

Thesis

RNAポリメラーゼIIと基本転写因子の相互作用

埼玉医科大学産科婦人科学教室

(指導：畑 俊夫教授)

保母 順造

RNAポリメラーゼII (Pol II) は蛋白質をコードする遺伝子の転写を行い、メッセンジャー RNA (mRNA) を産生する。遺伝子の転写はプロモーターより開始されるが、Pol II 単独ではプロモーターを認識できず、プロモーターに結合している2種の基本転写因子 (TFIIBとTFIID) と相互作用してプロモーターに特異的に結合できる。次にPol IIに3種類の転写因子 (TFIIE, TFIIFおよびTFIIH) が結合してPol IIが活性型になり転写を開始する。そして転写開始後、伸長反応に移ると伸長因子 (SII および ELL) がPol IIに作用する。Pol IIは12個のサブユニットから構成され、各々のサブユニットは遺伝子の転写においてそれぞれの役割を果たしていると考えられる。12個のサブユニットのうち、大サブユニットRPB1およびRPB2はそれぞれDNA結合能およびRNA合成能を有しているが、その他の10個の小サブユニット (RPB3, RPB4, RPB5, RPB6, RPB7, RPB8, RPB9, RPB10 α , RPB10 β およびRPB11) の機能の多くは未だ不明である。そこでPol II小サブユニットの転写開始、転写伸長における機能を明らかにする目的で、各小サブユニットと基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIEおよびTFIIF) および伸長因子 (SIIおよびELL) の相互作用をGST-pulldown assayを用いて調べた。その結果、RPB10 α およびRPB10 β については基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIEおよびTFIIF) と相互作用している事が示唆された。次にRPB10 α およびRPB10 β の変異体を構築し、その相互作用の領域を決めた。その結果RPB10 α のC末端がTFIIEとの相互作用に必要であることが示唆された。これらの事は、RPB10 α とRPB10 β サブユニットが転写開始に重要な機能を果たしている事を意味し、特にRPB10 α のC末端が転写開始に重要な機能をはたしている事を意味する。

Abbreviations

CTD: C-terminal domain

RPB: RNA polymerase B=RNA polymerase II

TBP: TATA-binding protein

TFIID: Transcription factor II D

TFIIH: Transcription factor II H

GST: Glutathione S-transferase

SDS: Sodium dodecyl sulfate

TFIIB: Transcription factor II B

TFIIE: Transcription factor II E

緒言

遺伝子発現の調節には転写段階での調節が重要であり、転写はRNAポリメラーゼによって行われている。真核生物には3種類のRNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼI (Pol I)、RNAポリメラーゼII (Pol II) およびRNAポリメラーゼIII (Pol III) が存在する¹⁾。Pol IはリボソームRNA (rRNA) をコードする遺伝子の転写を行い、Pol IIはメッセンジャー RNA (mRNA) をコードする遺伝子の転写を行う。そしてPol IIIはリボソームの構成要素である5SrRNA、またトランスファーRNA (tRNA) をコードする遺伝子の転写を行う。

医学博士 甲第752号 平成13年3月23日 (埼玉医科大学)

Pol IIは12個のサブユニット (RPB1, RPB2, RPB3, RPB4, RPB5, RPB6, RPB7, RPB8, RPB9, RPB10 α , RPB10 β およびRPB11) から構成されている。それらサブユニットのアミノ酸配列は真核生物の間で保存されており、またRBP1, RPB2, RPB3 およびRBP11はそれぞれ大腸菌のRNAポリメラーゼの β' , β および α サブユニットと相同性がある。大腸菌のRNAポリメラーゼの β サブユニットはRNA合成能を有し、 β' サブユニットはDNA結合能を有する。そして α サブユニットは β サブユニットおよび β' サブユニットの会合のコアになる²⁾。これらの相同性および遺伝学、生物学的なデータに基づき、RBP1とRBP2はそれぞれDNA結合とRNA合成に関与し、RBP3とRBP11は α サブ

ユニットと同様に RPB1 と RPB2 の会合のコアであると信じられている³⁻⁸⁾。一方、真核生物の Pol II には大腸菌には存在しない 8 つのサブユニットが存在し、これらのサブユニットで真核生物の複雑な転写制御に対応していると考えられる。これら 8 つのサブユニットの内、RPB4 は RPB7 と複合体を形成し、転写開始複合体形成後のステップに重要とされている⁹⁾。また RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 α および RPB10 β は Pol I, Pol II および Pol III の間で共通のサブユニットであり、共通の機能を有すると考えられている。そして RPB9 は転写開始部位の決定に重要な役割を果たしている事が知られている¹⁰⁾。

Pol II が遺伝子上の正確な位置から転写を開始するためには、基本転写因子と呼ばれる蛋白質 {TFIIB, TFIID (TBP と多数の TBP-associated factors より構成される), TFIIE (TFIIE α および TFIIE β より構成される), TFIIF (RAP30 および RAP74 より構成される) および TFIIH (XPB, XPD, p62, p52, p44, p34, MAT34, MAT1 および cyclinH)} が必要である¹¹⁻¹⁶⁾。転写開始の際にはプロモーターにまず TFIID が結合し、次に TFIIB について Pol II と TFIIF, そして TFIIE と TFIIH が結合し転写開始複合体を形成する。TFIIB は、TATA element と転写開始位置を結ぶ橋の様な働きをしており、TFIID は TBP と多数の TBP-associated factors より構成され、TATA element に結合し主に転写開始部位を決定する働きをしている。また、TFIIE は TFIIH と Pol II の会合のコアとなり、TFIIH の CTD キナーゼの活性化に関与している¹⁷⁻¹⁸⁾。そして TFIIH は 9 個のサブユニットから成り、ヘリカーゼ活性、CTD キナーゼ活性を有し、転写以外に DNA 修復に関与していることが知られている¹⁹⁻²¹⁾。これらの基本転写因子と Pol II の複合体である転写開始複合体は、転写制御因子の標的となっており、転写の制御において重要な役割を担っている。

