末酸性 (AC) ドメイン

TFIIE と TFIIH は互いに密接な関係にあるにもかかわらず、両者の相互作用については、TFIIE α の C 末側の酸性アミノ酸残基に富んだ領域 (378-395 残基) が TFIIH との結合に重要であること²⁰⁾、TFIIE α が TFIIH の p62 サブユニットに強く結合すること^{34,40)}が分かっているのみで、構造的知見は皆無であった。そこで、まず TFIIE α の酸性領域から C 末端までの領域 (378-439 残基、以下 AC ドメインと呼ぶ。) が、p62 のどの領域に結合するのかを p62 欠損変異体を作成し、GST プルダウンアッセイで調べた⁴¹⁾。その結果、AC ドメインは p62 の N 末に存在するプレクストリン相同 (pleckstrin homology : PH) ドメインと特異的に結合することが分かった。PH ドメインは構造的に安定で、既に NMR により構造が解かれていた⁴²⁾。両者の相互作用を構造的に検討するために TFIIE α の AC ドメインの構造を NMR で決定した⁴¹⁾ (図 3)。酸性アミノ酸残基が連続して見られる N 末端から 16 残基、および C 末端の 5 残基は構造をとっていなかったが、それ以外の領域では β ターンにつづき 3 本の α ヘリックスが互いに寄り添ったコンパクトな構造を形成していた。

4.3 TFIIE α の AC ドメインと TFIIH p62 の PH ドメインとの複合体構造

次に両者の複合体構造を解析した。NOE (核オーバーハウザー効果) 由来の 4,489 個の距離制限情報、120 個の水素結合制限情報、および 282 個の二面角制限情報から立体構造を計算し、良好に収束された構造を得た (図 4)⁴¹⁾。複合体中の p62 の PH ドメインは、単独の構造とほぼ同じであった。TFIIE α の AC ドメインも、単独の時に構造を形成していたコアの部分は同じであったが、構造を全くとっていなかった N 末の酸性残基に富んだ末端の部分が、結合時には伸びた構造で固定され、一部分で β 鎖を形成しながら、p62 の PH ドメインを広く包み込んでいた (図

5)。AC ドメインの N 末端から 9 連続した酸性アミノ酸 (E378-E386) は、PH ドメインの S5, S6, S7 からなる 2 番目の β シート ($\beta 2$) 上の正の電荷が広く分布した表面と相互作用しながら横断していた (図 6A)。続く F387 から A391 のポリペプチド鎖は、PH ドメインの $\beta 2$ 端の S5 鎖の横に沿って走り、PH ドメインの S5, S6, S7 鎖に加えて新たな 4 番目の鎖 (S0) として PH ドメインの β シート形成に参加していた (図 4B)。AC ドメインの N 末テールは N 端から 12 残基までが F387 を除きすべて酸性アミノ酸に占められており、F387 の役割については解析前から注目していたが、やはり特異的結合に重要で、その芳香環側鎖は PH ドメインの $\beta 2$ 上にある浅い 1 番目のポケット (ポケット 1) の中に納まっていた (図 6B)。またその後の二つの酸性残基、E388, E389 に続く V390 も F387 と同様に PH ドメインの S5 鎖と H1 ヘリックスの間にある浅い 2 番目のポケット (ポケット 2) にはまり込んでいた (図 6B)。

注目されることに AC ドメインの N 末領域に加えて、コアの部分もまた結合に関与していた (図 6C)。AC ドメインの N 末領域のペプチドを用いた結合実験から、それだけでも PH ドメインに結合できるが、コア部分をもつ時と比べて約 6~9 倍弱くなることが分かった。複合体全体として収束よく構造が決定できたのは、N 末テールに加えてコア部の結合への寄与によるところが大きい。

