報告書

平成13年度 丸木記念特別奨学研究費 A 研究実績報告書

RNA ポリメラーゼ II の転写制御と疾患の分子機構

受賞者 久武 幸司 (埼玉医科大学分子生物学教室)

共同研究者 禾 泰壽*, 濱田 光浩*, 福田 綾*

当研究では TFIID のヘリカーゼおよびキナーゼ活性の転写活性化因子による調節を中心に研究を進め、TFIIDのヘリカーゼの転写活性化での役割を明らかにした。TFIIDに含まれる2つのヘリカーゼ (ERCC3 および ERCC2) の変異により色素性乾皮症, Cockayne 症候群, TTD 等の疾患が引き起こされる。これらの疾患では DNA の修復異常と共に転写異常がみとめられるが、その分子メカニズムを TFIID の変異体を用いることによって明らかにした。当研究の結果、TFIIDは転写活性化の際、ERCC3ヘリカーゼを介して promoter escape を促進することが明らかとなった。また、PC4はアクチベーターのない基本転写では転写のレプレッサーとしても作用するが、この活性と TFIID が拮抗することが知られていた。TFIIDの変異体を用いた解析より、TFIIDのヘリカーゼ活性がPC4の転写抑制活性と拮抗することが明らかとなった。このことより、PC4の転写抑制機構に新しいモデルを提唱することが出来た。一方、アクチベーター存在下ではPC4は強力なコアクチベーターとして作用するが、このメカニズムを *in vitro* 転写系を用いて解析した。PC4は転写活性化の際に PIC (preinitiation complex) の形成を促進するのみならず、promoter escape でも作用することを明確にした。この過程でも PIC 形成と同様に TFIIA と TAFs が必要である。アクチベーターの数を少なくすると転写活性化は著しく減少するが、このときには PIC の形成は促進されておらず、promoter escape のみが転写活性化のターゲットとなる。また、アクチベーターが協調性を示すのは、PIC 形成と promoter escape を同時に促進するためであることが分かった。PC4は TFIID と相互作用し、PC4のコアクチベータードメインと一致し、この相互作用が重要であることが示された。またPC4と TFIID の相互作用はアクチベーターの相互作用と異なり、PC4のリン酸化では消失せずむしろ強まることが示された。以上の結果より、転写の制御には TFIID の ERCC3 が重要な働きをして

*埼玉医科大学分子生物学教室

いることが明らかとなり、この遺伝子の変異で引き起こされる色素性乾皮症, Cockayne 症候群, TTD 等の疾患で見られる転写の異常は promoter escape での転写制御の異常が関与していることが示唆された。

GAL4-VP16 の *in vitro* 転写活性化系はモデル系としては優れているが、GAL4-VP16は人工的なアクチベーターであるため生体内で起こる転写制御の解析には必ずしも最適とは言えない。そこでこの系を発展させ、より生理的現象に直結する転写制御を解析し、病態に關与する因子を同定するために、c-fos 遺伝子のエンハンサー・プロモーターに G-less cassette をつなぎ簡単に *in vitro* 転写が行いうる鋳型 DNA を作製した。また c-fos に作用する転写因子群 (ATF1, SRF, Elk-1, CREB) の cDNA を用いてそれらの転写因子を全てバキュロウイルス発現系にて大量発現・精製した。DNase I footprint および gel shift アッセイにより、ATF1, SRF, Elk-1, CREB は MAP kinase によるリン酸化とは無関係に DNA に結合することを明らかにした。ATF1, SRF, Elk-1, CREB を c-fos 遺伝子の非クロマチン鋳型の転写系にてアッセイすると、これらの因子の転写活性化能には MAP kinase によるリン酸化が必須であることが示された。またこれらの因子は単独では転写活性化能が低い、同時に c-fos のエンハンサーに結合すると協調的に作用し c-fos 遺伝子の転写を強く活性化する。さらに、この活性化にはコアクチベーターが3種類必要であることを見いだした。そのうちの2つは p300/CBP と Mediator 複合体であるが、もう一つは新規のコアクチベーターで、RNA 結合タンパク質 NF90/NF45 を含む複合体であり、c-fos 遺伝子に特異的に働き、主に Elk-1/SRF の転写活性を上げる。既に他の研究により NF90/NF45 は PKR によって制御されることが分かっており、当研究の結果とあわせると、PKR から NF90/NF45 を介して c-fos に至る新たなシグナル伝達系があることが明らかとなった。従来より、幾つかの病態で PKR の活性化と c-fos の転写上昇が報告されていた。例えば、Alzheimer 病や Huntington 病などの神

経変性疾患では neuron 内で PKR の活性化が何らかの形で関与しているのみならず, c-fos の発現が上昇していることが分かっている. NF90/NF45 は PKR から c-fos へのシグナル伝達に関与することによって, これらの病態に深く関与していると思われる.

さらに, クロマチンの構造変化による転写制御機構の解析を行うために, *in vitro* で c-fos 遺伝子上にクロマチンを再構成する系を立ち上げた. この系を用いて core histone の修飾による c-fos の転写制御を調べるために, core histone を大腸菌で発現させて組換え

体のクロマチンを再構成する系を開発した. さらに, histone のアミノ末端 tail のアセチル化, リン酸化, メチル化の部位に変異を入れ, これらの修飾が起きない histone も作製している. 現在, c-fos を活性化するキナーゼがどの因子のどの残基に作用し, いかにして c-fos の転写を活性化するのかを解析しており, preliminary な結果としてクロマチンにした c-fos 遺伝子上では MAP kinase は ATF1, SRF, Elk-1, CREB をリン酸化するだけでは転写活性化はできず, クロマチンを修飾することが必要である結果を得ている.