Pol II 複合体中のサブユニット間の相互作用を知るために、Acker ら²²⁾ は Pol II サブユニット間の相互作用を GST-pulldown assay で調べており、RPB3 および RPB5 が Pol II を形成するにあたり中心的役割を果たしていることを示している。また、Bushnell ら¹⁵⁾ は Pol II と基本転写因子 (TFIIB, TFIIE, TFIIF および TFIIH) の相互作用を BIACORE で調べ、Pol II が TFIIB, TFIIE および TFIIF と結合することを示している。そして最近、Cramer ら²³⁾ は酵母の Pol II を X 線回折で調べ、Pol II の立体構造を明らかにした。しかし、Pol II の各々のサブユニットと基本転写因子との相互作用を詳細に調べた報告はない。

そこで、本論文では Pol II 小サブユニット (RPB3 ~ RPB11) の機能を解析するための第一歩として、転写開始に必要な基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIE および TFIIF) および転写伸長に関与している伸長因子²⁴⁻²⁶⁾

(SII および ELL) と Pol II 小サブユニットの相互作用を GST-pulldown assay を用いて調べた。

方 法

Pol II サブユニット RPB3 から RPB11 の cDNA の単離

RT-PCR のキット (BOEHRINGER MANNHEIM) を使用し、HeLa 細胞より抽出した mRNA を鋳型として逆転写反応を行った後、それぞれのサブユニットの open reading frame (ORF) を増幅するように 5' 末端と 3' 末端に degenerate primer を設計し、逆転写反応産物である cDNA を鋳型として 0.5 μ M primer, 25 mM dATP, 25 mM dGTP, 25 mM dCTP, 25 mM dTTP, cloned pfu buffer および pfu DNA ポリメラーゼ (STRATAGENE) を 1U を含め、総量 50 μ l で PCR (94 $^{\circ}$ C 1 分, 55 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 5 分 $\times$ 25 cycle) を行った。増幅された DNA 断片は 0.7% アガロースゲルで電気泳動により単離し QIAX (QIAGEN) でゲルより回収した。RPB3, RPB4, RPB5, RPB10 α および RPB10 β の ORF の塩基配列の中にサブクローニングの際に不都合な DNA 制限酵素部位が存在したために、それらの部位を Kunkel 法²⁷⁾を用いて以下の如く、アミノ酸を変えない変異を導入し、制限酵素部位を破壊した。RPB3 は 125 番目のアミノ酸プロリンの CCC を CCT に変え *Sma* I 部位を壊した。RPB4 は 37 番目のアミノ酸ヒスチジンの CAT を CAC に変え *Nde* I 部位を壊した。RPB5 は 172 番目のアミノ酸イソロイシンの ATC を ATT に変え *Bam*H I 部位を壊した。RPB10 α は 32 番目のアミノ酸アスパラギン酸の GAT を GAC に変え *Bam*H I 部位を壊した。RPB10 β は 31 番目のアスパラギン酸の GAT を GAC に変え *Nde* I 部位を壊した。

Kunkel 法

pBluescriptKS (-) にサブクローン化されたそれぞれの Pol II サブユニットを有するプラスミドを大腸菌 BW313 [HfrKL 16 PO/45 {lys (61-62) / *dut1*, *ung 1*, *thi-1*, *relA1*}] に導入し、2 ml の LB-ampicillin 培地で OD₆₀₀ 0.5 ~ 1.0 になるまで 37 $^{\circ}$ C で前培養した。200 ml の LB 培地にウリジンを 0.4 mg/ml になるように加え、その中に前培養した菌を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。その後ファージ M13KO7 (1.0 $\times 10^{10}$ /ml) を 5 ml 加え 6 時間から終夜培養した。その培養液を 8,000 rpm で 20 分遠心し菌を除去し、上清を回収した。その上清に上清の 1/5 量容量の 20% PEG-2.5 M KCl を加え、室温で 15 分放置し、8,000 rpm で 20 分遠心しファージを回収した。上清をよく除いた後、ベレットを 7 ml の Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (pH8.0) に懸濁した。フェノール抽出 2 回、クロロフォルム抽出 1 回を行い、エタノール沈殿を行った。DNA を 100 μ l の TE 緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、その一部をエチジウムブロマイド (EtBr) を含むアガロースゲルで電気泳動し、一本鎖 DNA (ssDNA) が調整できた事を確認した。塩基配列の一部に目的の

変異が入っているオリゴヌクレオチドをssDNAとアニーリングさせ、その後T7 DNAポリメラーゼで伸長反応を行い、T4 DNAリガーゼで接着した後、アガロースゲルで電気泳動を行った。

融合タンパク発現ベクターへのサブクローニング

増幅、単離されたPol IIサブユニットのDNA断片はPCRにてN末端をATGを含む*Nde* I部位に、C末端を*Bam*H Iに変え、GST融合タンパク発現ベクターpGEX2TL (+) (Modified pGEX2T, Pharmacia Biotech)の*Nde* I部位から*Bam*H I部位にN末端にGSTタンパクが融合するようにフレームをあわせてサブクローニングした。基本転写因子TBP, TFIIB, TFIIEとTFIIFおよび伸長因子SIIとELLはプラスミドpET-FLAG3a (Novagen)の*Nde* Iから*Bam*H I部位に発現タンパクの

N末端にFLAGタンパクが融合するようにフレームをあわせてサブクローニングした。

RPB10 α およびRPB10 β の変異体の作製

RPB10 α はCX₂CX₁₃CX₂Cという典型的な亜鉛結合配列を有し、一方RPB10 β はCX₂CGX_nCCRという非典型的な亜鉛結合配列を有する²⁸⁻³⁰。これらの亜鉛結合配列はヒトRPB10 α 、酵母RPB10 α 、ヒトRPB10 β 、酵母RPB10 β に保存されている (Fig. 1A)。いずれもKunkel法によりシステインをセリンに変えることによって亜鉛結合配列を壊した (Fig. 1A)。またRPB10 α とRPB10 β のN末端もしくはC末端のいずれかを欠失した変異体はpfu DNAポリメラーゼを用いて、PCR (94°C 1分, 55°C 1分, 72°C 5分 × 25 cycle)により作製した (Fig. 1B)。