5. TFIIE, TFIIH, p53 のクロストーク

5.1 p53 の転写活性化ドメイン (TAD2) との結合部位の共有

がん抑制タンパク質 p53 の酸性転写活性化ドメイン (TAD) には TAD1 と TAD2 と呼ばれる二つの領域が存在するが、そのうち TAD2 は出芽酵母のヒト p62 ホモログである Tfb1 の PH ドメインと複合体を形成する (図 7)⁴³⁾。Tfb1 の PH ドメインの構造は S6 と S7 間のループの長さを除き互いによく似ている。さらに、単純ヘルペスウイルス VP16 の TAD も実質的に Tfb1 の同じ部位に結合する⁴⁴⁾。この複合体構造と今回の複合体構造を比較してみると面白いことに、p53 の TAD2 と VP16 の TAD の PH ドメイン上の結合部位が、TFIIE α の AC ドメインとの結合部位の一部と重なり合う。しかし、結合様式は両者で全く異なる。p53 の TAD2 は結合していないときは天然変性状態で構造をとらないが、結合時には 9 残基からなる両親媒性ヘリックスを形成し、PH ドメインの 2 番目の β シートに結合する。TFIIE α の AC ドメインの N 末領域も同様に結合とともに構造が誘起されるが、ヘリックスではなく S0 鎖を含む湾曲した伸びた構造である。但し、このような大きな構造的相違にもかかわらず、どちらもフェニルアラニン (TFIIE α の AC ドメインでは F387 と p53 の TAD2 では

F54) を PH ドメインのポケット 1 に挿入していた。p53 の TAD2 では限られた領域でのみ PH ドメインに接触するが、TFIIIE α の AC ドメインではさらに広範囲に渡って相互作用する。結合表面積を計算してみると、p53 の TAD2 と Tfb1 の PH ドメイン複合体が約 $800 \text{ \AA}^2$ であるのに対して、TFIIIE α の AC ドメインと p62 の PH ドメイン複合体では約 $2,300 \text{ \AA}^2$ と約 4 倍広い。

5.2 結合部位共有の生物学的意味

酸性 TAD は多くの場合、結合していない状態では一定の構造をとらずふらついている天然変性状態であるが、標的タンパク質に結合すると両親媒性ヘリックスを形成する。例えば、p53 の TAD2 と RPA70 (複製タンパク質 A70)⁴⁵⁾、p53 の TAD1 と MDM2 (ユビキチンリガーゼ)⁴⁶⁾、VP16 の TAD と hTAF₃₁ (ヒト TBP 関連因子)⁴⁷⁾ 複合体がそうである。一方、TFIIIE α の AC ドメインは、ヘリックス構造をとらず、伸びた構造の N 端テールとコア構造が一緒になって p62 の PH ドメインに結合していた。等温滴定量熱測定 (ITC) で見積もられた p53 の TAD2 の p62 や Tfb1 の PH ドメインに対する K_d はそれぞれ $3,175 \pm 570 \text{ nM}$ 、 $391 \pm 74 \text{ nM}$ である⁴³⁾。NMR 滴定実験で得られた VP16 の TAD と Tfb1 の PH ドメインの K_d は、 $4 \sim 7 \mu\text{M}$ である⁴⁴⁾。これらの結合と比べて、TFIIIE α の AC ドメインと p62 の PH ドメインとの結合はむしろ強い。転写活性化因子は Pol II や基本転写因子のリクルート効率を上げることによって転写開始を促進する機能が知られている⁴⁸⁾。転写活性化時の TFIIH のリクルートを考えてみると、TFIIH は TFIIIE による経路に加えて、転写活性化因子による経路から PIC へリクルートされる。p62 は VP16 や p53⁴⁹⁾ だけでなく、E2F-1⁵⁰⁾ やエストロゲン受容体 ER α ⁵¹⁾ と相互作用し、p53、VP16、ER α は p62 の PH ドメインを標的にする。今回の研究では基本転写因子 TFIIIE α も AC ドメインを通じて同じ p62 の PH ドメインと結合することが分かった。我々の知る限り、TFIIIE は TAD 様モチーフを所有することが示された最初的基本転写因子である。さらに、p53⁴³⁾ と VP16⁴⁴⁾ は、TFIIIE α AC ドメインと p62 の PH ドメインとの間で形成される結合表面の一部を共有していることも明らかになった。TFIIIE と TFIIH の相互作用は PIC 形成後の次の段階、即ち、プロモーターメルティングやプロモータークリアランスに必要なので、p53 の TAD2 との p62 の PH ドメインの結合表面の共有は、TFIIH のリクルートの完了に際し、転写活性化因子から TFIIIE への TFIIH の効率的な受け渡しに有利なと考えられる。

