

TATA box結合因子TFIIDの  
構造活性相関の解析

山 本 融

①

TATA box結合因子TFIIDの

構造活性相関の解析

山 本 融

# 目 次

	page
序 論 - 1989年以前	1
本 論	
1 章 T F II Dの活性に必要な領域の決定	
§ 1. 出芽酵母T F II Dの一次構造	9
§ 2. N末、C末欠失変異体の作製と解析	15
§ 3. 内部欠失変異体の作製と解析	26
§ 4. <i>in vivo</i> での機能に必要な領域の同定	32
§ 5. T F II Dはモノマーとして TATA box と結合する	38
§ 6. 結論と考察	42
2 章 direct repeatとbasic repeat region	
- T F II Dの特徴的な構造の解析	
§ 1. 戦略	47
§ 2. 点変異体の作製と解析	50
§ 3. basic repeat regionへの挿入・欠失変異の導入と解析	60
§ 4. 結論と考察	64
総括と展望 - 1989年以降	68
材料と方法	79
参考文献	92
謝 辞	98

・・・いや、証明するのにいるんだ。

ぼくらから見ると、ここは厚い立派な地層でね。120万年前にできたという証拠もいろいろあがるのだけれど、ぼくらとちがったやつからみてもやっぱりこんな地層に見えるかどうか。あるいは、風か、水か、がらんとした空かに見えるやしないか、と言うことなんだ・・・

(宮沢賢治 「銀河鉄道の夜」より)

生命とは何か・・・忌まわしい知恵の実を食まされ、死すべき身として楽園を追放されてこのかた、人類は飽くなき貪欲さでその答えを求め続けてきた。神学的、哲学的、形而上学的、隠秘学的な答えは時を経て徒ろい、いまだ漠としてその姿をつかめない。しかし、これを宇宙の創生以来たゆまず進化を続けてきた物質の（水素は大爆発後最初に生まれた原子であり、炭素・窒素・酸素はその後数百万年を経て誕生した超巨星内で育まれたものである）究極のそして必然のかたちとして理解するとき、凡百の徒たる自分にも、その百億年を超える歴史の一端に手を触れることが可能となる。

生命をこのように物質的側面から捉えてみると、これを、他の物

質の侵襲から守るべき自己をもった利己的なシステムとして理解することができよう。このシステムの利己的たる所以は、自己を他の物質の侵襲から守るのみならず、これを利用・同化し、新たに自己を貪欲に複製する点にある。そして、この利己的な欲求を満足させながらシステムが生きながらえていくためには、転変極まりない外界の状況に応じて、自己に蓄えられた情報を適切に用いてこれに対処していくことが必須となる。生命とその維持において根本をなしているこのプロセスを、我々は遺伝情報の発現と制御とよんでいる。そして、この機構において中心的な役割を担っているのが転写反応である。したがって、転写反応とその制御の分子機構を詳細に理解することは、生命と、そしてこれがいかに形作られ、維持されているかを理解していくうえで避けて通ることはできない重要な問題である。

我々人類を筆頭とする真核生物の転写反応とその制御がどのようなにおこなわれているかについての研究は、1969年のRNAポリメラーゼ I, II, III の発見に始まり、現在まで日進月歩で進んできている。その結果、RNAポリメラーゼ II が関与する構造遺伝子の転写反応とその制御は、概念的には図 1 に示すように大きく分けて 2 種類の転写因子によりおこなわれていることが明らかとなっている。1 つは個々の遺伝子の発現を制御する転写制御因子であり、もう 1 つはすべての遺伝子の転写に必須な基本的転写因子である。転写制御因子のほとんどは塩基配列特異的 DNA 結合タンパクであり、遺

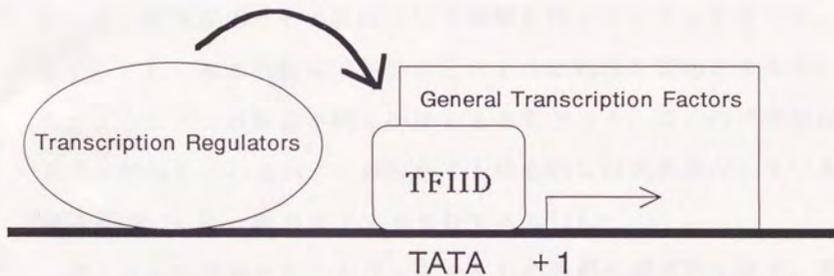


図 1 真核生物における転写反応とその制御

概念的に示す。転写反応とその制御は基本的転写因子 (general transcription factors) によっておこなわれる転写反応の活性を転写制御因子 (transcriptional regulators) が何らかの相互作用を通して調節することにより制御されていると考えることができる。TFIIDはこれらの過程において中心的な役割を果たしている。

伝子の制御領域にある数～十数bpよりなる特定の塩基配列を認識して結合し、その支配下にある遺伝子の転写制御をおこなう因子である。これに対して、基本的転写因子は、プロモーター認識から転写開始複合体形成に至る転写開始反応と、ここからRNA合成に至る転写伸長反応とにかかわる因子群であり、基本的にはこれらのみで転写反応のすべてを進行させることができる。そして転写制御は、転写制御因子がこれら基本的転写因子に働きかけて、その活性を修飾することによりおこなわれていると理解することができる。したがって、転写反応とその制御の分子機構を明らかにするためには、まず、これら基本的転写因子群がどのように転写を開始させるか、そのメカニズムの詳細を明らかにする必要がある。ここには複数の因子が関与しているが、このなかでも中心的な役割を果たしている因子が TATA box 結合因子 T F II D である(1)。

図2に転写開始反応における T F II D の役割を模式的に示す。真核生物のRNAポリメラーゼIIにより転写がおこなわれるほとんどの遺伝子のプロモーター領域には T A T A<sup>T</sup>/A<sup>T</sup>/A<sup>T</sup> という共通配列をもった TATA box が転写開始位置の約25塩基上流に存在し、転写開始点と、基本的転写活性の決定に重要な役割を果たしている(2)。T F II D は、この TATA box に結合する基本的転写因子である(3)。転写開始反応において、T F II D は他の転写開始因子に先立ってプロモーターDNAの TATA box にそれ自身のみで結合し(4)、template committed complex を形成する。template commitment とは、

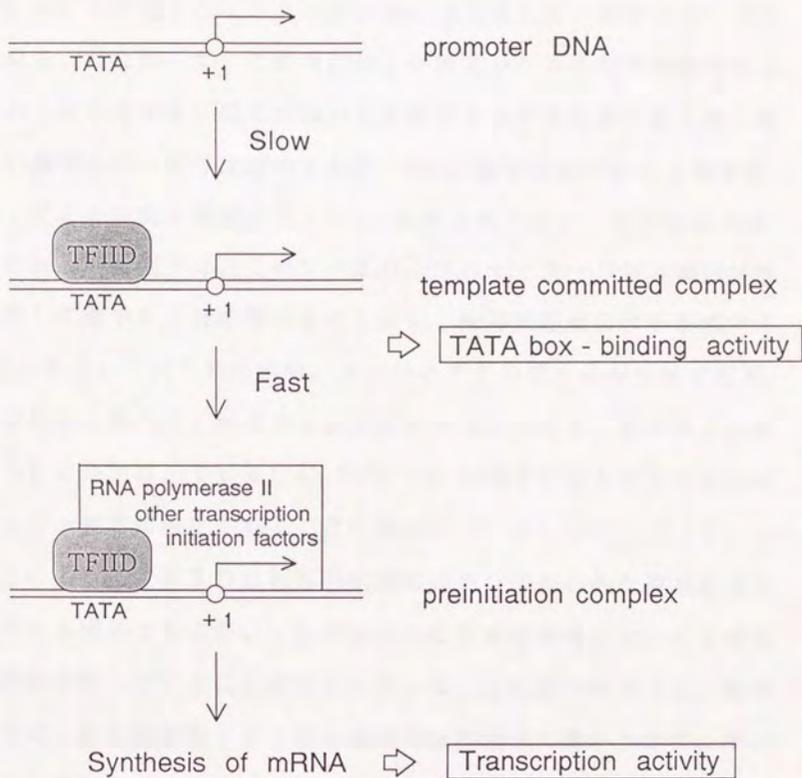


図 2 転写開始反応における T F I I D の役割

概念的に示す。T F I I D は他の転写開始因子に先立って、単独で TATAbox を認識し結合する。この複合体が形成された後、転写開始因子群の速やかな分子集合により転写開始複合体が構築される。

鋳型であるプロモーターDNAが転写に対して活性化され、もとの不活性な状態には容易に戻らないことをいい、分子論的には一旦 TATA box に結合したTFIIDが容易には解離しない現象として理解される。したがって、この後に新しい鋳型DNAを加えて転写反応をおこなわせても、既にcommitした鋳型からのみ転写がおこり、新しい鋳型からの転写は認められない(5)。転写開始反応の全過程を通してこの段階が律速である(6)。RNAポリメラーゼIIをはじめ他の転写開始因子は、このTFIID-プロモーターDNA複合体を認識して速やかに分子集合をおこない、転写開始複合体を形成する(7)。そうしてATPの水解、ヌクレオチドの取り込みを経て転写伸長反応に移行し、mRNAが合成される。つまり、転写反応が始まるかどうかは、TFIIDがTATA box に結合するかどうかということで一義的に決定されることになる。

このようにTFIIDは転写開始反応において中心的な役割を果たしている因子であるが、これに加えて転写制御機構においても重要な役割を担っていることが示されている。先に述べたように、転写制御は、転写制御因子がこれら基本的転写因子に働きかけて、その活性を修飾することによりおこなわれていると理解できる現象であるが、このときTFIIDが少なくともある種の転写制御因子の標的となっていることを示す知見が蓄積されている。そして、これらの結果から、転写制御因子は、TFIIDと相互作用することによってTFIIDの conformation を変化させ、そしてRNAポリメラーゼ

II や他の転写開始因子の分子集合を促進させることで転写の活性化を導くというモデルが提唱されている(9, 10)。

以上述べてきたように T F II D は転写開始反応とその制御において中心的な役割を果たしている因子であり、また物理化学的にも会合・解離速度が遅く、効率的な結合には温度を要求する(1, 11, 38) など、一般の塩基配列特異的 D N A 結合因子には見られない特徴をもつ興味深い因子であるが、基本的転写因子の中でもっとも精製が困難であり(1)、また、80年代半ばからの塩基配列特異的 D N A 結合因子の研究の隆盛に押されるかたちで基本的転写因子についての研究全体がやや立ち遅れていたこともあって、10年にわたる努力にもかかわらず、近年までその分子としての実体は明らかになっていなかった。これら基本的転写因子についての研究は主にヒト子宮頸部癌由来の培養細胞である HeLa 細胞の核抽出液を用いておこなわれているが、88年になって、出芽酵母の核抽出液の中に T F II D 活性を相補することができる画分が存在することが明らかにされた(11, 17)。これが突破口となり、89年に他の基本的転写因子に先駆けて出芽酵母より T F II D が完全に精製され(4)、ついでその遺伝子がクローニングされて(12, 18, 37)、ようやく転写開始反応における T F II D の機能についてこれを分子レベルで明らかにしていくための手掛かりが現れた。そこでまず、わたしは、これまで述べてきたような T F II D の独特で特徴的な機能がどのような構造に基づくものなのかを明らかにするために、その構造活性相関の解析をおこなう