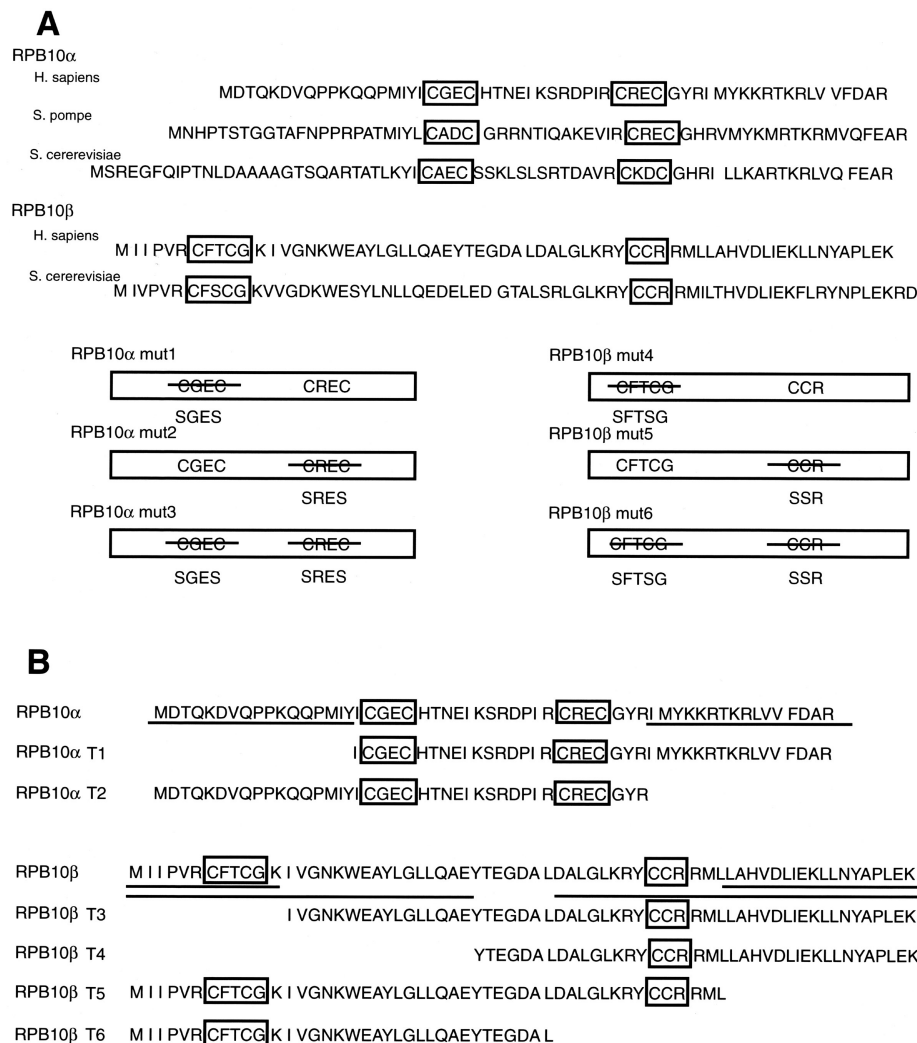


Fig. 1. Amino acid sequence of RPB10 α and RPB10 β , and mutagenesis of RPB10 α and RPB10 β . A, (upper part) amino acid sequence alignment of RPB10 α of Homo sapiens, Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe. Zinc-binding motifs are boxed. (lower part) mutagenesis of zinc-binding motifs. Two cysteine residues of each region are substituted to serine residues by Kunkel's method. B, (upper part) construction of the N-terminal or C-terminal truncated derivatives of RPB10 α . The deleted portions are underlined in the full-length sequence. The zinc-binding motifs are boxed. (lower part) construction of the N-terminus or the C-terminus truncated derivatives of RPB10 β . The deleted regions are underlined in the full-length sequence. The zinc-binding motifs are boxed.

タンパク発現

それぞれの融合蛋白を持つタンパク発現ベクターで大腸菌BL21 (DE3) *pLysS* {*hsdSgal* (λ *cIts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*)} を形質転換した後、LB-ampicillin 培養で 30 °C で OD₆₀₀ が 0.6 まで増殖させ、イソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を 1 mM になるように培地に加え、タンパク発現を誘導し、さらに 3 時間培養を行った。また RPB10 α と RPB10 β の変異体のタンパクの可溶性は低かったためタンパク発現誘導を 23 °C で行った。GST 融合タンパクを SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 上で電気泳動し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色でその発現を確認した (Fig. 2)。

GST-pulldown assay

各 GST-Pol II 小サブユニット融合蛋白を 50 μ l (1:1) のグルタチオンセファロース 4B (Amersham Pharmacia Biotech) を 4 °C で緩衝液 {20 mM Hepes-KOH (pH7.9), 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.01% Triton-X, 100 mM KCl} 中で 1 時間培養した。そして GST 融合タンパクの結合したレジンに緩衝液で 4 °C で 4 回洗浄した。このとき各々の GST 融合タンパク量をレジンに同量結合するように調節した。洗浄後レジンを N 末端に FLAG エピトープタグを付加した基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIE および TFIIIF) または伸長因子 (SII および ELL) を各々混合し、4 °C でロータリーシェイカーで 1 時間混合した。混合後、レジンを上記の緩衝液を用い 4 °C で 4 回洗浄し、レジ

ンをサンプルバッファーと混合して煮沸後、SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) 上で電気泳動した。なお input にはレジンに含まれる 1/10 量の FLAG エピトープタグを付加した基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIE および TFIIIF) または伸長因子 (SII および ELL) を電気泳動した。

ウェスタンブロット

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパクを Immobilon (Millipore) にセミドライ転写装置を用いブロットし (200 mA 定電流で 1 時間通電)、ECL Western blot detecting system (Amersham Pharmacia Biotech) にて検出した。なお 1 次抗体は (ANTI-FLAG M2 antibody, SIGMA), 2 次抗体は Affinity purified peroxidase labeled Goat anti-mouse IgG (KPL) を使用した。