興味深いことに、p53 の TAD2 の p62 の PH ドメインへの結合は、p53 の S46 や T55 のリン酸化によって制御される⁴³⁾。非リン酸化時の K_d は $3,175 \pm 570 \text{ nM}$ であるが、S46 あるいは T55 がリン酸化されると、それぞれ K_d が $518 \pm$

92 nM 、 $457 \pm 75 \text{ nM}$ 、さらに両方がリン酸化されると $97 \pm 33 \text{ nM}$ となり、親和性が増加する。最近報告された ITC 実験によると、TFIIIE α (336–439 残基) の p62 の PH ドメインへの結合の K_d は $45 \pm 25 \text{ nM}$ である⁵²⁾。これらの値を考えると、TFIIIE α _{336–439} の p62 の PH ドメインへの親和性は、非リン酸化 p53 の TAD2 よりもずっと強く、S46 と T55 のどちらもリン酸化された p53 の TAD2 と同程度となる。TFIIH と p53 は転写だけでなく、DNA 修復にも関与しており^{38, 53)}、p62 の PH ドメインはスクレオチド除去修復にも関与すること⁴²⁾を考慮すると、p62 は転写と DNA 修復の間の分子スイッチとして働いているのかもしれない。つまり、p53 の TAD2 が非リン酸化の時には、p53 の TAD2 から TFIIIE α の AC ドメインへの p62 の受け渡しが効率よく行われ、転写開始において互いに協調しながら機能し、一方で S46 や T55 がリン酸化された時には、p53 の TAD2 の p62 の PH ドメインへの親和力が TFIIIE α の AC ドメインと同程度になるのでむしろ、p53 と p62 (TFIIH) は転写活性化以外の、DNA 修復や他のプロセスに働くのではないかと想像している。この説が正しいかどうかは今後の研究に期待される。

6. 終わりに

以上述べたように、筆者らは TFIIIE の構造研究をドメイン解剖学的に進めてきた。構造が解かれたドメインはいずれも実験的にあまり問題がなく、比較的順調に解析を進めることができた。しかし $\alpha\beta$ 二量体ドメインや、様々な因子との相互作用部位が集中する TFIIIE β の C 末領域といった重要領域が残っている。これらの領域にこれまでも何度か挑戦してきたが、よい系を見出せていない。従来の方法ではうまくいかない領域や、天然変性領域の構造を如何にして解析していくかが今後の課題である。NMR は X 線結晶構造解析と異なり天然変性状態の構造や動的構造を解析できるので^{54, 55)}、TFIIIE の全体構造を NMR で解析していく手法を現在開発している。また、各々のドメインが、どのような相対位置にあるのか、特に PIC 上でどこに位置するのかを今後明らかにしていく必要がある。幸いにして TFIIIE は DNA、Pol II、ほとんどの基本転写因子と相互作用するので、多くの相互作用情報を得ることが期待できる。ここで述べた TFIIIE α の AC ドメインと TFIIH の p62 の PH ドメインの複合体構造決定はそのような取り組みのはじまりでもある。得られた構造情報と、電子顕微鏡法¹³⁾、クロスリンク実験⁵⁶⁾や変異体実験等のデータと上手く組み合わせることによって、TFIIIE の全体構造を理解することができると考えている。このような地道な作業が、PIC 構造の完全モデル化へ繋がるものと確信している。