こととした。そして、他の基本的転写因子が、TFII Dに比べればその精製と解析ははるかに進んでいたはずであったにもかかわらず、この時点ではクローニングはおろか精製すら完了していなかったために、分子レベルでの解析が不可能であった問題、すなわち、転写開始反応においてTFII Dがどういった因子とどのような相互作用をすることによって転写開始複合体の形成を導くのか、といったことも興味深い問題を将来掘り下げていく上で役立つ知見を得ようと試みた。TFII Dは、図2に示すように、基本的には、プロモーターのTATA boxを認識してこれに結合する活性（TATA box結合活性）と、その後、他の基本的転写因子の分子集合を形成させて転写をおこなわせる活性（基本的転写活性）との2つの活性を示す。そこで、これらの活性がTFII D分子のどのような構造に担われているのかを明らかにすることを本研究の目的とし、以下の実験をおこなった。

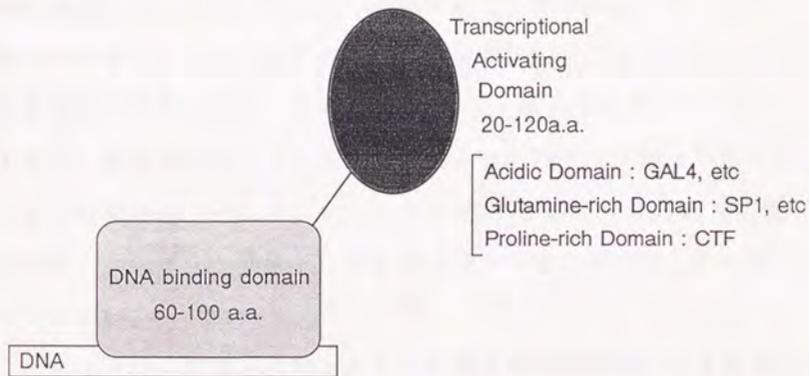
## 本 論

### 1 章 T F II D の活性に必要な領域の決定

#### § 1. 出芽酵母 T F II D の一次構造

T F II D は、序論で述べたように、ユニークで特徴的な機能と性質をもっているが、それでもなお表面的には、TATA box という特定の塩基配列を認識して D N A に結合し転写反応をうながすという点で、転写の制御にかかわる塩基配列特異的 D N A 結合因子との機能的類似性を指摘することができる。このような塩基配列特異的 D N A 結合因子については、これまでに 100 を超える遺伝子がクローニングされ (39, 40)、その構造活性相関の解析が精力的におこなわれている。その結果、これら塩基配列特異的に D N A に結合する転写制御因子は、概念的には図 3 の a に示すように、D N A 結合領域と、これとは別個に存在する、転写の活性化に必要な領域により構成されていることが明らかとなってきた。そして、これらの領域は、これからおこなうような欠失変異体を用いた実験により、D N A 結合領域については 60 から 100 アミノ酸に (13)、転写活性化領域については 20 から 120 アミノ酸程度といった (14, 15)、いずれも比較的小さな範囲に容易に限局できることがわかっている。また、これらには、一群の因子において共通に見られるモチーフが存在する (13)。

# 1. Schematic Structure of Sequence Specific Transcription Factors



- Zn finger : TFIIIA, SP1, CTF, steroid hormone receptors, etc
- basic - Leucine repeat : FOS, JUN, C/EBP, etc
- Homeodomain : FTZ, OTF2, etc
- basic-Helix-Loop-Helix : MyoD, E12, etc

## 2. Structure of GAL4

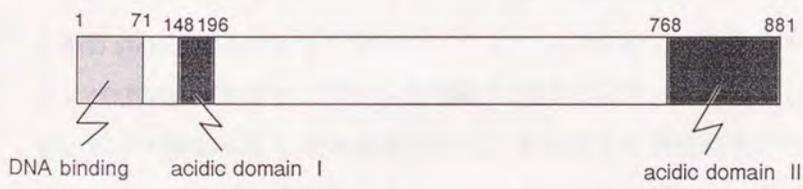


図 3 塩基配列特異的DNA結合因子の構造

1. 転写制御因子のほとんどを占める塩基配列特異的DNA結合因子は比較的小さな、そして互いに分離可能な機能ドメインにより構成されている。よく知られたモチーフとそれをもつ因子の一例を示す。
2. 典型的な例として出芽酵母のガラクトース代謝にかかわる転写制御因子であるGAL4の構造を示す。881アミノ酸よりなる全体のうち、ここで示したDNA結合領域と転写活性化領域だけで機能的には十分である。

図3のaに多くの転写制御因子において報告されているモチーフとこれをもつ転写制御因子の一例をあげる。このような転写制御因子の代表的な例として、最もよく解析がおこなわれたものの一つで、酵母のガラクトース代謝にかかわる転写制御因子であるGAL4の構造を図3のbに示す。全体では881アミノ酸よりなるタンパクであるが、機能的には、Znフィンガーを含む71アミノ酸よりなるDNA結合領域と、それぞれ49および110アミノ酸よりなる転写活性化領域、アシデックドメインのみで十分であることが明らかになっている(16)。

このように、転写の制御にかかわる塩基配列特異的DNA結合因子については数多くの構造活性相関の解析がおこなわれ、その一般的な構造的特徴や、DNAとの結合および転写の活性化にかかわる領域の構造のいくつかが明らかになってきている。そこでまず、TATA box という特定の塩基配列を認識して結合し、転写反応を引き起こす因子であるTFIIDの一次構造の中に、これまでに知られているようなDNA結合モチーフや、転写活性化領域にみられたような構造が存在するかをまず調べた。クローニングによって明らかとなった出芽酵母のTFIIDの一次構造を図4に示す。しかし、240個のアミノ酸からなるその分子内には、そのような構造は見いだされず、また、顕著な相同性を示す既知のタンパクも認められなかった(12, 18, 37, 41)。ところが、この一次構造を精査しているうちに、従来知られていたような転写制御因子では報告されていない、3つ

TAC TAA TGA CTT TTT TTA CCT TGA TAG GTA TTC TTG ATG GTA AGA GTA AAC AAG GGA CGT

-150

GAA AAT TAC AGT AGT TAC TGT TTT TTT TGG ACT ATA AGA TCG GGG GAA AGA TAA CAC ATA

-100

AGA AAT AAA ACG ACT ACT AGT TAG ACT GCT CTG CCG AAG AAG CAA GGA AGT AAA GGC TGC

-50

ATT TTA TTT TTC TTT TCT AGT CCA ACA TAA ACA GGT GTA TCA AGA GAA ACT TTT TTA ATT

TAA  
OCH

50

ATG GCC GAT GAG GAA CGT TTA AAG GAG TTT AAA GAG GCA AAC AAG ATA GTG TTT GAT CCA  
M A D E E R L K E F K E A M K I V F D P 20

100

AAT ACC AGA CAA GTA TGG GAA AAC CAG AAT CGA GAT GGT ACA AAA CCA GCA ACT ACT TTC  
M T R Q V W E N Q M R D G T K P A T T F 40

150

CAG AGT GAA GAG GAC ATA AAA AGA GCT GCC CCA GAA TCT GAA AAA GAC ACC TCC GCC ACA  
Q S E E D I K R A A P E S E K D T S A T 60

200

TCA GGT ATT GTT CCA ACA CTA CAA AAC ATT GTG GCA ACT GTG ACT TTG GGG TGC AGG TTA  
S G I V P T L Q M I V A T V T L G C R L 80

250

GAT CTG AAA ACA GTT GCG CTA CAT GCC CGT AAT GCA GAA TAT AAC CCC AAG CGT TTT GCT  
D L K T V A L H A R M A E Y N P K R F A 100

350

GCT GTC ATC ATG CGT ATT AGA GAG CCA AAA ACT ACA GCT TTA ATT TTT GCC TCA GGG AAA  
A V I M R I R E P K T T A L I F A S G K 120

400

ATG GTT GTT ACC GGT GCA AAA AGT GAG GAT GAC TCA AAG CTG GCC AGT AGA AAA TAT GCA  
M Y Y T G A K S E D D S K L A S R K Y A 140

450

AGA ATT ATC CAA AAA ATC GGG TTT GCT GCT AAA TTC ACA GAC TTC AAA ATA CAA AAT ATT  
R I I Q K I G F A A K F T D F K I Q M I 160

500

GTC GGT TCG TGT GAC GTT AAA TTC CCT ATA CGT CTA GAA GGG TTA GCA TTC AGT CAT GGT  
V G S C D V K F P I R L E G L A F S H G 180

550

ACT TTC TCC TCC TAT GAG CCA GAA TTG TTT CCT GGT TTG ATC TAT AGA ATG GTG AAG CCG  
T F S S Y E P E L F P G L I Y R M V K P 200

650

AAA ATT GTG TTG TTA ATT TTT GTT TCA GGA AAG ATT GTT CTT ACT GGT GCA AAG CAA AGG  
K I V L L I F V S G K I V L T G A K Q R 220

700

GAA GAA ATT TAC CAA GCT TTT GAA GCT ATA TAC CCT GTG CTA AGT GAA TTT AGA AAA ATG  
E E I Y Q A F E A I Y P V L S E F R K M 240

750

TGA TGG GGA AGG AGT AGA CGA AAA GAA AAA AAG GTT TTC TAT TTG TTC CAT TTT CTC AAT  
OPA

800

TAT TAA TGG TCC TCA AAG AAA TAA AAG AAA AGG AAG AAG AAG TAA TTG TAA TAT CAA AGG

850

GTT TTT TAT AGT ATA TTC TTC TTA TTC TAT ATT TAT ATA TCA ATG TTT TAT AAT AAG ATG 900

图 4 出芽酵母TFIID遗传子

の興味深い構造が見いだされた。すなわち、互いに約40%の相同性を示す、分子内direct repeat(18)、次に、塩基性アミノ酸に富み、これらが周期的に配列しており、また計算上は $\alpha$  helixをとるpotentialが高く、このときに塩基性アミノ酸がhelixの片側に集まるといった構造をもつbasic repeat region(12)、そして、原核生物においてプロモーター認識に必要であるシグマ因子と弱い相同性をもつsigma homology regionである(12)。図5にこれらの構造とその位置を示す。

しかし、これらの構造が機能的に意味のあるものなのか、また、その場合どのような機能を担っているのかについては、全く推測の域を出ることができない。そこでまず、TFIIDの2つの活性、すなわちTATA box結合活性、および転写活性に必要な領域を、系統的に作製した一連の欠失変異体を用いた解析により決定し、TFIIDの構造的特徴と、図5に示した興味深い構造の重要性を明らかにしようと考えた。もし、TFIIDが、従来知られている塩基配列特異的DNA結合因子に見られたのと同様の構造的特徴をもつものならば、TATA box結合活性と転写活性に必要な領域は、こうした解析によって、前述のような比較的小さな領域に、分離して限局できるものと考えられる。また、図5に示した興味深い構造が機能的に意味をもつものならば、こうして限局された領域に、これらの構造のうちに含まれるものがあるはずである。以下、その方法と結果について順に述べる。