結果

Pol II サブユニットと基本転写因子および伸長因子の相互作用

GST を N 末端に融合させた Pol II 小サブユニット (RPB3 から RPB11) を大腸菌で発現させ SDS-ポリアクリルアミドゲル (10%) で電気泳動を行い、各融合タンパクの発現を確認した (Fig. 2)。一方、基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIE, および TFIIIF) と伸長因子 (SII および ELL) は N 末端に FLAG エピトープタグを融合させて大腸菌で発現させた。

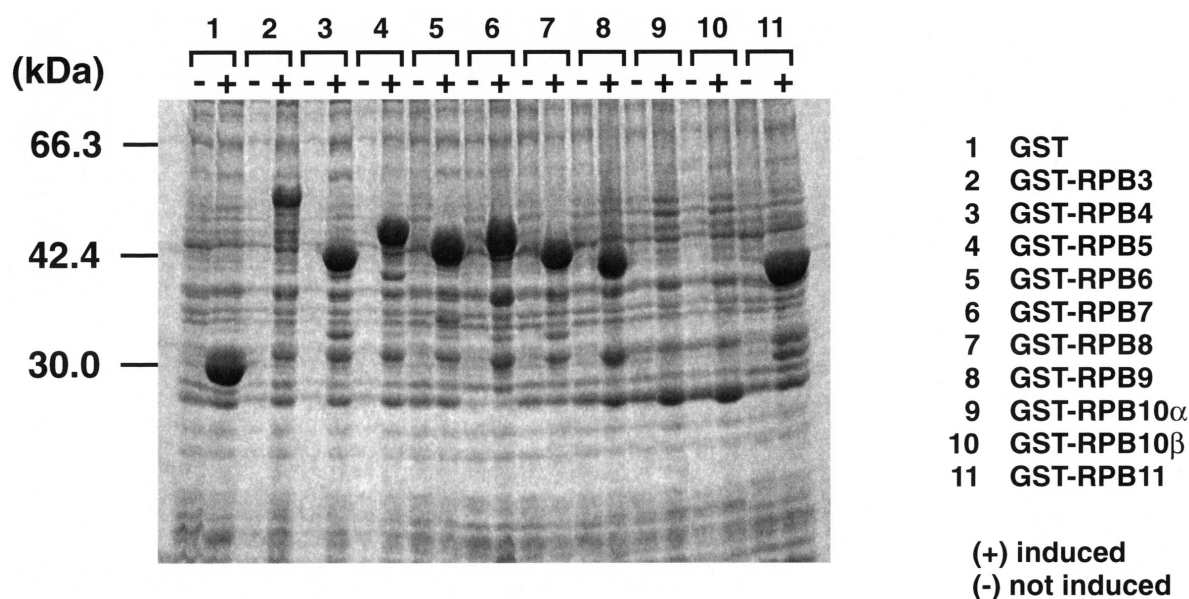


Fig. 2. Fusion proteins of GST with various small subunits of Pol II. The fusion proteins were extracted from induced culture by addition of IPTG (+) or non-induced culture as control (-), separated on SDS-polyacrylamide gel and visualized by CBB staining. The molecular masses of the protein standards are shown in kilodaltons on the left.

GST-Pol II小サブユニット融合タンパクをグルタチオンセファロース 4Bに結合させ、FLAGエピトープタグを付加した各基本転写因子タンパクと混合し、GST-pulldown assayを行った。その結果、TBPはRPB3, RPB5, RPB6, RPB7, RPB10 α および RPB10 β と相互作用し、弱いながら RPB4 および RPB8 にも相互作用した (Fig. 3, lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 および 11)。TFIIBはRPB7, RPB10 α および RPB10 β と相互作用した (Fig. 3, lanes 7, 10 および 11)。TFIIEはTFIIE α および TFIIE β の2種類のサブユニットから成り、TFIIE α はRPB3, RPB10 α および RPB10 β と相互作用し、また弱いながら RPB4, RPB7 および RPB8 にも相互作用した (Fig. 4, lanes 4, 5, 8, 9, 11 および 12)。TFIIE β はRPB10 α および RPB10 β と相互作用した (Fig. 4, lanes 11 および 12)。TFIIFのサブユニットであるRAP74およびRAP30はRPB10 α および RPB10 β と相互作用し、特にRAP30とRPB10 α は強く結合した (Fig. 5, lanes 11 および 12)。一方、伸長因子であるSIIおよびELLはPol IIの小サブユニットと、この条件では相互作用は認められなかった (Fig. 6)。以上の結果をまとめたものをTable 1に示す。

RPB 10 α および RPB 10 β と基本転写因子の相互作用

RPB10 α および RPB10 β とTBP, TFIIB, TFIIE, およびTFIIFとの相互作用が認められたので、RPB10 α と RPB10 β のどの領域がこれら基本転写因子との相互作用に関与しているのかを同様の手法で調べた。RPB10 α と RPB10 β はそれぞれ典型的CX₂CX₁₃CX₂C、非典型的CX₂CX₂CCRな亜鉛結合配列モチーフを有する。通常、亜鉛結合配列はDNAへの結合に関与しているが、タンパク質-タンパク質相互作用にも関与している事が知られているので³¹⁾、最初に亜鉛結合

