

所属 (主指導教官)	動物遺伝子機能学講座 (川市 正史教授)		
氏名	小林 晶子	提出	平成14年 1月 8日
題目	TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す NSL 遺伝子群の単離と解析		

要旨

TFIID は、高等真核生物の *in vitro* 転写再構成系から転写活性化に重要な因子として単離された蛋白質複合体で、TATA-binding protein (TBP) と TBP-associated factors (TAFs) からなる。これらの TAFs のうち TAF145 には、その N 末端領域に TBP と強く相互作用し、転写活性化の際の TFIID の構造変化に大きく寄与すると考えられる領域 (TAND: TAF N-terminal domain) が存在する。本研究では、TAF145 の TAND 領域の機能を遺伝学的な見地から明らかにするために、出芽酵母を用いて、TAND 欠失変異に対する合成致死性変異株の単離を ADE 遺伝子を利用したコロニーセクタリングアッセイにより行った。合成致死性を利用する方法は、様々な相互作用をする分子を得ることができるが、特に重複する機能を持つ分子を同定するのに有効な方法とされている。スクリーニングにより取得した 14 株の合成致死性変異株のうち 3 株については、TBP 及び TAF61 遺伝子のミスセンス変異を合成致死性変異として同定し、*tbp* 変異アレルを *ns1*( $\Delta$ TAND synthetic lethal) 1-1, *ns1*1-2, *taf61* 変異アレルを *ns1* 2-1 と名付けた。

*ns1* 1-1 変異である S118L、*ns1* 1-2 変異である P65S はすでに報告されている温度感受性を引き起こす *tbp* 変異であり、S118L は転写活性化能を欠損する変異として、P65S は RNA polymerase III による転写に影響を与える変異として知られていた。P65S は *polIII* 系の転写活性化能については調べられていなかったため、P65S 変異をもつ酵母細胞内で 6 種類の転写調節因子に対する応答能を  $\beta$ -ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子に用いて検討したところ、調べた全ての転写調節因子に対して応答能が低下していた。さらに S118L、P65S について生化学的な解析を行ったところ、両者とも DNA 結合能は保持していたが、DNA-TBP-TFIIA 複合体形成能を欠いていた。また、GST-VP16 アクティベーションドメインとの結合が、野生型の TBP と比較して強固になっていた。これらのことから、ある一定の生化学的性質を持ち、*polIII* 系の転写活性化能が欠損している *tbp* 変異は TAND 欠失変異と合成致死性を示す可能性が示唆された。そこで、既知の転写活性化能を欠損する *tbp* 変異が TAND 欠失変異と合成致死性を示すかどうかを調べた。その結果、S118L、P65S を含む転写活性化能欠損が知られている *tbp* 変異のうち、K138T/ Y139A, N159D, N159L, V161A, E236P, F237D は  $\Delta$ TAND と強い合成効果を示した。F148H, T153I では、前者の *tbp* 変異よりも若干弱いようであったが、合成効果は認められた。一方で、*polIII* 系の転写には影響するが *polIII* 系の転写には影響の無い変異である R220H, Y231A では、 $\Delta$ TAND との合成効果は全く認められなかった。次に、これらの *tbp* 変異体について DNA 結合能、TFIIA 結合能、VP16 アクティベーションドメインとの結合能を S118L, P65S と同様に調べた。

DNA 結合能、TFIIA 結合能において TAND 欠失型 taf145 と合成致死となる *tbp* に一貫した傾向は見られなかったが、強い合成致死性を示した *tbp* 変異体は VP16 アクティベーションドメインと強固に結合する傾向にあった。この結果は、TBP がアクティベーターとあまり強く結合し、解離することが難しくなると転写活性化に支障をきたすということを示唆している。我々のグループは転写活性化の初発段階（TBP がプロモーターにリクルートされる前の段階）が、TAND, TBP, 転写調節因子が柔軟に結合したり解離したりして行われるという、2段階ハンドオフモデルを提唱しているが、このモデルに矛盾しない。さらに、転写活性化過程のどの段階が欠損しているのかを調べる目的で、TBP 変異型蛋白質をプロモーター上へ強制的にリクルートしてそれ自身の転写活性化能を測定したところ、強い合成致死性を示した *tbp* 変異体は野生型 TBP に比べてその活性が著しく低下していた。このことから強い合成致死性を示した *tbp* 変異体は、プロモーターにリクルートされた後の転写活性化の過程にも欠陥があると考えられる。この結果と、TAND は TBP がプロモーターにリクルートされる前に働くという上記のモデルを考えあわせると、合成致死を示す酵母内では、TFIID のプロモーターへのリクルート前後の両ステップに欠陥が生じている可能性が考えられる。