## § 2. N末、C末欠失変異体の作製と解析

まず、TFIIDの2つの活性、すなわち、TATA box に結合する活性と基本的転写活性に必要な領域を大まかに決定するために、一連のN末およびC末欠失変異体を作製した。変異体の構造を図6に示す。その方法を以下に簡単に述べる。まず、部位特異的なオリゴDNAを用いた方法で変異体遺伝子を作製した。概略を図7に示す(19)。野生型TFIID遺伝子を含んだ単鎖DNAを、DNA中にウラシルを取り込むようになった変異株(BW313. etc)を用いて調製した(図7-1)。このとき、TFIID遺伝子は、その翻訳開始部位(ATATG)を、後述する方法(T7 expression system)による大腸菌での組み換え体産生に用いるプラスミドベクターにそのまま導入できるように、あらかじめ制限酵素NdeIによって切断できるよう(CATATG)変異させておいたものを用いた。なお、この変異は次に述べる変異体タンパクの産生量に影響を与えなかった。次に、求める変異を導入できるようにデザインしたオリゴDNAを、この単鎖DNAにアニールさせる(図7-2)。そして、アニールしたオリゴDNAをプライマーとして相補鎖を合成させれば、合成されたDNAには望んだ変異が導入されていることになる(図7-3)。ついで、オリジナルの単鎖DNAを除去すれば求める変異体遺伝子を得ることができる(図7-4)。一般にこのようにして我々はDNAを自由自在に操ることができる。次に、変異体タンパクをin vitro transcrip-

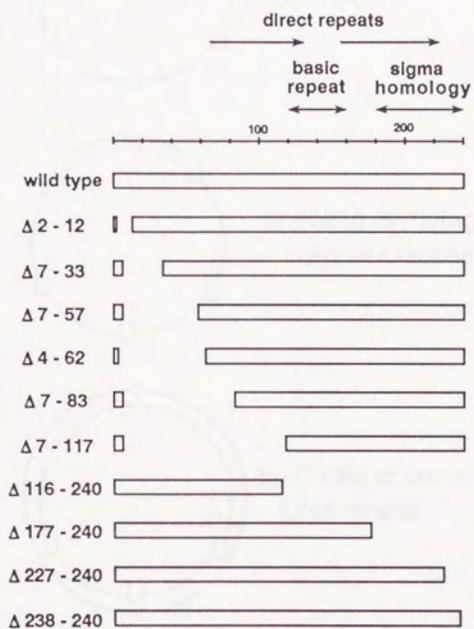


図 6 作製したN末、C末欠失変異体の構造

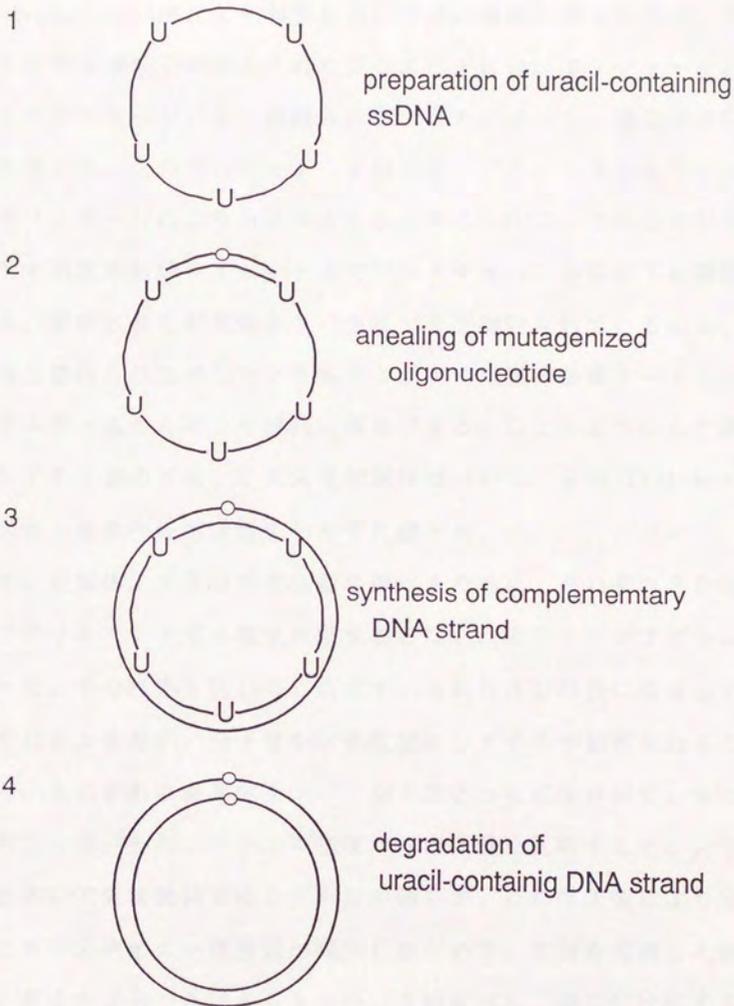


図 7 部位特異的オリゴDNAをもちいた変異体DNAの作製法

ウラシルを含んだDNAは、通常の大腸菌内では速やかに分解される。

tion-translation法により調製した。方法の概略を図8に示す。作製した変異体遺伝子の導入されたプラスミドには、T7ファージのRNAポリメラーゼにより認識されるプロモーターが、遺伝子の5'側に存在する。このプロモーターを用いて、プラスミドからT7 RNAポリメラーゼによりmRNAを合成する。次に、このmRNAをウサギ網状赤血球ライゼート中で $^{35}\text{S}$ メチオニンの存在下に翻訳させる。翻訳された変異体タンパクは $^{35}\text{S}$ で標識されているので、その産生量はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後オートラジオグラムをとることにより容易に確認できる。以上のようにして調製したTFIIDのN末、C末欠失変異体について、そのTATA box結合活性と基本的転写活性をそれぞれ調べた。

まず、変異体TFIIDの産生量を調べるために、それぞれSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、オートラジオグラムをとった。その結果を図10のcに示す。mRNAの存在に依存してそれぞれおよそ相応の分子量を示す位置にシグナルが観察されることから、それぞれの変異体タンパクが予定どおり産生されていることがわかった。またシグナルの強度から産生量を比較すると、分子量の小さい欠失変異体ではシグナルが弱い、これは欠失により分子あたりのメチオニン残基数が減少したため、これを考慮に入れると、多少のばらつきはあるものの(2倍以内)、相互に比較することが可能な量の変異体がそれぞれ産生されていることがわかった。

そこで、次に、これら変異体TFIIDのTATA box結合活性をゲ

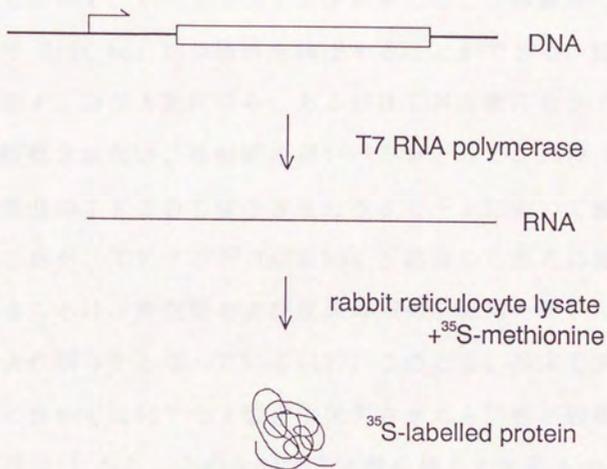


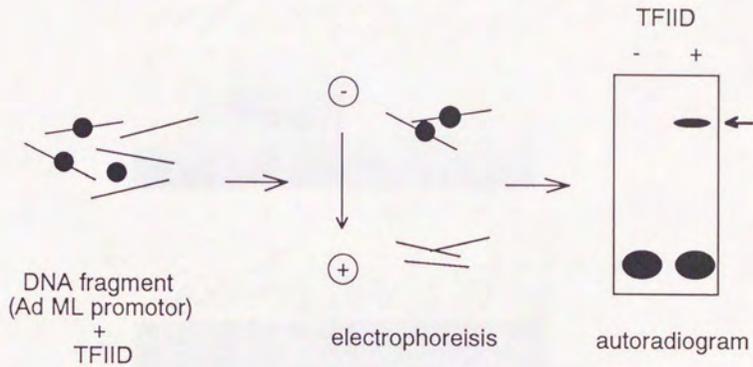
図 8 *in vitro* transcription-translation法によるタンパクの調製法

ルシフト法により調べた。その方法の概略を図9のaに示す。変異体TFIIDを産生させたライゼートと、アデノウイルス2型主要後期遺伝子のTATA boxを含むプロモーター部分184bpのDNA断片とを反応させ、その後電気泳動にかける。このとき、変異体TFIIDがTATA boxと安定な複合体を形成していれば、それは移動度の遅れとして観察することができる。したがって、DNA断片を $^{32}\text{P}$ で標識しておいて、オートラジオグラムをとると、移動度の遅いバンドとしてTATA box結合活性を検出することができる。結果を図10のaに示す。DNA断片のみ、あるいはDNA断片とライゼートのみでは観察されない、移動度の遅いバンドとして、TATA box結合活性が野生型のTFIIDを産生させたライゼートにおいて観察される(12)。これが、TFIIDがTATA boxと結合したために見られるものであることは、野生型および変異体TATA配列を用いた競合阻害実験により明らかとなっている(12)。このとき、N末を欠失させた変異体においては62アミノ酸まで欠失させても活性が観察された(lane4-7)。しかし、この先83アミノ酸を越えて欠失させると活性が認められなくなることがわかった(lane8)。そして、C末を欠失させた変異体においてはわずか3アミノ酸を欠失させただけのもの(lane13)を含め、そのすべてにおいて活性が失われていることがわかった(lane8-13)。これらのことから、TATA boxとの結合に必要な領域は63から240アミノ酸の中に存在することが示唆された。またこれら62アミノ酸までのN末欠失変異体においてはTATA

box 結合活性の明らかな増加が観察された (lane3と4-7を比較)。このことから、N末領域にはTFIIDのTATA box 結合活性を何らかの形で抑制する機能のあることが推測された。

次に、これら変異体タンパクの基本的転写活性を調べた。その方法の概略を図9のbに示す。アデノウイルス2型主要後期遺伝子を鋳型とし、これに熱処理によりTFIID活性を失わせたHeLa細胞の核抽出液と、変異体TFIIDを産生させたライゼートおよび反応基質とを加えて転写反応をおこなわせる。次に、転写産物であるRNAを抽出し、プライマー伸長法により、アデノウイルス2型主要後期遺伝子の正しい位置からの転写産物を検出する。プライマー伸長法を用いることにより、*in vitro* transcription-translation法により調製されたような少量の因子からの活性も、明確に検出することができる。結果を図10のbに示す。核抽出液(nuclear extract; NE)を用いて反応をおこなわせると、54bpの位置に正しい位置からの転写産物を観察することができる (lane1)。これに対して、この核抽出液を47°Cで15分間処理した核抽出液(heat-treated nuclear extract; HNE)では転写活性が失われてしまうことがわかる(1) (lane2)。しかし、この転写活性の喪失はTFIIDの失活によるもので、これにHeLa細胞から部分精製したTFIIDを加えると活性の回復が観察される(1) (lane3)。そして、網状赤血球ライゼート自身はこの転写活性にやや抑制的に働くものの(lane4)、野生型のTFIIDを産生させたライゼートは充分転写活性を相補すること

a. TATAbox - binding activity  
( Gel Shift assay )