ここで述べた筆者らの研究成果は、多くの方々のご協力により得られたものです。TFIIE の機能解析は、大熊芳明先生（富山大学）、TFIIE の質量分析等の成果は、明石知子先生（横浜市立大学）、ペプチド合成については相本三郎先生（大阪大学）との共同研究であり、厚く御礼申し上げます。また、長土居有隆博士をはじめ横浜市立大学大学院機能科学研究室の皆様、本研究に関わった多くの方々に深謝いたします。また本研究は文科省の「タンパク 3000 プロジェクト：転写・翻訳（代表：西村善文）」と「ターゲットタンパク研究プログラム：クロマチン上での基本転写因子、転写制御因子、ヒストン修飾因子の構造生物学（代表：西村善文）」の研究成果である。記して感謝したい。

文 献

- Nikolov, D.B., Hu, S.H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N.H., Roeder, R.G., & Burley, S.K. (1992) *Nature*, **360**, 40–46.
- 奥田昌彦, 西村善文 (2002) 蛋白質 核酸 酵素, **47**, 926–940.
- 西村善文 (2005) 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 1247–1263.
- Kornberg, R.D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12955–12961.
- Nikolov, D.B., Chen, H., Halay, E.D., Usheva, A.A., Hisatake, K., Lee, D.K., Roeder, R.G., & Burley, S.K. (1995) *Nature*, **377**, 119–128.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P. R., & Kornberg, R.D. (2000) *Science*, **288**, 640–649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., & Kornberg, R.D. (2001) *Science*, **292**, 1863–1876.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., & Kornberg, R. D. (2001) *Science*, **292**, 1876–1882.
- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., & Kornberg RD (2004) *Science*, **303**, 983–988.
- Ohkuma, Y., Sumitomo, H., Horikoshi, M., & Roeder, R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9163–9167.
- Forget, D., Langelier, M.F., Therien, C., Trinh, V., & Coulombe, B. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 1122–1131.
- Itoh, Y., Unzai, S., Sato, M., Nagadoi, A., Okuda, M., Nishimura, Y., & Akashi, S. (2005) *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, **61**, 633–641.
- Jawhari, A., Uhring, M., De Carlo, S., Crucifix, C., Tocchini-Valentini, G., Moras, D., Schultz, P., & Poterszman, A. (2006) *EMBO Rep.*, **7**, 500–505.
- Flores, O., Maldonado, E., & Reinberg, D. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 8913–8921.
- Akashi, S., Nagakura, S., Yamamoto, S., Okuda, M., Ohkuma, Y., & Nishimura, Y. (2008) *Protein Sci.*, **17**, 389–400.
- Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 54–60.
- 西川 建, 峰崎善章, 福地佐斗志 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, **51**, 1827–1835.
- 西村善文, 中村春木 (2007) 蛋白質 核酸 酵素, **52**, 937–942.
- Okamoto, T., Yamamoto, S., Watanabe, Y., Ohta, T., Hanaoka, F., Roeder, R.G., & Ohkuma, Y. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 19866–19876.
- Ohkuma, Y., Hashimoto, S., Wang, C.K., Horikoshi, M., & Roeder, R.G. (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4856–4866.
- Okuda, M., Watanabe, Y., Okamura, H., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., & Nishimura, Y. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1346–1356.
- Gajiwala, K.S., Chen, H., Cornille, F., Roques, B.P., Reith, W., Mach, B., & Burley, S.K. (2000) *Nature*, **403**, 916–921.
- Meinhart, A., Blobel, J., & Cramer, P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 48267–48274.
- Kamada, K., De Angelis, J., Roeder, R.G., & Burley, S.K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3115–3120.
- 西村善文 (2000) 蛋白質 核酸 酵素, **45**, 1683–1693.
- 西村善文 (2000) 実験医学, **18**, 2587–2593.
- 西村善文 (2002) 実験医学, **20**, 196–205.
- 西村善文 (2002) 実験医学, **20**, 1988–1996.
- Okuda, M., Horikoshi, M., & Nishimura, Y. (2007) *J. Mol. Biol.*, **365**, 1047–1062.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., & Grant, P.A. (2005) *Nature*, **433**, 434–438.
- Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., & Khorasani-zadeh, S. (2005) *Nature*, **438**, 1181–1185.
- Flanagan, J.F., Blus, B.J., Kim, D., Clines, K.L., Rastinejad, F., & Khorasani-zadeh, S. (2007) *J. Mol. Biol.*, **369**, 334–342.
- Robert, F., Forget, D., Li, J., Greenblatt, J., & Coulombe, B. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 8517–8520.
- Okuda, M., Tanaka, A., Arai, Y., Satoh, M., Okamura, H., Nagadoi, A., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., & Nishimura, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 51395–51403.
- Okuda, M., Tanaka, A., Hanaoka, F., Ohkuma, Y., & Nishimura, Y. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 443–449.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., & Egly, J.M. (2000) *Cell*, **102**, 599–607.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.-M., & Reinberg, D. (1992) *Nature*, **358**, 641–645.
- Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., & Reinberg, D. (1994) *Nature*, **368**, 769–772.
- Ohkuma, Y. & Roeder, R.G. (1994) *Nature*, **368**, 160–163.
- Yamamoto, S., Watanabe, Y., van der Spek, P.J., Watanabe, T., Fujimoto, H., Hanaoka, F., & Ohkuma, Y. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 1–15.
- Okuda, M., Tanaka, A., Satoh, M., Mizuta, S., Takazawa, M., Ohkuma, Y., & Nishimura, Y. (2008) *EMBO J.*, **27**, 1161–1171.
- Gervais, V., Lamour, V., Jawhari, A., Frindel, F., Wasielewski, E., Dubaele, S., Egly, J.M., Thierry, J.C., Kieffer, B., & Poterszman, A. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 616–622.
- Di Lello, P., Jenkins, L.M., Jones, T.N., Nguyen, B.D., Hara, T., Yamaguchi, H., Dikeakos, J.D., Appella, E., Legault, P., & Omichinski, J.G. (2006) *Mol. Cell*, **22**, 731–740.
- Di Lello, P., Nguyen, B.D., Jones, T.N., Potempa, K., Kobor, M.S., Legault, P., & Omichinski, J.G. (2005) *Biochemistry*, **44**, 7678–7686.
- Bochkareva, E., Kaustov, L., Ayed, A., Yi, G.S., Lu, Y., Pineda-Lucena, A., Liao, J.C., Okorokov, A.L., Milner, J., Arrow-smith, C.H., & Bochkarev, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15412–15417.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., & Pavletich, N.P. (1996) *Science*, **274**, 948–953.
- Uesugi, M., Nyanguile, O., Lu, H., Levine, A.J., & Verdine, G.