配列が基本転写因子との相互作用に関与している可能性を調べた。そこで、亜鉛結合配列のシステインをセリンに変異させた種々の変異体RPB10 α (mut1, mut2 および mut3) および RPB10 β (mut4, mut5 および mut6) を作製し (Fig. 1A), GST-pulldown assayを行った。その結果、亜鉛結合配列のN末側, C末側 およびその両方を変異せしめたRPB10 α および RPB10 β はRPB10 α 全長とおよび RPB10 β 全長と同様にTFIIEおよびTFIIFと相互作用する事が示された (Fig. 7, lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 と 10 および Fig. 8, lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 と 10)。従ってRPB10 α と RPB10 β の亜鉛結合配列は基本転写因子 (TFIIE および TFIIF) との相互作用には関与していない事が示された。そこでRPB10 α と RPB10 β のどの領域が基本転写因子TFIIEおよびTFIIFとのタンパク質-タンパク質相互作用に関与しているか調べるため、RPB10 α のN末端を17個のアミノ酸を欠失させたRPB10 α T1, C末端を16アミノ酸を欠失させたRPB10 α T2変異体を構築した。またRPB10 β のN末端を12アミノ酸および28アミノ酸を欠失させたRPB10 β T3 および RPB10 β T4, C末端を18アミノ酸および32アミノ酸を欠失させた変異体RPB10 β T5 および RPB10 β T6 を構築し (Fig. 1B), これら RPB10 α および RPB10 β の欠失変異体とTFIIE α および TFIIE β との相互作用を同様にGST-pulldown assayで調べた。その結果、RPB10 α のC末端を欠失させた変異体RPB10 α T2はTFIIE α および TFIIE β と相互作用しなかった (Fig. 9, lane 5)。従ってRPB10 α のC末端を16アミノ酸はTFIIEとの相互作用において重要な働きをしていると考えられる。以上の相互作用の結果をまとめたものをTable 2に示す。



Fig. 3. Binding of Pol II subunits to TBP and TFIIB. The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Glutathione-Sepharose 4B and incubated with TBP tagged by FLAG epitope (upper panel) or TFIIB tagged by FLAG epitope (lower panel). After extensive washing, bound proteins were separated on SDS-polyacrylamide gel followed by immunoblotting with an anti-FLAG antibody. Input shows 10% of the amounts used for each GST-pulldown. GST-RPB7 appears as a doublet probably due to a degradation of fusion protein (lower panel, lane 7).



Fig. 4. Binding of Pol II subunits to TFII E α and TFII E β . The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Gluthatione-Sepharose 4B and incubated with TFII E α tagged by FLAG epitope (upper panel) or TFII E β tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in the legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown.

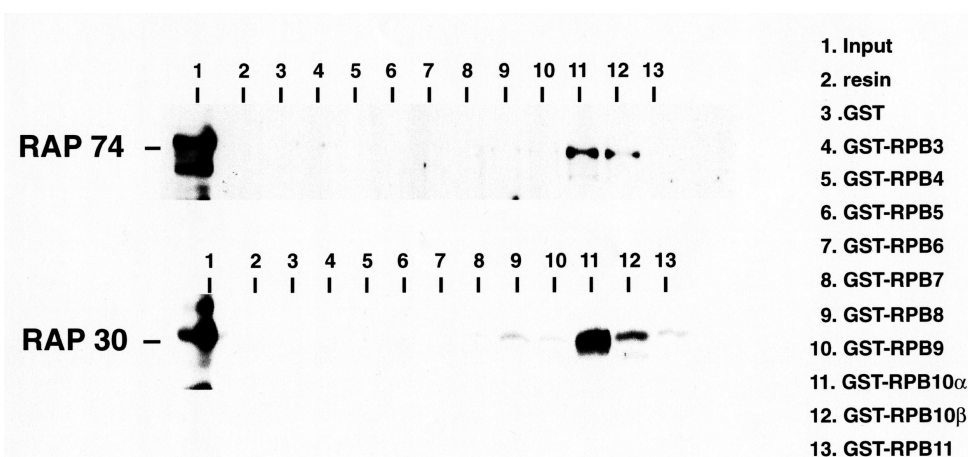


Fig. 5. Binding of Pol II subunits to TFII F (RAP74 and RAP30). The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Gluthatione-Sepharose 4B and incubated with both RAP74 tagged by FLAG epitope (upper panel) and RAP30 tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown.

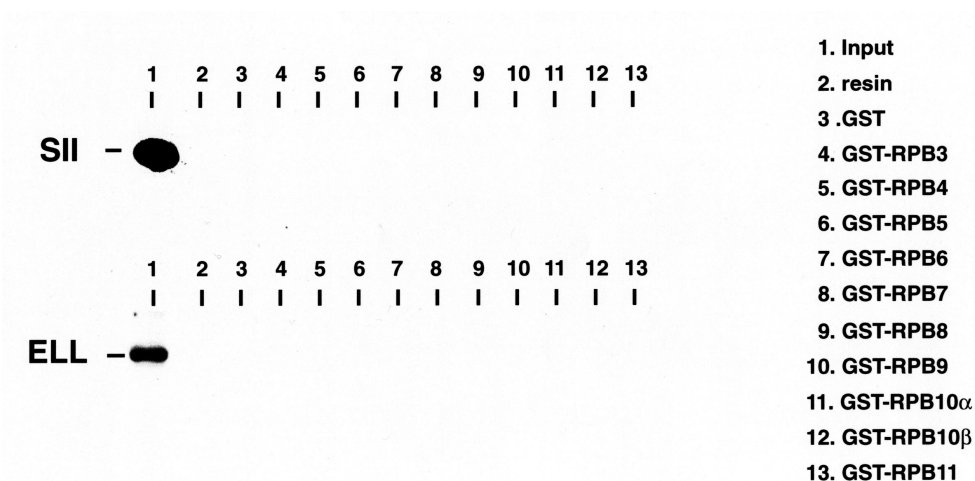


Fig. 6. Binding of Pol II subunits to elongation factors (SII and ELL). The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Gluthatione-Sepharose 4B and incubated with SII tagged by FLAG epitope (upper panel) or ELL tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown.

Table 1. Interaction between Pol II subunits and general transcription factors

	TBP	TFIIB	TFIIE α	TFIIE β	TFIIF RAP30	TFIIF RAP74	SII	ELL
RPB3	+	-	+	-	-	-	-	-
RPB4	-	-	+	-	-	-	-	-
RPB5	+	-	-	-	-	-	-	-
RPB6	+	-	-	-	-	-	-	-
RPB7	+	+	+	-	-	-	-	-
RPB8	-	-	+	-	-	-	-	-
RPB9	-	-	-	-	-	-	-	-
RPB10 α	+	+	+	+	+	+	-	-
RPB10 β	+	+	+	+	+	+	-	-
RPB11	-	-	-	-	-	-	-	-

+ and - indicates successful and unsuccessful binding between them.