b. Transcription activity

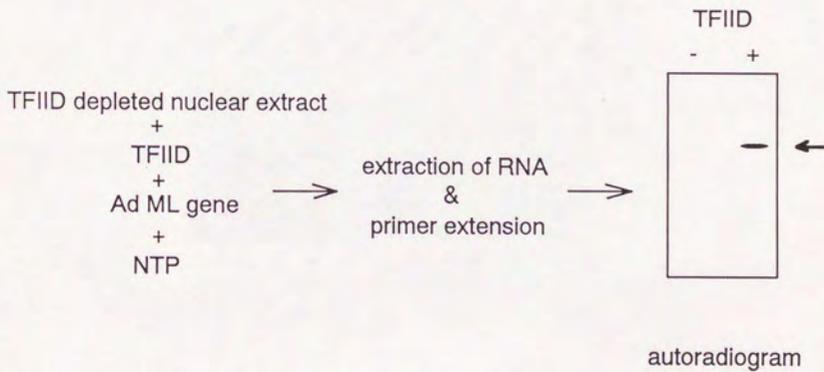


図 9 TATA box 結合活性と基本的転写活性の解析法

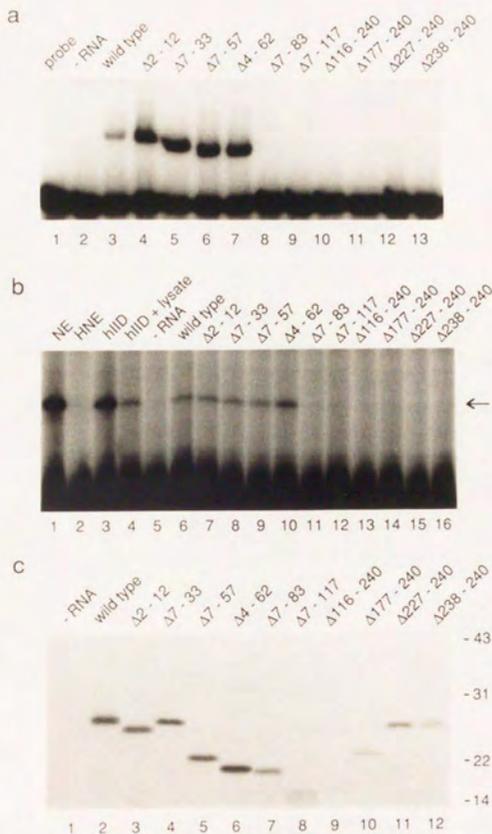


図 10 N末、C末欠失変異体のTATA box結合活性と基本的転写活性

- a. TATA box 結合活性
- b. 基本的転写活性
- c. SDS-PAGE による産生タンパクの解析

ができる (lane6)。この系を用いて変異体 T F II D の基本的転写活性を調べた。その結果、N 末を欠失させた変異体において、TATA box 結合活性と同じく 62 アミノ酸まで欠失させても活性が観察されることがわかった (lane7-10)。また、TATA box 結合活性の結果から予測されるように、この先 83 アミノ酸を越えて欠失させたものでは活性が認められず、また 3 アミノ酸を欠失させただけのものを含むすべての C 末欠失変異体において活性が失われていることがわかった (lane11-16)。これらのことから、基本的転写活性に必要な領域も 63 から 240 の約 180 アミノ酸の中に存在することが示唆された。ここで、転写活性においては TATA box 結合活性に見られたような活性の増加は観察されなかったが、これは解析手段の違いを反映しているものである可能性が考えられる。これについての詳しい議論は第 2 章の § 2 に改めておこなう。結果をまとめたものを図 11 に示す。

以上の結果から、T F II D の 2 つの活性、すなわち、TATA box 結合活性と基本的転写活性に必要な領域は、C 末の 63 から 240 までの約 180 アミノ酸の中に共に存在することが示唆された。また、N 末の約 60 アミノ酸は両活性に不必要であることが示された。

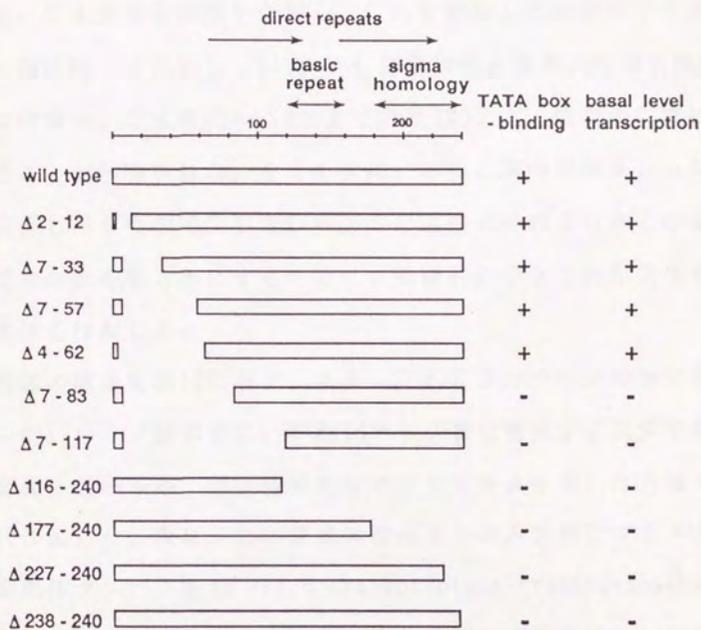


図 11 N末、C末欠失変異体の構造とTFIID活性

### § 3. 内部欠失変異体の作製と解析

N末、C末欠失変異体を作製し、これを解析した結果、TFIIDの2つの活性、すなわち、TATA box 結合活性と基本的転写活性に必要な領域は、C末の63から240までの約180アミノ酸の中に共に存在することが示唆された。そこで次に、このC末の領域をさらに詳細に解析し、その中でTFIIDの2つの活性にそれぞれこの領域が必要なかを明らかにするために、系統的に小さな内部欠失をもつ変異体を作製した。

変異体の構造を図12に示す。まず、TFIID分子の全領域にわたって、平均17アミノ酸おきに、平均16アミノ酸に相当する欠失を導入した変異体遺伝子を、部位特異的なオリゴDNAを用いた方法でそれぞれ作製した。次に、この変異体遺伝子の導入されたプラスミドから変異体タンパクをin vitro transcription-translation法により調製した。そして、これらTFIIDの内部欠失変異体について、それぞれ TATA box 結合活性と基本的転写活性を前項と同様に調べた。

まず、変異体TFIIDの産生量を調べるために、それぞれSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、オートラジオグラムをとった。その結果を図13のcに示す。シグナルの強度からそれぞれほぼ等量の変異体タンパクが産生されていることがわかった。

次に、これら変異体TFIIDの TATA box 結合活性をゲルシフト

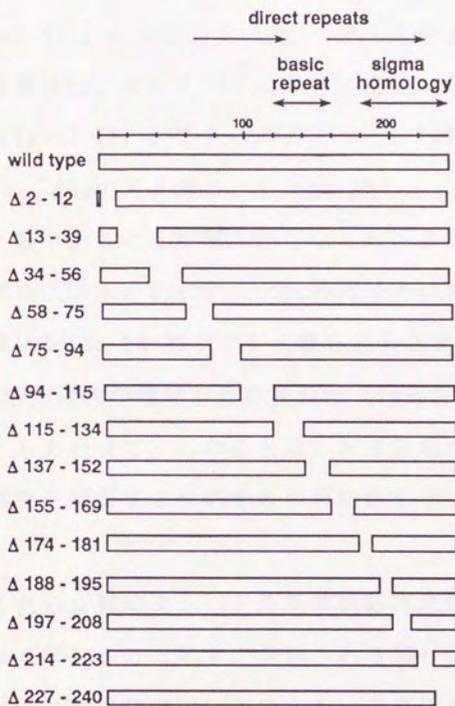


図 12 作製した内部欠失変異体の構造

法により調べた。結果を図13の a に示す。野生型、および前項の解析から活性に不必要であることが明らかとなったN末の約60アミノ酸の領域内に欠失をもつ変異体では、予想される通り活性が観察された (lane3-6)。しかし、C末約180アミノ酸よりなる領域内に欠失をもつ変異体は、そのすべてにおいて活性が失われていることがわかった (lane7-17)。これらのことから、TATA box との結合には、63-75から240アミノ酸の、C末約180アミノ酸よりなる領域のすべてが必要であることが明らかとなった。またN末欠失変異体においてと同様、N末の約60アミノ酸の領域内に欠失をもつ変異体において、特に2-12、13-39のアミノ酸を欠失させたものでは顕著に、TATA box 結合活性の増加が観察された (lane4-5と3を比較)。前項の結果ともあわせて、このことは、N末領域がTFIIDのTATA box 結合活性を制御する役割をもつ可能性を示しているものと解釈された。

次に、これら変異体タンパクの基本的転写活性を前項と同様に調べた。結果を図13の b に示す。予想される通り、野生型、およびN末の約60アミノ酸の領域内に欠失をもつ変異体ではそれぞれ同等の活性が観察された (lane6-9)。しかし、C末約180アミノ酸よりなる領域内に欠失をもつ変異体は、そのすべてにおいて活性が認められなかった (lane10-20)。結果をまとめたものを図14に示す。

