

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                  |     |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-------------|
| 所 属<br>(主指導教官)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 川市 正史                            |     |             |
| 氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 小谷 公泰                            | 提 出 | 平成13年 1月 9日 |
| 題 目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | TFIIDサブユニット中に存在するTBP機能阻害活性に関する研究 |     |             |
| <p>要旨</p> <p>TFIIDはTBPと約10個のTAFsからなる複合体である。なかでも最大サブユニットであるショウジョウバエのTAF<sub>II</sub>230(dTAF<sub>II</sub>230)とその出芽酵母における相同遺伝子TAF<sub>II</sub>145 (yTAF<sub>II</sub>145) はN末端に、TBPの機能阻害活性が存在する。このN端領域 (TAF N-terminal domain,以後TANDと呼ぶ) はTBPと直接結合し、TBPのプロモーターへの結合並びに基本レベルの転写反応を阻害する。以前の研究からyTAF<sub>II</sub>145の活性領域は約30個のアミノ酸からなるサブドメイン構造が2個、ヒンジを介して結合した構造を取っていると推測された。これらのサブドメインのうち、N端側のものをyTANDI、C端側のものをyTANDIIと名付けた。dTAF<sub>II</sub>230の活性領域について調べた結果、yTANDI、yTANDIIと一次構造上相同性は認められず、さらに二つのドメインにも分けられなかった。しかしながら、dTAF<sub>II</sub>230活性化領域のさらにC末端側にyTANDIIと非常に相同性の高い領域が見つかった。そこでdTAF<sub>II</sub>230の活性化領域をdTANDI、yTANDIIと高い相同性の認められる部位を含む領域をdTANDIIと便宜上名付けた。yTANDIIが結合するTBP上のポジティブチャージクラスターには基本転写因子TFIIAも相互作用する。さらにTFIIAはTFIIDと複合体を形成しアクチベーターの転写制御情報を受容することからTBP機能阻害活性を持つTANDは転写制御に重要な役割を果たしていると推測した。</p> <p>そこで本研究では、dTANDIIがyTANDIIと同様の機能を持っているかどうか、またどのアミノ酸がTBPとの相互作用に必要であるかを<i>in vitro</i>で調べた。さらに酵母のTANDを欠損させた株は37℃での生育が低下することから、変異型のTANDを用い生育速度の回復を指標に<i>in vivo</i>における機能を検討した。</p> <p>TANDがTFIIAと同じTBP上の領域と相互作用することが転写において重要な機能を担っているならば、dTAF<sub>II</sub>230にも同じ機能が存在する可能性がある。実験の結果、TANDのTBP機能阻害活性は<i>in vitro</i>の結果が<i>in vivo</i>にも反映されており、この機能は生理学的に重要であることが確かめられた。</p> <p>次に、TANDIに関する研究を行った。単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子であるVP16が、本研究で扱ってきたN端のTANDIとTBPの結合する領域を共有する可能生が示唆された。また、GAL4のDNA結合領域とVP16の転写活性化領域をもつGAL4-VP16は、GAL4部位に結合しながらVP16特有の強い転写活性を示すことが知られている。これらの知見をもとに、酸性転写活性化領域をyTANDIと置き換えた。興味深いことに、酸性転写活性化領域はyTANDIとして機能しうることが示された。</p> |                                  |     |             |

さらに、TANDをGAL4のDNA結合領域と融合させ、レポーター遺伝子の発現を指標にTANDの転写活性化能の有無を調べた。その結果、TANDIは転写活性を有していた。yTANDI、yTANDIIとTBPの相互作用様式モデルと酸性転写活性化領域、yTANDI 2つの因子の互換性から、転写活性化に関する仮説を立てた。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 小 谷 公 泰

本論文は、ショウジョウバエのTAF $\Pi$ 230(dTAF $\Pi$ 230)とその出芽酵母における相同遺伝子TAF $\Pi$ 145 (yTAF $\Pi$ 145) のN端領域 (TAND, TAF N-terminal domain) の活性と機能を詳細に解析したものである。

TANDはTBPと直接結合し、TBPのプロモーターへの結合並びに基本レベルの転写反応を阻害する活性を持つ。 yTAF $\Pi$ 145のTAND領域は約30個のアミノ酸からなるサブドメイン構造が2個、ヒンジを介して結合した構造を取っている。 これらのサブドメインのうち、N端側のものはyTANDI、C端側のものはyTANDIIと名付けられている。dTAF $\Pi$ 230のTAND活性領域はyTANDI、yTANDIIとは一次構造上相同性を示さない。しかしながら、申請者はdTAF $\Pi$ 230活性化領域のさらにC末端側にyTANDIIと非常に相同性の高い領域を見つけ、dTAF $\Pi$ 230の活性化領域をdTANDI、yTANDIIと高い相同性の認められる領域をdTANDIIと名付けた。 TBP機能阻害活性を持つTANDの転写制御における役割を明らかにするため、dTANDIIがyTANDIIと同様の機能を持っているか、またどのアミノ酸がTBPとの相互作用に必要であるかを様々な変異型のTANDを用いて、まず*in vitro*で検討した。 さらに酵母のTANDを欠損させた株は37℃での生育が低下することから、変異型のTANDを用い生育速度の回復を指標に*in vivo*における機能を検討した。 この結果、本論文では、TANDのTBP機能阻害活性は*in vitro*の結果が*in vivo*にも反映されており、この機能は生理学的に重要であることを明らかにしている。

さらに、本論文ではTANDIの解析を行っている。 単純ヘルペスウィルスの転写活性化因子であるVP16が、N端のTANDIとTBPの結合する領域を共有する可能生が示唆されており、また、GAL4のDNA結合領域とVP16の転写活性化領域を融合したGAL4-VP16は、GAL4部位に結合しながらVP16特有の強い転写活性を示すことが知られている。

これらの知見をもとに、申請者は、酸性転写活性化領域をyTANDIと置き換えた結果、酸性転写活性化領域はyTANDIとして機能しうることを発見した。 さらに、TANDをGAL4のDNA結合領域と融合させ、レポーター遺伝子の発現を指標にTANDの転写活性化能の有無を調べた。 その結果、本論文において、申請者はTANDIが転写活性を有していることを明らかにし、yTANDI、yTANDIIとTBPの相互作用様式モデルと酸性転写活性化領域、yTANDI 2つの因子の互換性から、転写活性化に関する極めて独創的な仮説をうち立てることに成功している。

以上のように、本論文は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。 よって審査委員一同は、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。