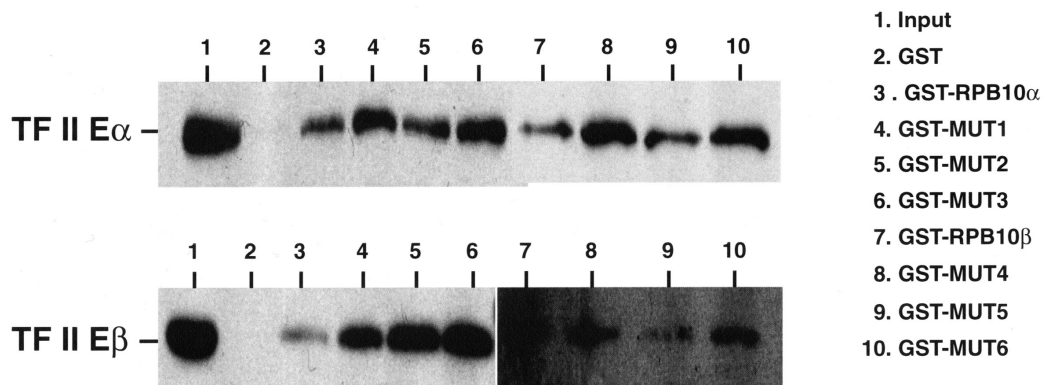


Fig. 7. Binding of mutated RPB10 α and RPB10 β to TFIIE α and TFIIE β . The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Gluthatione-Sepharose 4B and incubated with TFIIE α tagged by FLAG epitope (upper panel) or TFIIE β tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown.

考 察

Pol IIサブユニットと基本転写因子および伸長因子の相互作用

Pol II小サブユニット (RPB3 ~ RPB11) の機能を調べるために, GST-pulldown assayを用いPol II小サブユニットと基本転写因子 (TBP, TFIIB, TFIIEおよびTFIIF) および伸長因子 (SIIおよびELL) の相互作用を調べた (Table 1).

RPB10 α と RPB10 β は基本転写因子TBP, TFIIB, TFIIEおよびTFIIFと相互作用する事が示された。こ

の事から, 転写開始複合体を形成するにあたり, RPB10 α と RPB10 β は基本転写因子とPol IIが複合体を形成するときに土台の役割を担っている可能性が示唆された。

RPB10 α と RPB10 β はPol I~III共通サブユニットである事, 一方TFIIB, TFIIEおよびTFIIFはPol II系に特異的な基本転写因子であることを考慮すると, 今回の結果より共通サブユニット RPB10 α と RPB10 β はRNAポリメラーゼの種類によって, 異なる基本転写因子と相互作用する可能性が考えられる。

またTFIIBやTBPが転写開始に関与している事よ

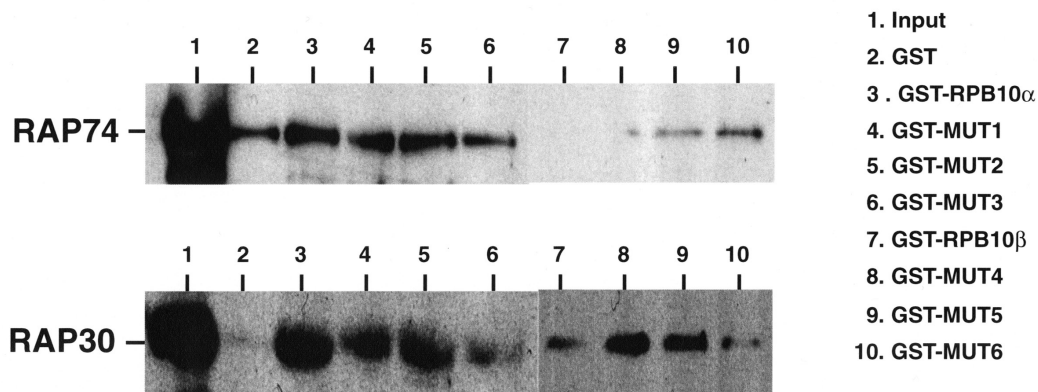


Fig. 8. Binding of mutated RPB10 α and RPB10 β to TFIIF (RAP74 and RAP30). The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Glutathione-Sepharose 4B and incubated with both RAP74 tagged by FLAG epitope (upper panel) and RAP30 tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown. It is noted that a control band was not seen in lane 7 due to probably a technical error (upper panel). A band in lane 2 of the upper panel was also due to a similar technical error since in other experiments no GST bound to RAP74.

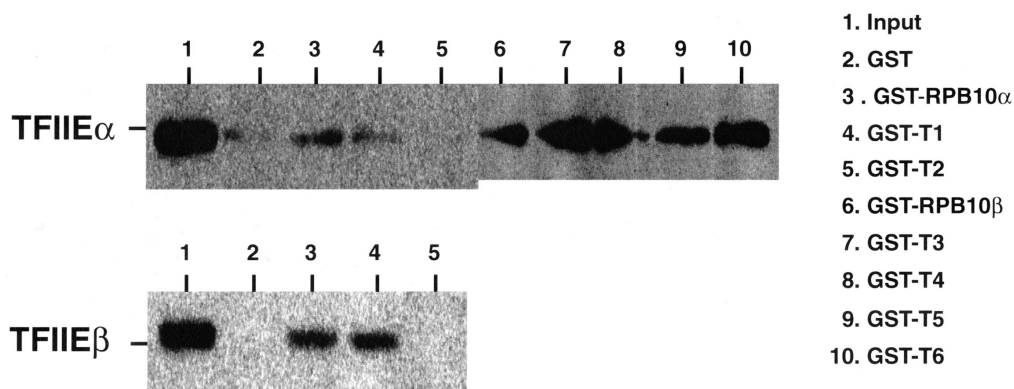


Fig. 9. Binding of deletion mutant of RPB10 α and RPB10 β to TFIIE α and TFIIE β . The GST-subunit fusion proteins were immobilized on Glutathione-Sepharose 4B and incubated with both RAP74 tagged by FLAG epitope (upper panel) and RAP30 tagged by FLAG epitope (lower panel). The immunoblot was performed as described in legend of Fig. 3. Input shows 10% of the amounts used for GST-pulldown. The GST-pulldown assay of mutant T3, T4, T5, and T6 with TFIIE β has not been done yet.