以上の結果から、TFIIDの2つの活性、TATA box 結合活性と基本的転写活性には、共にC末の約180アミノ酸よりなる領域すべ

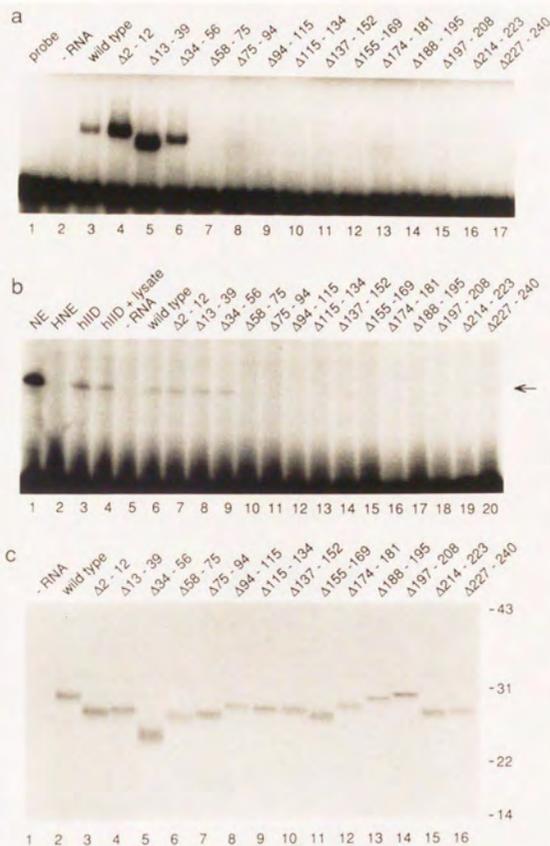


図 13 内部欠失変異体の TATA box 結合活性と基本的転写活性

- a. TATA box 結合活性
- b. 基本的転写活性
- c. SDS-PAGE による産生タンパクの解析

てが必要であることが示された。

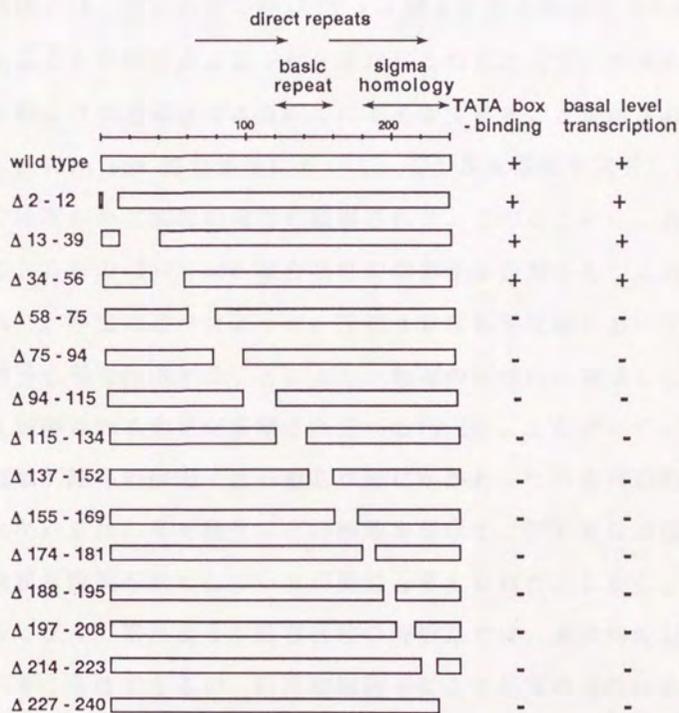


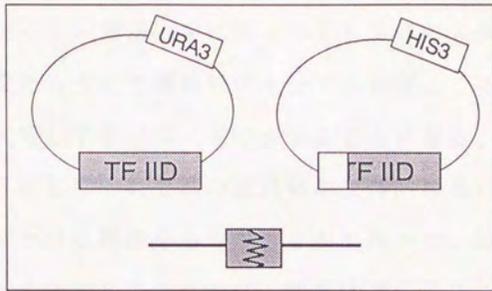
図 14 内部欠失変異体の構造と T F II D 活性

#### § 4. *in vivo*での機能に必要な領域の同定

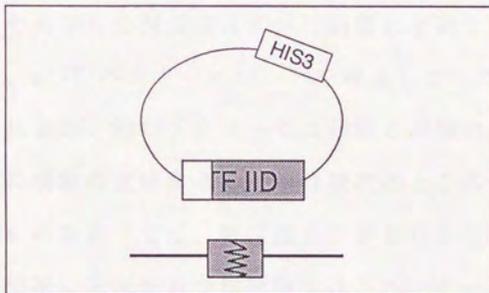
これまでに T F II D の 2 つの活性、TATA box 結合活性と基本的転写活性には、共に C 末の約 180 アミノ酸よりなる領域すべてが必要であることが明らかとなった。また、これに対して、N 末の約 60 アミノ酸よりなる領域は本質的には不必要であることが示された。しかし、TATA box 結合活性において、この N 末領域を欠失した変異体では明らかな活性の増加が観察された。このことから、N 末領域が T F II D の TATA box 結合活性を制御する役割をもつことが推測された。序論に述べたように、T F II D は転写反応において転写制御因子と相互作用することにより、転写の活性化に寄与しているものと理解される知見が蓄積されている (9, 10)。したがって、この N 末領域が転写制御因子との相互作用にかかわっている可能性が考えられた。また、リン酸化などの修飾を受けて、T F II D の活性制御に重要な役割を果たしている可能性も考えられた。しかし、ここまでおこなって来たような転写活性の解析系では、基本的転写活性を調べることはできるが、転写制御因子による転写の活性化を観察することはできない。また、生体内でおこなわれているような修飾反応をここで用いて来た系でどこまで反映できているか疑問である。そこで、N 末領域の機能に関するこれらの可能性を検証し、あわせて T F II D が生体内においてその機能を果たすのに必要な領域を同定するために、出芽酵母の正常遺伝子をここで作製した欠失変異遺

伝子と置き換えて、その生育に及ぼす影響をプラスミドシャフリング(20)により調べた。なお、本項は、Vanderbilt大、P. Anthony Weil助教授との共同研究によるものである。

方法を以下に簡単に述べ、その概略を図15に示す。TFIIDは、出芽酵母において必須で単一の遺伝子である(18)が、まず、これを完全に欠失した変異体酵母を作製する。このままでは当然この変異体酵母は生育することができないので、野生型のTFIID遺伝子を、選択マーカーとしてURA3遺伝子をもったベクターに組み込み、変異体酵母に導入しておく。次に、この変異体酵母に、さらに、先に作製した欠失変異をもったTFIID遺伝子を、選択マーカーとしてURA3以外の適当な遺伝子(LEU2, HIS3など)をもったベクターに組み込み、導入する。このようにして、染色体上にはTFIID遺伝子をもたないが、染色体外に、URA3遺伝子を選択マーカーとするベクターに組み込まれた野生型TFIID遺伝子とURA3以外の適当な遺伝子を選択マーカーとするベクターに組み込まれた欠失変異体遺伝子とをもつような酵母株をそれぞれの欠失変異体ごとに作製する。次に、この酵母株を、5-fluoroorotic acid (5-FOA)の存在下に培養する。酵母内で5-FOAはURA3遺伝子産物の存在下5-fluorouridineとなる。これはチミジル酸合成酵素を阻害してDNA合成を停止させるため、野生型TFIID遺伝子を組み込んだベクターを保持している酵母株は死滅することになる。しかし、このベクターは選択圧のかからない状態では約1%の割合で脱落して行き、このような野



↓ 5-FOA  
 ↓ loss of the vector  
 ↓ containing the wild type gene



↓  
 analysis of phenotype

図 15 プラスミドシャフリングによる変異体の *in vivo*での機能の解析法

生型 T F II D が失われた株においては 5-FOA の影響を受けなくなる。したがって、酵母の中に残った T F II D の欠失変異体が、酵母の生育を支えるうえで機能的に十分であれば、この変異体をもった酵母株は生育してコロニーを形成することになる。

このようにしてそれぞれの変異体が生体内において酵母の生育を支えるのに十分な機能をもつかどうかを調べた。結果を図16に示す。産物量による効果を見るために、変異体遺伝子をそれぞれ3種類の異なるベクターに導入した。遺伝子からの産物量は、ベクターのコピー数と、プロモーターの強さで調節することができる。ここでは pTFII D < pPGK < pGAL の順に産生量が多くなる。まず、5-FOA の非存在下では、それぞれの酵母株はすべて同様に生育することがわかった。ただし、pPGK ベクターに  $\Delta 13-39$  を導入したものでは生育の遅れが観察されるが、他のベクターでは親株と同様の生育を示すこともあり、この現象の意味するところは現在のところ不明である。そして、5-FOA の存在下では、野生型の T F II D とともに、N 末約 60 アミノ酸の領域に欠失をもつ変異体では、ベクターの種類によらず生育が認められたが、C 末部分に欠失をもつ変異体ではそのすべてにおいて生育が認められなかった。なかでも、N 末領域を完全に欠失した変異体 ( $\Delta 2-61$ ) においても生育が認められ、データは示さないが、富栄養培地、最少栄養培地のいずれにおける増殖にも野生型のそれと差は見られなかった。また、調べた限りにおいて、転写開始点の位置や転写産物量、転写制御因子に対する応答性にも差は

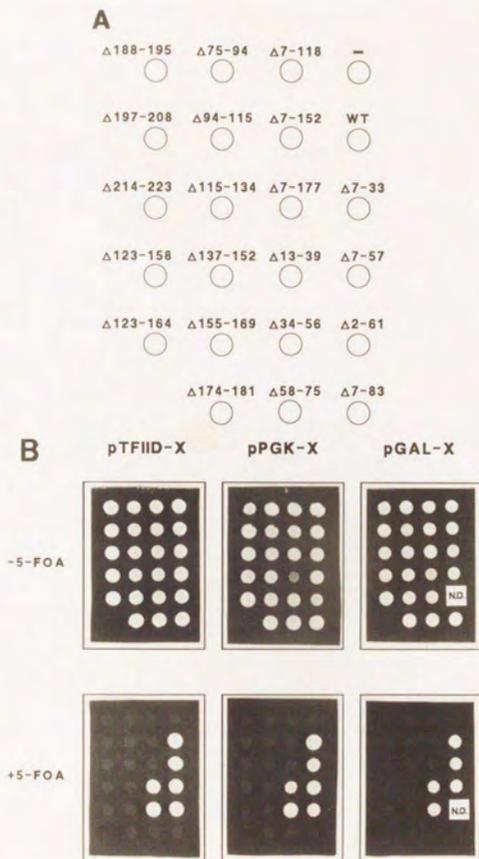


図 16 変異体 T F I I D の増殖支持能の解析

A. 解析に用いた変異体 T F I I D

B. 5-FOA 非存在下 (- 5-FOA)、存在下 (+ 5-FOA) における増殖能

見られなかった。このことから、酵母の増殖にもC末の約180アミノ酸よりなる領域が必要であり、これに対してN末領域は不必要であることがわかった。

増殖には、一群の遺伝子の発現が正確に制御されることが必要であることは明らかであり、以上のことから、N末領域は転写活性の制御を含むすべてのTFIIDの活性に本質的には不必要であるものと結論された。また、*in vitro*での解析から明らかとなった、TFIIDの2つの活性、TATA box 結合活性と基本的転写活性に必要なC末の約180アミノ酸からなる領域が、TFIIDの全活性に必要な十分であることが示された。

## § 5. T F II Dはモノマーとして TATA box と結合する

basic-leucine repeat、basic-Helix-Loop-Helix などの DNA 結合モチーフをもつ一群の DNA 結合因子において、これがオリゴマー（多くはダイマー）を形成して DNA と結合することが知られている(13)。そこで、T F II D の TATA box への結合様式を明らかにする試みの1つとして、これが DNA に結合する際にオリゴマーを形成するものかどうかを調べた。

方法を以下に簡単に述べ、概略を図17に示す(21)。in vitro transcription-translation法により調製した野生型 (wt) および、TATA box 結合活性をもつN末欠失変異体 ( $\Delta$ ) と DNA との複合体をゲルシフト法により解析すると、これらはそれぞれ移動度の明らかに異なるシグナルとして観察することができる。ここで、野生型と、欠失変異体とを同時に同じライゼート内で翻訳させたもの (wt +  $\Delta$ ) について同様に解析をおこなう。ここで、それぞれ別に翻訳させたものを混合するのではなく、同じライゼート中で同時に翻訳されたものを用いるのは、このような多量体の解離定数が一般に非常に低く、一旦多量体が形成されれば通常の条件下では容易に解離しないためである。もし、T F II D がモノマーとして TATA box に結合するならば、シグナルは、野生型と欠失変異体において見られたものと同じ移動度のもののみがそれぞれ観察されるであろう。これに対して、もしダイマーもしくはそれ以上のオリゴマーとして

