

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                              |     |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----|-----------|
| 所 属<br>(主指導教官)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 動物遺伝子機能学講座 (川市 正史 教授)        |     |           |
| 氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 月橋 美博                        | 提 出 | 平成13年1月9日 |
| 題 目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 温度感受性を示す変異型TAF145遺伝子の作製とその性質 |     |           |
| <p>要旨</p> <p>私は転写開始・転写調節の分子機構を明らかにするため、出芽酵母の基本転写因子TFIIDのサブユニットであるTAF145に注目して以下の解析をおこなった。<i>In vitro</i>解析の結果からこれまでTAFはすべてのRNAポリメラーゼII依存的な遺伝子の転写活性化に必須であると考えられていたが、近年<i>in vivo</i>解析からTAFは転写活性化には必須でないことが相次いで報告され、転写活性化におけるTAFの必要性については疑問が生じていた。そこで私は出芽酵母において転写活性化時のTAF145の機能を解析するべくTAF145機能欠損株の作製をおこなった。ヒト、ショウジョウバエそして分裂酵母において共通に保存されているTAF145遺伝子の中央領域(535-817a.a.)に対してエラープローンPCR法によりランダムに変異を導入し、温度感受性を指標にしてTAF145変異株の単離とアミノ酸置換の同定をおこなった。1144個のクローンに対してスクリーニングをおこなった結果、97クロンの温度感受性株を単離し、フラグメント置換とサイトダイレクトミュータージェネシス法により最終的に9種類の点変異を同定した。単離したTAF145変異株について各種培地における表現型を検討した結果、いずれのTAF145変異株も浸透圧調節剤として働くグルシトールを1M添加した培地上において部分的ではあるが温度感受性の生育が回復することが明らかとなった。またSDSやカリコフルオルホワイト等の薬剤に対する感受性も観察されたことから今回単離したTAF145変異株はいずれも細胞壁に異常が生じていることが示唆された。中でも顕著な温度感受性と細胞壁異常が観察されたN568Δ, T657Kの二株に対しその性質について詳細な解析をおこなった。</p> <p>まず作製したTAF145抗体を用いてwestern blottingをおこなった結果、制限温度である37℃にシフトして2時間経過した後も変異型TAF145タンパク質は安定して発現しており、TFIIDのintegrityについても正常であった。次にこのタイムポイントにおいて代表的な遺伝子の発現量変化をnorthern blotting法により検討した結果、TUB2, RPS5遺伝子等の発現量は減少するが、CLN2, ADH1, PGK1遺伝子等の</p> |                              |     |           |

発現量は減少しないことが明らかになった。このようにプロモーター特異的にTAF145依存性が生じる原因としてプロモーター領域内にTAF145依存性を付与するDNAエレメントが存在することが考えられた。そこで新規のmini-CLN2レポーターシステムを構築し、N568Δ, T657K変異株においてTAF145依存性を付与する領域のmappingを試みた。その結果TUB2プロモーターにおいてTAF145依存性を付与する領域はUASではなく、コアプロモーター中に存在することが示唆された。さらにTUB2プロモーターにコンセンサスなTATAエレメントを挿入することによりTAF145依存性は回復することが明らかになった。逆にTAF145依存性を示さないCLN2, CYC1コアプロモーターからコンセンサスなTATAエレメントを欠損させることでTAF145依存性が観察されたことから、N568Δ, T657K変異株においてコアプロモーターの認識はTATAエレメントに依存しており、従ってTAF145はイニシエーター近傍の配列の認識に重要な役割を果たすことが示唆された。ところがTUB2プロモーターと同様にTAF145依存性を示すRPS5プロモーターの場合、コンセンサスなTATAエレメントの挿入によるTAF145依存性の回復は観察されなかったことから、RPS5プロモーターをRPS5 UAS領域とRPS5コアプロモーター領域に区別してRPS5プロモーターにおけるTAF145依存性を検討した。その結果コンセンサスなTATAエレメントの挿入によりRPS5コアプロモーターの基本レベルの転写はTUB2コアプロモーターと同様に回復するが、RPS5 UASによる転写活性化は回復できないことが明らかになった。UASに特異性が存在するか否かを検討するためRAP1, VP16, EBNA2等のアクチベーターによるRPS5コアプロモーターの転写活性化を検討した。RPS5 UASとは異なりいずれもRPS5コアプロモーターを転写活性化できることが明らかになった。またRPS5 UASはCYC1コアプロモーターを活性化できたことから、N568Δ, T657K変異株におけるRPS5遺伝子の転写活性化異常はRPS5 UASとRPS5コアプロモーターの組み合わせにより引き起こされることが明らかになった。

今回単離したTAF145変異株を用いることにより基本レベルの転写と転写活性化のイベントを区別することが可能になり、それぞれを詳細に解析することが可能になった。今回の解析からTAF145は*in vivo*においてもコアプロモーター認識とともにUASによる転写活性化にも必要であることが明らかになり、加えてアクチベーターによる転写活性化機構にはコアプロモーターごとに様々な機構や経路が存在することが明らかになった。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 月 橋 美 博

本論文は、出芽酵母の基本転写因子TFIIDのサブユニットであるTAF145の詳細な解析をおこなったものである。申請者は、出芽酵母において転写活性化時のTAF145の機能を解析すべく、ヒト、ショウジョウバエそして分裂酵母において共通に保存されているTAF145遺伝子の中央領域にランダムに変異を導入し、温度感受性を指標にしてTAF145変異株の単離とアミノ酸置換の同定をおこなった。この結果、申請者は最終的に9種類の点変異を同定するとともに、これらのTAF145変異株はいずれも細胞壁に異常が生じていることを明らかにした。中でも顕著な温度感受性と細胞壁異常が観察されたN568Δ, T657Kの二株についてさらに詳細な解析をおこなっている。

まず、申請者は、制限温度である37℃にシフトして、代表的な遺伝子の発現量変化を検討したところ、TUB2, RPS5遺伝子等の発現量は減少するが、CLN2, ADH1, PGK1遺伝子等の発現量は減少しないことを発見した。このようにプロモーター特異的にTAF145依存性が生じる原因を解明するため、新規のmini-CLN2レポーターシステムを構築し、N568Δ, T657K変異株においてTAF145依存性を付与する領域の同定を試みた。その結果TUB2プロモーターにおいては、TAF145依存性を付与する領域はコアプロモーターであり、TATAエレメントを挿入することによりTAF145依存性が回復することを明らかにした。一方、TAF145依存性を示さないCLN2, CYC1コアプロモーターからTATAエレメントを欠損させればTAF145依存性が観察されたことから、N568Δ, T657K変異株においてコアプロモーターの認識はTATAエレメントに依存しており、TAF145はイニシエーター近傍の配列の認識に重要な役割を果たすことを明らかにした。RPS5プロモーターの場合、TATAエレメントの挿入によりRPS5コアプロモーターの基本レベルの転写はTUB2コアプロモーターと同様に回復するが、RPS5 UASによる転写活性化は回復できなかった。さらに、RPS5遺伝子の転写活性化異常がRPS5 UASとRPS5コアプロモーターの組み合わせにより引き起こされることを明らかにしている。

以上の結果から、本論文では、単離されたTAF145変異株を用いることにより基本レベルの転写と転写活性化のイベントを区別し、それぞれを詳細に解析することが可能であることを示した。また、TAF145はin vivoにおいてもコアプロモーター認識とともにUASによる転写活性化にも必要であることが明らかになり、加えてアクチベーターによる転写活性化機構にはコアプロモーターごとに様々な機構や経路が存在することを明らかにしている。

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。