り、RPB10 α と RPB10 β も転写開始に関与している事が考えられた。さらには、TFIIEはTFIIHのCTDキナーゼ活性を高める事により転写の制御を行う事¹⁸⁾、TFIIFはPol IIの伸長反応に関与している事¹⁹⁾が知られているので、RPB10 α および RPB10 β はTFIIEおよびTFIIFを介して転写制御および転写伸長に関与している可能性も考えられる。

酵母においてSIIとRPB6の相互作用が報告されており³²⁾、またヒトPol IIサブユニットRPB5とTFIIBは相互作用することが報告されている³³⁾。しかし、本研究ではSIIとRPB6およびRPB5とTFIIBの相互作用は

共に検出されなかった。前者はPol II複合体とSIIとの相互作用を調べているため、また後者は相互作用実験の反応条件が異なるため同様な結果が本研究では得られなかったと考える。故に今後、GST pull-down assayのみで相互作用を検討するのではなく、免疫沈降法等の異なった手段による相互作用実験が必要と考えられる。現在のところ、Pol IIと伸長因子との相互作用の機構としては、小サブユニットが複合体として伸長因子に相互作用するか、もしくは大サブユニット(RPB1およびRPB2)が伸長因子に相互作用することが考えられる。

Table 2. Interaction between mutant subunits (RPB10 α and RPB10 β) and general transcription factors (TFIIE and TFIIIF)

	TFIIE α	TFIIE β	TFIIIF RAP30	TFIIIF RAP74
RPB10 α	+	+	+	+
RPB10 α mut 1	+	+	+	+
RPB10 α mut 2	+	+	+	+
RPB10 α mut 3	+	+	+	+
RPB10 α T 1	+	+	ND	ND
RPB10 α T 2	-	-	ND	ND
RPB10 β	+	+	+	+
RPB10 β mut 4	+	+	+	+
RPB10 β mut 5	+	+	+	+
RPB10 β mut 6	+	+	+	+
RPB10 β T 3	+	ND	ND	ND
RPB10 β T 4	+	ND	ND	ND
RPB10 β T 5	+	ND	ND	ND
RPB10 β T 6	+	ND	ND	ND

+ and - indicates successful and unsuccessful binding between them.
ND: not determined.

RPB10 α および RPB10 β の変異体と TFIIE および TFIIIF の相互作用

RPB10 α および RPB10 β と TFIIE および TFIIIF の相互作用について、特に RPB10 α と RPB10 β のどの領域が相互作用に必要であるかを調べた。RPB10 α と RPB10 β はそれぞれ典型的、非典型的な亜鉛結合配列を有する (Fig. 1A)。RPB10 α の亜鉛結合配列は Pol I の二番目に大きいサブユニットと相互作用を示し、N 末端側のシステインは酵母の増殖には必須である事が報告されている³⁰⁾。また RPB10 β の亜鉛結合配列のシステインも酵母の増殖には必須である事が報告されている³⁴⁾。機能的にも重要なそれらの亜鉛結合配列がタンパク相互作用に使われている可能性を考慮して、RPB10 α および RPB10 β の亜鉛結合配列の欠失変異体を構築し、TFIIE および TFIIIF との相互作用を調べたところ、亜鉛結合配列を変異せしめた RPB10 α と RPB10 β は TFIIE および TFIIIF と相互作用した (Fig. 7 および Fig. 8, lanes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 と 10)。以上の結果から、RPB10 α と RPB10 β の亜鉛結合配列は TFIIE および TFIIIF との相互作用に直接関与していな

いと考えられる。従って RPB10 α と RPB10 β の亜鉛結合配列は、他の Pol II サブユニットか他の基本転写因子 (例えば TBP, TFIIB) の相互作用に関与しているか、もしくは DNA 結合に働いている可能性がある。

RPB10 α および RPB10 β のどの領域が基本転写因子 (TFIIE および TFIIIF) との相互作用に必要なか知るために、RPB10 α および RPB10 β の N 末端もしくは C 末端を欠失させた変異体を作製し基本転写因子 (TFIIE および TFIIIF) との相互作用を調べた。C 末端より 16 個のアミノ酸を欠失させた RPB10 α の変異体 (T2) は TFIIE α および TFIIE β と相互作用しなかった (Fig. 9, lane 5)。なお、RPB10 α の C 末端は転写因子との相互作用のみならず、Pol II サブユニット RPB3 との会合にも関係している (未発表)。また、Cramer らは酵母 Pol II の X 線結晶解析において、RPB10 α の C 末端は RPB3 との相互作用に関与している事を明らかにし、さらには RPB10 α はサブコンプレックス RPB3-RPB11-RPB10 β と RPB1-RPB2 との会合のコアになっていることを提唱している²³⁾。なお RPB10 β の N 末端側または C 末端側領域が TFIIE β との結合に必要なか否かは今

後の課題である。本研究により RPB10 α の C 末端は複合体形成において重要な領域であることが明らかになった。

結 論

(1) Pol II 小サブユニットと基本転写因子および伸長因子の相互作用を調べ、RPB10 α および RPB10 β は基本転写因子と相互作用することが判明した。その結果より転写開始複合体形成において、RPB10 α および RPB10 β は Pol II 複合体と基本転写因子をつなぎ止めている働きをしていることが考えられる。

(2) RPB10 α および RPB10 β の変異体を用いた解析の結果、RPB10 α の C 末端は Pol II 複合体と基本転写因子をつなぎ止める働き以外に、Pol II 複合体形成にも働いている可能性があることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導およびご協力いただいた埼玉医科大学産婦人科学教室畑 俊夫教授をはじめ教室員の皆様、同大学将来計画研究部門村松正實教授、同大学第二生化学教室禾 泰壽教授に深く感謝いたします。また直接御指導いただいた埼玉医科大学第二生化学教室久武幸司助教授に深謝いたします。