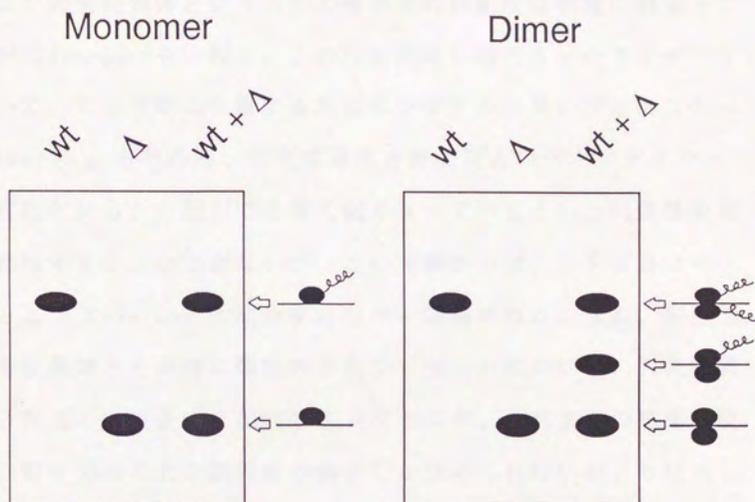


図 17 DNA結合時の重合状態の解析法

wt: 野生型、Δ: 欠失変異体

2量体以上重合して結合しているならば、ヘテロオリゴマーに起因するシグナルが野生型と変異体の中間移動度を示して観察されるはずである。

結合するならば、野生型および欠失変異体においてそれぞれ見られたものの中間の位置に、野生型と欠失変異体との複合体に起因する新たなシグナルが観察されるはずである。

それぞれのゲルシフト法による解析結果を図18の a に示す。野生型および欠失変異体と DNA との複合体の移動度は明確に異なっているが (lane3と5を比較)、これらを同時に翻訳させたライゼートにおいて、この中間に位置する新たなシグナルは見いだされなかった (lane4)。もちろん、欠失変異体と野生型とのヘテロダイマーの形成能が何らかの理由で非常に弱くなっているという可能性を完全に排除することはできないが、この実験からは、TFIIDはモノマーとして TATA box に結合するものと結論された。なお、野生型と欠失変異体とを同時に翻訳させたライゼートにおいて、欠失変異体と DNA との複合体に起因するシグナルが、これまでの結果に反して、野生型のそれと同程度の強さしか認められないが、b に示した SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のオートラジオグラムから、これは欠失変異体の産生量が少ないためであると考えられた (lane3とlane4の欠失変異体の産生量を示すシグナル強度を比較)。

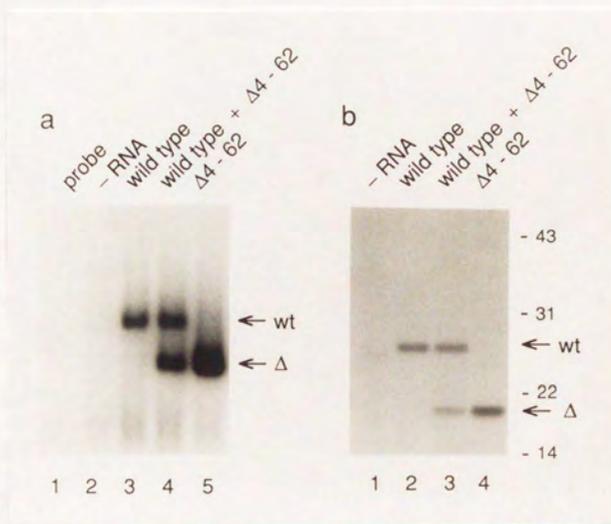


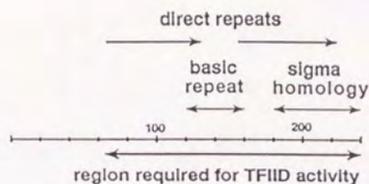
図 18 TFIIDはモノマーとしてTATA boxと結合する

- a. TATA box 結合活性
- b. SDS-PAGE による産生タンパクの解析

## § 6. 結論と考察

TFIIDの構造的特徴と、そこに見いだされた興味深い構造の重要性とを明らかにするために、系統的に一連の欠失変異体を作製し、その TATA box 結合活性、および基本的転写活性を調べることにより、それぞれに必要な領域を決定した。結果をまとめたものを図19に示す。これら欠失変異体の解析の結果、両TFIID活性にはC末の約180アミノ酸よりなる領域のすべてが必要であることが明らかとなった。また、*in vivo* において欠失変異体が野生型の機能を相補できるか調べた結果、TFIIDの全活性にはこのC末領域で必要十分であり、N末の領域は本質的には不必要であることが明らかとなった。

図20に従来知られてきた転写制御にかかわる塩基配列特異的DNA結合因子の構造と、欠失変異体の解析から明らかとなったTFIIDの構造とを模式的に比較したものを示す。先に述べたように、これまで知られている塩基配列特異的DNA結合因子では、そのDNAとの結合に必要な領域は、このような欠失変異体を用いた解析によって約60-100アミノ酸よりなる比較的小さな領域に局限でき、その転写の活性化に必要とされる領域は、DNAとの結合に必要な領域と離れた位置に、同様の方法で容易にマップすることができている。これに対して、TFIIDのTATA box 結合活性および基本的転写活性には、C末の約180アミノ酸よりなる、塩基配列特異的DN

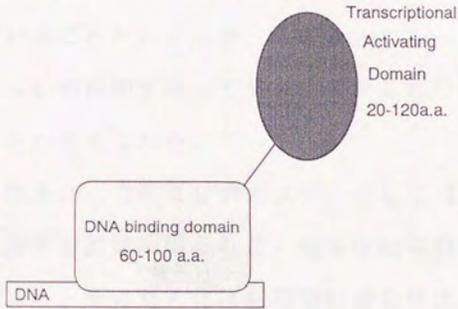


		TATA box - binding	basal level transcription	viability
Terminal Deletions	wild type	+	+	+
	Δ 2 - 12	+	+	+
	Δ 7 - 33	+	+	+
	Δ 7 - 57	+	+	+
	Δ 4 - 62	+	+	+
	Δ 7 - 83	-	-	-
	Δ 7 - 117	-	-	-
	Δ 116 - 240	-	-	-
	Δ 177 - 240	-	-	-
	Δ 227 - 240	-	-	-
	Δ 238 - 240	-	-	-
	Internal Deletions	Δ 2 - 12	+	+
Δ 13 - 39		+	+	+
Δ 34 - 56		+	+	+
Δ 58 - 75		-	-	-
Δ 75 - 94		-	-	-
Δ 94 - 115		-	-	-
Δ 115 - 134		-	-	-
Δ 137 - 152		-	-	-
Δ 155 - 169		-	-	-
Δ 174 - 181		-	-	-
Δ 188 - 195		-	-	-
Δ 197 - 208		-	-	-
Δ 214 - 223		-	-	-
Δ 227 - 240	-	-	-	

図 19 欠失変異体 TFIID の構造と活性

活性の認められた変異体を白ヌキで、認められなかった変異体を黒であらわす。

Sequence Specific Transcription Factor



TFIID

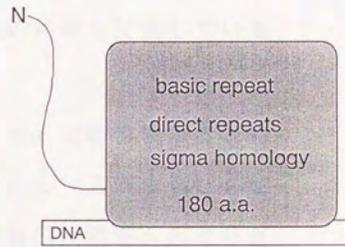


図 20 塩基配列特異的DNA結合因子とTFIIDとの、欠失変異体の解析より明らかになった構造の比較

A結合因子としては例外的に長い領域のすべてがこの両方の活性に共に必要であることがわかった。そして、これらをそれぞれに必要な領域に分離して同定することはできなかった。これらのことから、TFIIDは、従来知られていたような塩基配列特異的DNA結合因子とは本質的に異なった構造的特徴をもっていることが示唆された。

また、TFIIDの一次構造から見いだされた3つの興味深い構造、direct repeat、basic repeat region、sigma homology regionのすべてが、TFIIDの全活性に必要な、このC末の領域内に含まれていることがわかった。このことから、これらはTFIIDの機能に何らかの役割を担っており、TFIIDの構造的特徴を反映していることが考えられた。

最後に、TFIIDがモノマーとしてTATA boxに結合することを支持する知見が得られた。転写は転写開始点から一方向に進む必要があり、そのためには転写開始複合体は非対称的に構築されなければならない。そして、転写開始因子の分子集合がTFIID-プロモーターDNA複合体を認識して形成されることを考えると、この複合体がすでに非対称的に構成されていなければならないものと思われる。実際にTFIIDのTATA boxへの結合には方向性のあることが示されている(1, 9, 10, 27)。非対称性が導かれる要因としては、プロモーターDNA側のもの(26, 27)と、これに結合するTFIID自身に起因するものとの2者をあげることができるが、ここでTFIIDがモノマーとしてTATA boxに結合することは、こうした要請

にとって合理的であり、TFIIDがその機能を果たすうえでの特徴  
の1つを表しているものと考えられる。

## 2章 direct repeat と basic repeat region

### - T F II D の特徴的な構造とその役割の解析

#### § 1. 戦略

前章において、T F II D は従来知られていた塩基配列特異的 D N A 結合因子とは本質的に異なった構造的特徴をもっており、その全活性には C 末の約 180 アミノ酸よりなる領域が必要十分であることが明らかとなった。また、最初に指摘した 3 つの興味深い構造がこの領域にすべて含まれることから、これらの構造が T F II D の機能において何らかの役割を果たしており、T F II D の構造的特徴を反映していることが考えられた。そこで次に、これら興味深い構造の重要性を検証し、それぞれの T F II D の機能における役割を明らかにしようと考えた。

戦略としては、そのなかでもより特徴の明確な、direct repeat と basic repeat region に注目して、一連の点変異をこの C 末領域に系統的に導入し、これらの変異の T F II D 活性におよぼす影響を調べることにした。どこにどのような変異を導入するかは、以下のように考えてその決定をおこなった。まず、この C 末領域を構成しているアミノ酸残基のうち、次に述べる理由から、ロイシン残基とリジン残基に着目した。図 21 にこれら残基の C 末領域内における位置を示す。これからわかるように、まず、これらアミノ酸残基は



このC末領域内に比較的均等に存在しており、C末領域全体を一様かつ系統的に調べるうえで都合がよい。また、これらアミノ酸残基は direct repeat 間で保存されているものが多く、特にリジンは basic repeat region の主たる構成因子であるなど、両アミノ酸残基はこれらの構造において重要であると考えられる。こうした理由から、ロイシン残基とリジン残基に着目し、そのそれぞれに点変異を導入することにした。どのような変異を導入するかであるが、得られる結果を明確にするために、drastic な変異を導入することとした。ここで、ロイシン残基はもっとも疎水性の高いアミノ酸残基の1つであり、逆にリジン残基はもっとも親水性の高いアミノ酸残基の1つである。そこで、ロイシン残基はリジン残基に、また、リジン残基はロイシン残基にそれぞれ変異させることとした。以上のように考えて、TFIIDの全活性に必要なC末約180アミノ酸よりなる領域に存在するすべてのロイシン残基およびリジン残基について、ロイシン残基はリジン残基に、また、リジン残基はロイシン残基に変異させた点変異体をそれぞれ作製することとした。そして、これらの点変異が TATA box 結合活性および基本的転写活性におよぼす影響を観察することにより、TFIIDにおいて見られた興味深い構造、なかでも、direct repeat と basic repeat region の重要性を検証し、それぞれの役割をあきらかにすることができると考え、以下の実験をおこなった。

## § 2. 点変異体の作製と解析

TFIIDの全活性に必要なC末約180アミノ酸よりなる領域に存在するすべてのロイシン残基およびリジン残基について、そのうちの1残基を、ロイシン残基ならリジン残基に、リジン残基ならロイシン残基に変異させた点変異体遺伝子を、部位特異的なオリゴDNAを用いた方法でそれぞれ作製した。次に、この変異体遺伝子の導入されたプラスミドから変異体タンパクをin vitro transcription-translation法により調製した。そして、これらTFIIDの点変異体について、それぞれTATA box 結合活性を前章と同様に調べた。

まず、変異体TFIIDの産生量を調べるために、それぞれSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、オートラジオグラムをとった。その結果を図22の下段に示す。シグナルの強度からそれぞれほぼ等量の変異体タンパクが産生されていることがわかった。