- L. (1997) *Science*, **277**, 1310–1313.
- 48) Ptashne, M. & Gann, A. (1997) *Nature*, **386**, 569–577.
- 49) Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J., & Greenblatt, J. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7013–7024.
- 50) Pearson, A. & Greenblatt, J. (1997) *Oncogene*, **15**, 2643–2658.
- 51) Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M., & Ali, S. (2000) *Mol. Cell*, **6**, 127–137.
- 52) Di Lello, P., Miller Jenkins, L.M., Mas, C., Langlois, C., Malitskaya, E., Fradet-Turcotte, A., Archambault, J., Legault, P., & Omichinski, J.G. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 106–111.
- 53) Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R.W. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 6304–6311.
- 54) 野村 充, 西村善文 (2006) 蛋白質 核酸 酵素, **51**, 913–920.
- 55) 西村善文 (2007) 蛋白質 核酸 酵素, **52**, 966–973.
- 56) Chen, H.T., Warfield, L., & Hahn, S. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 696–703.
- 57) DeLano, W.L. (2002) <http://www.pymol.org>
- 58) Koradi, R., Billeter, M., & Wüthrich, K. (1996) *J. Mol. Graph.*, **14**, 51–55.
- 59) Nicholls, A., Sharp, K.A., & Honig, B. (1991) *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics*, **11**, 281–296.
-