文 献

- Young. RA. RNA polymerase II. Annu.Rev. Biochem 1991;60:689-715.
- Yura T, Ishihama A. Genetics of bacterial RNA polymerases. Annu. Rev. Genet 1979;13:59-97.
- Margurite W, Acker J, Vicaire S, Vigneron M, Keding C. Complete sequence of the human RNA polymerase II largest subunit. Nucleic Acids Research 1992;20:910.
- Allison LA, Moyle M, Shales M, Ingles CJ. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. Cell 1985; 42:599-610.
- Acker J, Wintzerith M, Vigneron M, Keding C. Primary structure of the second largest subunit of human RNA polymerase II (or B). J Mol Biol 1992; 226:1295-9.
- Sweeter D, Nonet M, Young RA. Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:1192-6.
- Svetlov V, Nolan K, Burgess RR. Rpb3, stoichiometry and sequence determinants of the assembly into yeast RNA polymerase II in vivo. J Biol Chem 1998;273:10827-30.
- Pati UK. Human RNA polymerase II subunit hRPB14 is homologous to yeast RNA polymerase I, II, and III subunits(AC19 and RPB11) and is similar to a portion of the bacterial RNA polymerase alpha subunit. Gene 1994;145:289-92.
- Orlicky SM, Tran PT, Sayre MH, Edwards AM. Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of RNA polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. J Biol Chem 2001 (in press)
- Hull MW, McKune K, Woychik NA. RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. Genes Dev 1995;15:481-90.
- Stephen Buratowski, Phillip A.Sharp. Initiation of Transcription by RNA Polymerase II. Transcriptional Regulation. 1992;227-46.
- Weil PA, Luse DS, Segall J, Roeder RG. Selective and accurate transcription at Ad2 major late promoter in soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. Cell 1979;18:469-84.
- Manley J, Fire A, Cano A, Sharp PA, Gefter M. DNA-dependent transcription of adenovirus genes in soluble whole-cell extract. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:3849-55.
- Dignam JD, Lebowitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res 1983;11:1475-89.
- Bushnell DA, Bamdad C, Kornberg D. A minimal set of RNA Polymerase II transcription protein interactions. J Biol Chem 1996;271:20170-4.
- Conaway RC, Conaway JW. Annu Rev Biochem 1993;62:161-90.
- Conaway JW, Bradsher JN, Conaway RC. Mechanism of assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. Transcription J Biol Chem 1992;267: 10142-8.
- Serizawa H, Conaway JW, Conaway RC. An oligomeric form of large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by TFIIH. J Biol Chem 1992;269:20750-6.
- Tirode F, Busso D, Coin F, Egly J-M. Reconstitution of Transcription Factor TFIIH: Assignment of Functions for the Three Enzymatic Subunits, XPB, XPD and cdk7. Mol Cell 1999;3:87-95.
- Moreland RJ, Tirode F, Yan Q, Conaway JW, Egly J-M, Conaway RC. A Role for the TFIIH XPB DNA Helicase in Promoter Escape by RNA Polymerase II. J Biol Chem 1999;274:22127-30.
- Sung P, Higgins D, Prakash L, Prakash S. Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast RAD3 protein

- abolishes its ATPase and DNA helicase activities but not the ability to bind ATP. *EMBO J* 1988;7:3263-9.
- 22) Joel Acker, Michael de Graaff, Isabelle Chynel, Vladimir Khazak, Cluude Keding, Marc Vigneron. Interaction between the Human RNA polymerase II subunits. *J Biol Chem* 1997;272:16815-21.
- 23) Cramer P, Bushnell AB, Fu Jianhua, Gnatt AL, Maier-Davis B, Kornberg RD, et al. Architecture of RNA Polymerase II and Implications for the Transcription Mechanism. *Science* 2000;288:640-9
- 24) Chen HC, England L, KAne CM. Characterization of Hela cDNA clone encoding the human SII protein, an elongation factor for RNA polymerase II. *Gene* 1992;116:253-8.
- 25) Yoo OJ, Yoon HS, Baek KH, Jeon CJ, Miyamoto K, Agarwal K. Cloning, expression and characterization of human transcription elongation factor, TFIIS. *Nucleic Acids Research* 1991; 19:1073-9.
- 26) Thirman MJ, Levitan DA, Kobayashi H, Simon MC, Rowley JD. Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11:19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:12110-4.
- 27) Kunkel TA, Roberts JD, Zkour RA. Rapid and efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection. *Methods Enzymol* 1987;154:367-82.
- 28) Treich I, Riva M, Sentenac A. Zinc-binding subunits of yeast RNA polymerases. *J Biol Chem* 1991;266: 21971-6.
- 29) Shpakovski GV, Acker J, Wintzerith M, Lacroix J-F, Thuriaux, Vigneron M. Four Subunits That Are Shared by the Three Classes of RNA Polymerase Are Functionally Interchangeable between Homo sapiens and *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol* 1995;15:4702-10.
- 30) Rubbi L, Labarre-Mariotte S, Chedin S, Thuriaux P. Functional characterization of ABC10alpha, an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 1999;274:31485-92.
- 31) Mackay JP, Crosseley M. Zinc finger are sticking together. *Trends Biochem Sci* 1998;23:1-3.
- 32) Ishiguro A, Nogi Y, Hisatake K, Muramatsu M, Ishihama I. The Rpb6 subunit of Fission Yeast RNA Polymerase II Is a Contact Target of the Transcription Elongation Factor TFIIS. *Mol Cell Biol* 2000;20:1263-70.
- 33) Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein Is a Transcriptional Modulator That Communicates with Transcription Factor IIB and the RNA Polymerase II Subunit 5. *J Biol Chem* 1997;272: 7132-9.
- 34) Gadal O, Shpakovski VG, Thuriaux P. Mutants in ABC10 β , a Conserved Subunit Shared by All Three Yeast RNA polymerases, Specifically Affect RNA Polymerase I Assembly. *J Biol Chem* 1999;274: 8421-7.