次に、これら変異体TFIIDのTATA box 結合活性をゲルシフト法により調べた。結果を図22の上段に示す。細い矢印で示したシグナルは、ライゼートのみでもロットに依存して見られるものであり、太い矢印で示したシグナルがTATA box 結合活性をあらわす。basic repeat region内のアミノ酸の点変異体は、N末側の2残基における変異120K→Lと127K→Lを除き、TATA box 結合活性が観察された

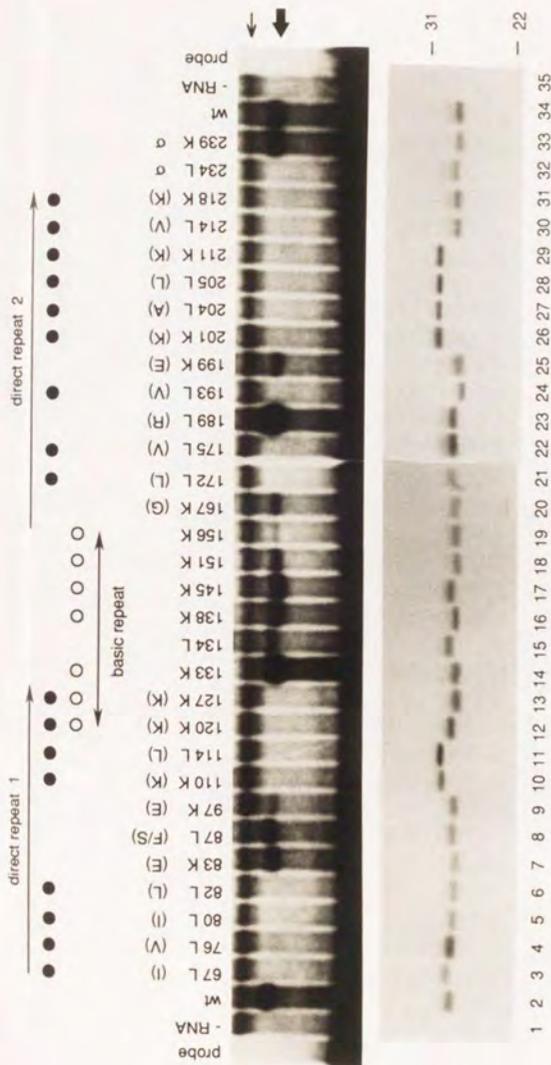


図 22 点変異体 TFIID の TATA box 結合活性

上段: TATA box 結合活性

下段: SDS-PAGE による産生タンパクの解析

それぞれの位置のロイシン(L)はリジンに、リジン(K)は、ロイシンにそれぞれ変異させた。括弧内は direct repeat において、それぞれに対応する相手方のアミノ酸残基を示す。黒丸は direct repeat 間で保存されている、もしくは性質の似通っているアミノ酸残基を、白丸は basic repeat region を構成するリジン残基を示す。σ は direct repeat からは外れた sigma homology region 内に属するアミノ酸残基であることをあらわす。

(lane14-19)。これに対し、direct repeat 内の点変異体は、そのほとんどにおいて活性が検出されなかった (lane3-13, 20-31)。また、その内容を見ると、興味深いことに、両direct repeat間で保存されている、もしくは化学的に性質の似通ったアミノ酸残基 (●であらわす) の変異 (lane3-6, 10-13, 21-22, 24, 26-31) は、例外なくすべて TATA box 結合活性を失わせており、逆に、活性の見られるもの (lane8-10, 20, 23, 25) はすべて両 direct repeat 間で保存されていないアミノ酸残基についての変異であることがわかった。ここで、basic repeat region のN末側の2残基は、direct repeat間で保存されているアミノ酸残基であり、これはbasic repeat region よりもむしろ direct repeat に属するものと考えられた。以上のことから、direct repeat はTFIIDの TATA box 結合活性を担っており、これに対して basic repeat region は直接には重要な役割を果たしていないものと考えられた。

次に、これら変異体の基本的転写活性を調べた。方法は、以下に述べる理由から、前章とは異なり、それぞれの変異体タンパクを大腸菌において産生させ、こうして得られた組み換え体TFIIDと、部分精製した基本的転写因子を用いておこなった。各変異体のTATA box 結合活性にはその強さにおいて差が見られ、野生型よりも顕著に活性の低いものがいくつか存在した (特に97K, 156K)。TFIIDが TATA box に結合し、これを認識して転写開始複合体が形成されるという転写開始反応の機構を考えると、TATA box 結合活

性と転写活性には比例関係のあることが予想される。しかし、前章において用いた方法では、*in vitro* transcription-translation法により産生されるタンパク量が少ないことから、転写活性を示すシグナルはバックグラウンドに比してやや弱い（図10b, 図13b）。したがって、TATA box 結合活性が野生型より低いような変異体では、この検出系では実際には転写活性があっても認められなくなる可能性が考えられる。以上の理由から、確実に転写活性を検出するために、まず、それぞれの変異体タンパクを大腸菌において大量に産生させることにした。

産生系はStudierらにより開発された方法（T7 expression system）(22)を用いておこなった。概略を図23に示す。発現ベクターは、T7 RNAポリメラーゼのプロモーター（ $\phi 10$ ）と、その下流にリボソーム結合部位である Shine-Dalgarno 配列をもち、翻訳開始位置に制限酵素であるNdeIの認識配列が存在する。ここに、部位特異的オリゴDNAを用いた方法で、翻訳開始位置にNdeI認識配列を導入した遺伝子を組みこむ。こうして作製されたプラスミドをT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含むラムダファージが溶原化した大腸菌に導入する。このT7 RNAポリメラーゼ遺伝子は lac repressor の支配下にあり、培養中に IPTG を添加することにより lac repressor を不活化すると、T7 RNAポリメラーゼが産生される。T7 RNAポリメラーゼは、発現ベクター内に組み込まれた遺伝子からmRNAを産生し、これが最適の効率で翻訳されて、求める遺伝

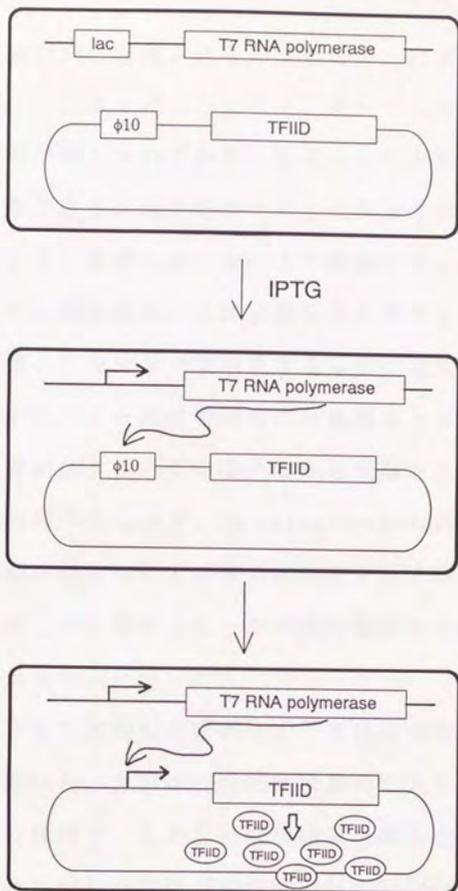


図 23 T7 Expression System による大腸菌での組み換え体タンパクの産生法

lac : lac repressor  $\phi 10$  : T7 RNAポリメラーゼ

発現ベクターを導入した大腸菌を培養し、IPTGを加える。すると、lac repressor が解除され、T7 RNAポリメラーゼが産生される。産生されたT7 RNAポリメラーゼは $\phi 10$ プロモーターより多量の mRNA を合成し、これが翻訳されて大量の組み換え体タンパクが蓄積される。

子産物が大腸菌内に蓄積される。ここで、これまで作製してきた変異体遺伝子は、前章に述べたように、すべて、その翻訳開始位置に NdeI 認識配列が導入されており、容易にこれを発現ベクター内に組み込むことができる。以上のようにして変異体 T F II D を大腸菌内で産生させ、その菌体を超音波により破碎して、遠心し、上清にこれを回収した。産生量は、この上清を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、クーマシーで染色することにより、なにもインサートを含まないベクターだけの場合には観察されないバンドとしてあらわれる、変異体タンパクの染色度から見積もることができる。

結果を図24の下段に示す。in vitro transcription-translation 法により調製されたものと同様の移動度を示す野生型と各変異体 T F II D が、相互に比較することが可能な量産生され、回収されていることがわかった。

次に、こうして調製した変異体 T F II D をもちいて、その基本的転写活性を調べた。方法は、今回は大量の T F II D が得られているために、より簡便で、しかも明確な結果を得ることができる、G-less カセットを利用した方法(23)を用いた。G-less カセットとは、その中に G を含まない転写単位のこと、これを鋳型として、G T P の非存在下に転写反応をおこなわせると、正しい位置からの転写産物は、その中に G を含まないために伸長することができるが、それ以外のものは伸長できないために、反応産物をそのまま電気泳動し、オートラジオグラムをとるだけで、正しい位置からの転写産物を極

めて明瞭に検出することができる。ここでは、アデノウイルス2型主要後期遺伝子のプロモーターにG-lessカセットを連結したプラスミドDNAを鋳型とし、これに前述のように調製した組み換え体の野生型および変異体TFIIDと、それぞれ部分精製した基本的転写因子(TFII B, TFII E/F, RNAポリメラーゼII)を加えて反応させた。そして、この反応産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、オートラジオグラムをとった。結果を図24の上段に示す。

TFIIDを欠いた基本的転写因子のみでは活性が見られない(-hIID)が、これに、HeLa細胞から部分精製したTFIID(+hIID)や、組み換え体の野生型TFIID(wt; lane2)を加えると、矢印で示した380baseの転写産物の出現として、基本的転写活性を明確に検出できる。この系を用いて、各点変異体の基本的転写活性を調べると、まず、basic repeat region内の変異をもつものを含め、TATA box 結合活性を保持していたすべての変異体について、基本的転写活性が認められることが分かった(lane7-9, 14-20, 23, 25, 33)。したがって、basic repeat region は、転写活性においても直接には重要な役割を果たしてはいないものと考えられた。また、このような系統的な点変異体を用いた解析によっても、転写活性に特異的に働く領域を同定することができなかった。

以上の結果をまとめたものを図25に示す。ここで、予測に反しているが、しかし同時にまた興味深いことに、TATA box 結合活性が





検出されなかった点変異体の中に、転写活性を示すものが存在する (110K, 114L, 120K, 127K, 211K, 218K) ことがわかった。転写開始反応は、まず T F II D と TATA box が複合体を形成し、これを認識して他の基本的転写因子群の分子集合が起こり、転写開始複合体が形成されるという機構で進むことを考えると、これは一見矛盾した現象であるが、これが T A T A box 結合活性と基本的転写活性とのそれぞれの検出法の本質的な違いによるものと考え、現在のところもっとも理解しやすい。まず、TATA box 結合活性は、DNA 断片と T F II D のみを用いて、その複合体形成を、ゲルシフト法により解析したものである。ゲルシフト法では原理的に、この複合体が十分安定でなければ、少なくとも電気泳動中はその大部分が複合体を形成したまま保持されなければ、活性として検出することができない。これに対して、基本的転写活性は、鋳型 DNA と T F II D、そしてこれに加えて転写開始因子群の存在下におこなわれた転写反応の産物をそれぞれ解析することにより調べられている。したがって、この現象の説明は、1 つには、こうした変異体が TATA box と transient に複合体を形成することができ、これを認識して、速やかに基本的転写因子群が分子集合し、転写開始複合体が形成され、転写活性として観察されたということが考えられる。また、基本的転写因子中に、こうした transient な複合体を安定化する活性が存在する可能性を指摘することもできる。