*ns1 2-1* では、TAF61 の H2B 様第一ヒストンフォールド領域内 420 番目のアミノ酸であるロイシンがセリンに変化しており、この変異を持つ酵母株は温度感受性を示し、VP16, TAND1 に対する転写活性化能を欠いていた。そこで、TAF61 のヒストンフォールド領域付近に変異を持つ *taf61* 変異体及び変異株を数種類作成して、 $\Delta$ TAND と合成致死を示すかどうか、転写活性化能を保持しているかどうか、その変異がヒストンフォールド領域の機能を実際に損ねているかどうかを検討した。その結果、 $\Delta$ TAND と合成致死を示す *taf61* 変異は、影響を受ける転写因子の種類は株により異なるが、転写活性化能を欠損しており、ヒストンフォールド領域で結合する ADA1 や TAF48 との結合能も低下していた。このことは、これらの *taf61* 変異がヒストンフォールド領域の機能を損ねていることを示しているだけでなく、TFIID, SAGA 複合体の両者に影響を与えている可能性も示唆している。実際、これらの *taf61* 変異株中の温度感受性を示す株については、制限温度下において TFIID, SAGA 両複合体の転写機能に正および（又は）負の影響が出ていることが明らかになった。また、*taf61* 変異体の転写活性化能が低下していたことから、 $\Delta$ TAND と合成致死を示す *tbp* 変異の解析で行ったのと同様に、変異型蛋白質をプロモーター上へ強制的にリクルートしてそれ自身の転写活性化能を測定した。すると、*tbp* 変異の場合とは異なり、*taf61* 変異の場合は野生型と同程度の活性化能が見られた。さらに TAND 機能に発現が依存する遺伝子群の転写に及ぼす影響を調べたところ、やはり *tbp*, *taf61* 変異体間において違いが認められた。従って *tbp*, *taf61* 両変異体の示す合成致死性は、それぞれ異なる分子機序によるものと考えられる。

本論文の後半では、最近示されている TFIID の多様性が、初期胚の転写制御に関与している可能性を考え、TATA ボックスを含むプロモーターと TATA-less プロモーターの両者により制御されている *Uni Otx* 遺伝子をモデルとして、その発現時期に TATA ボックスが与える影響を検討した。その結果、TATA ボックスが存在するときは発現が遅れ、ないときには発現が早まるという現象が観察された。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小林 晶子

本論文は、高等真核生物の基本転写因子、TFIID、の構成蛋白である TAF145 の N 末端 (TAND) 領域の機能を遺伝学的な見地から明らかにするために、出芽酵母を用いて、TAND 欠失変異に対する合成致死性変異株を単離し、取得した 14 株の合成致死性変異株のうち 3 株について詳細な解析を加えたものである。同定された 3 株は、TBP 及び TAF61 遺伝子のミスセンス変異を持つことが明らかになり、*tbp* 変異アレルを *ns1* ( $\Delta$ TAND synthetic lethal) 1-1, *ns1* 1-2, *taf61* 変異アレルを *ns1* 2-1 と名付けた。

*ns1* 1-1 変異である S118L は転写活性化能を欠損する変異として、P65S は RNA polymerase III による転写に影響を与える変異として知られていた。そこで、P65S 変異についても酵母細胞内で 6 種類の転写調節因子に対する応答能を  $\beta$ -ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子に用いて検討したところ、調べた全ての転写調節因子に対して応答能が低下していた。さらに S118L, P65S について生化学的な解析を行ったところ、両者とも DNA 結合能は保持していたが、DNA-TBP-TFIIA 複合体形成能を欠いていた。また、GST-VP16 活性化ドメインとの結合が、野生型の TBP と比較して強固になっていた。これらのことから、ある一定の生化学的性質を持ち、polIII 系の転写活性化能が欠損している *tbp* 変異は TAND 欠失変異と合成致死性を示す可能性が示唆された。そこで、既知の転写活性化能を欠損する *tbp* 変異について調べた結果、予想どおり合成致死性を示すことが明らかになった。また、一般に強い合成致死性を示した *tbp* 変異体は、TFIIA 結合能が弱まり、VP16 活性化ドメインと安定に結合する傾向にあった。この結果は、転写活性化の初発段階が、TAND, TBP, 転写調節因子が柔軟に結合したり解離したりして行われるという、2 段階ハンドオフモデルに合致する。

*ns1* 2-1 では、TAF61 の H2B 様第一ヒストンフォールド領域内 420 番目のアミノ酸であるロイシンがセリンに変化しており、この変異を持つ酵母株は温度感受性を示し、VP16, TAND1 に対する転写活性化能を欠いていた。そこで、TAF61 のヒストンフォールド領域付近に変異を持つ *taf61* 変異体及び変異株を数種類作成して、 $\Delta$ TAND と合成致死と転写活性化能を検討した。その結果、 $\Delta$ TAND と合成致死を示す *taf61* 変異は転写活性化能を欠損しており、ヒストンフォールド領域で結合する ADA1 や TAF48 との結合能も低下していた。このことは、これらの *taf61* 変異が TFIID, SAGA 複合体の両者に影響を与えている可能性も示唆している。

以上のように、本論文は真核細胞の転写開始調節機構の最も重要な局面を解明したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない、よって審査員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。