以上の結果から、direct repeat は、T F II D が TATA box と安

定な複合体を形成するのに重要な役割を担っている構造であることが明らかになった。これに対して、basic repeat regionはTF II Dの2つの活性に直接はかかわっていないものと考えられた。

### § 3. basic repeat regionへの挿入・欠失変異の導入と解析

前項の結果から、basic repeat region は T F II D の 2 つの活性に直接重要な役割は果たしていないものと考えられた。しかし、basic repeat region は計算上ランダムな構造を取るよりもむしろ  $\alpha$ -helix をとる potential が高く(12)、また、T F II D 分子内において、TATA box 結合活性を担う 2 つの direct repeat を結ぶ重要な位置を占めている。したがって、1 つの可能性として、この 2 つの direct repeat の位置関係は適正に保たれる必要があり、これに basic repeat region が関与していることが考えられた。そこで、この可能性を検証するために basic repeat region 内に 1 ~ 3 アミノ酸という非常に小さな挿入・欠失を導入し、その TATA box 結合活性および基本的転写活性におよぼす影響を調べた。もし、2 つの direct repeat の位置関係は厳密に保たれなければならないならば、このような極めて小さな挿入・欠失によっても T F II D 活性は大きな影響を受けるものと思われる。また、そうでなく単なる joint としての役割しかないならば、この程度の挿入・欠失では点変異体の場合と同様 T F II D 活性に影響はないものと思われる。そこで、部位特異的なオリゴ DNA を用いた方法で basic repeat region の中央(141番)および C 端(156番)部にそれぞれ 1 ~ 3 アミノ酸の挿入(アラニン残基)・欠失をもった変異体遺伝子を作製

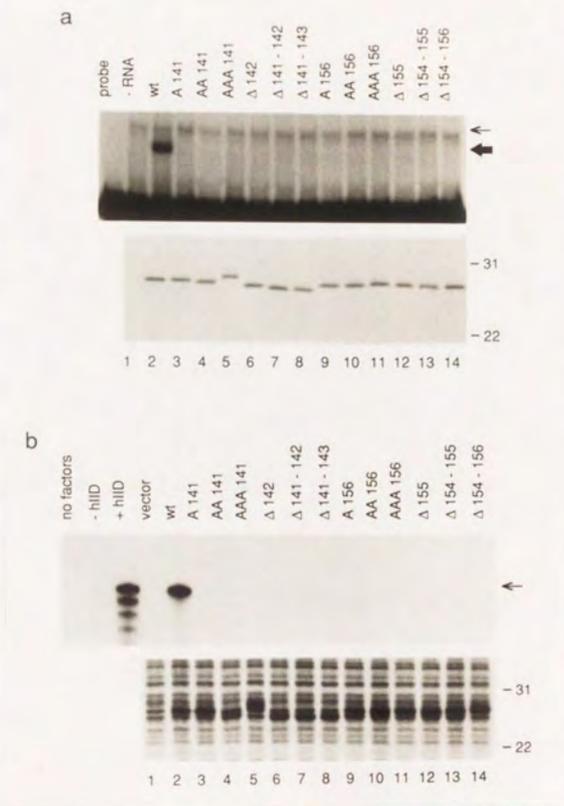


図 26 basic repeat region に挿入・欠失をもつ変異体の TFIID 活性

A141は、141番の位置にアラニンを1個挿入したことを、AA141は同じく2個挿入したことをそれぞれ示す。

- a. 上段：TATA box 結合活性  
下段：SDS-PAGE による産生タンパクの解析
- b. 上段：基本的転写活性  
下段：SDS-PAGE による産生タンパクの解析

した。そして、前項と同様に *in vitro* transcription-translation 法および大腸菌の T7 expression system を用いて変異体タンパクを調製し、これらを用いてその TATA box 結合活性と基本的転写活性を調べた。

結果を図26に示す。aは TATA box 結合活性を、bは基本的転写活性を調べた結果であり、それぞれ前項と同様に、上段が活性を、下段がタンパクの産生量を調べた結果を示す。それぞれタンパクは野生型と同様に産生されているにもかかわらず、わずか1アミノ酸のみの挿入しかもたないもの (lane3.9) を含め、すべての変異体において、両 T F II D 活性は検出されなかった。このことから、TATA box 結合活性を担う2つの direct repeat の位置関係は厳密に保持される必要があり、これに basic repeat region が関与していることが考えられた。

#### § 4. 結論と考察

TFIIDの全活性に必要な十分なC末約180アミノ酸の領域をより詳細に調べ、ここに含まれる興味深い構造のうち、とくに direct repeat と basic repeat region についてその重要性と役割を明らかにするために、一定の戦略のもとに一連の点変異体を系統的に作製し、それらの TATA box 結合活性および基本的転写活性を解析した。その結果、図25にまとめたように、direct repeat 間で保存されているアミノ酸についての変異が例外なくすべて TATA box 結合活性を失わせ、逆に、活性の見られるものはすべて direct repeat 間で保存されていないアミノ酸残基についての変異であることから、direct repeat は TATA box 結合活性を担っている構造であることが明らかとなった。これに対して basic repeat region は、この領域における同様の変異によっても、そのすべてがTATA box 結合活性、基本的転写活性を保持していたことから、直接には両TFIID活性に重要な役割を果たしてはいないものと思われた。しかし、この領域に小さな挿入・欠失を導入した変異体を作製し解析した結果、basic repeat region は2つの direct repeat の間にあって両者の位置関係を適切に保持する役割のあることが推察され、これによってTFIID分子全体の構造維持にかかわっていることが考えられた。また、このことは同時に basic repeat regionのわずかな conformation 変化もTFIID分子全体の構造に大きな影響をお

よぼし得ることを示しているものと思われる。ここで basic repeat regionは、直接には両TFIID活性に重要な役割を果たしてはいないものと思われること、 $\alpha$ -helixをとる potentialが高く、このときに、helixの片側に塩基性の、そしてこれは同時に親水性の高いアミノ酸残基が集まること(12)から、常にTFIID分子の外側に位置し、TATA box結合、転写反応の過程を通して露出していることが考えられる。したがって、この basic repeat regionは、他の因子と物理的に直接相互作用することが可能であり、また相互作用によってここに引き起こされるわずかな構造変化も、TFIID分子全体の構造と活性に大きな影響を与え得ることが予測されることから、他の転写因子がTFIIDの活性に何らかの影響をおよぼそうとするとき、basic repeat regionがその相互作用の標的として働くという可能性を考えることができる。

TFIIDがTATA boxに結合し、これを認識して転写開始複合体が形成されるという転写開始反応の機構を考えると、TATA box結合活性をもたないものには、転写活性が認められないことが予想されていた。しかし興味深いことに、このような予測に反して、点変異体の解析の過程でTATA box結合活性が見られないものの中に、基本的転写活性が観察されるものが複数見いだされた。このような一見相反するような現象が見られる理由は、TATA box結合活性がDNA断片とTFIIDとの安定な複合体を検出することにより解析されているのに対し、基本的転写活性は、鋳型DNAとTFIIDお

よび基本的転写因子群の存在下におこなわれた転写反応の産物を解析することにより調べられているといった、それぞれの活性の検出法の違いによるものと理解される。また、このことから、転写活性には TATA box と T F II D がそれらのみで安定な複合体を形成することが必ずしも必須ではなく、基本的転写因子群に不安定な複合体でも認識できる、あるいは不安定な複合体を安定化する能力が存在することが考えられる。

また、このような現象が観察される点変異はそれぞれの direct repeat の一定の領域に集中しており (図25)、この領域は Helix-Loop-Helix (HLH) 構造の一部と相同性をもつことが後に報告された (24)。HLH は一群の塩基配列特異的 DNA 結合因子において見られる構造で、ホモあるいはヘテロダイマー形成に関与する構造であることが明らかになっている (25)。したがって、2つの direct repeat はこの領域を介して分子内で相互作用をおこない、これが T F II D の構造を安定化させ、TATA box と安定な複合体を形成するうえで何らかの働きをしているという可能性が考えられる。また、これら HLH 領域の変異体には、両 direct repeat においてそれぞれ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上の移動度に異常が見られる (図22, 24; lane 10-11, 26-29)。このような現象は点変異体を作成したときに一般的にしばしば観察されるものであり、これがどのような分子論的機序によるものなのかは不明である。しかし、例えば、この領域がある特別な構造をとっており、これを反映して

いることなどが考えられ、TFIID分子における HLH 領域の重要性を考えるうえで1つのヒントになり得るものと思われる。

わたしは転写開始反応とその制御において中心的な役割を果たしている TATA box 結合因子 T F II D の構造活性相関の解析を行った。その一次構造からは、これまでに知られているような D N A 結合モチーフなどは見当たらず、顕著な相同性を示す既知のタンパクも見られなかったが、direct repeat, basic repeat region, sigma homology region といった興味深い構造を見いだすことができた。そして、T F II D の 2 つの基本的な活性がどの領域に存在するかを決定するために一連の欠失変異体を系統的に作成・解析し、その結果、TATA box 結合活性には C 末の約 180 アミノ酸という比較的長い領域のすべてが必要であることを明らかにした。また、基本的転写活性に特異的に必要な領域をここから分離して同定することはできなかった。これらは従来知られていた塩基配列特異的 D N A 結合因子において見られていた事象とは大きく異なり、このことから、T F II D はこれら塩基配列特異的 D N A 結合因子とは本質的に異なる構造的特徴をもっているものと考えられた。また、in vivo での相補性解析から、T F II D の全活性にはこの C 末 180 アミノ酸よりなる領域で必要十分であり、N 末領域は T F II D の機能において本質的には重要でないことを明らかにした。そして、3 つの興味深い構造がすべて T F II D の全活性に必要な C 末領域に含まれていたことから、これらが T F II D の機能において何らかの役割を担っているこ

とが考えられた。そこで、一定の戦略のもとに一連の点変異体を系統的に作成・解析し、その結果、direct repeat が TATA box 結合活性を担う上で重要な構造であることを明らかにした。これに対して、basic repeat region は T F II D 活性に直接は重要な役割を果たしてはいないと考えられたものの、さらに解析を進めた結果、2つの direct repeat の位置関係が適切に保たれていることが T F II D 活性にとって極めて重要であり、これに basic repeat region が関与していることを示唆する結果を得た。以上、本研究より得られた結果から推測される出芽酵母 T F II D の構造を図27に模式的に示す。N末領域は本質的には不必要な領域であり、全 T F II D 活性に必要な十分なC末領域内では、2つの direct repeat が TATA box との結合に重要な役割を担っている。また、basic repeat region は T F II D 活性に直接は関与していないと考えられるものの、2つの direct repeat をつないでこれらの位置関係を適切に保つことにより T F II D 分子全体の構造維持にかかわっていることが考えられる。

sigma homology region に関しては本研究からはその意義に関して明確な結論を導き出すことはできなかった。ここで、T F II D のC末の約20アミノ酸よりなる領域は、direct repeat からは外れているが、欠失変異体を用いた解析から、C末のわずか3アミノ酸のみの欠失を含むこの領域における欠失が T F II D 活性を完全に失わせてしまうことが示されており（図10； $\Delta$ 227-240,  $\Delta$ 238-240）、

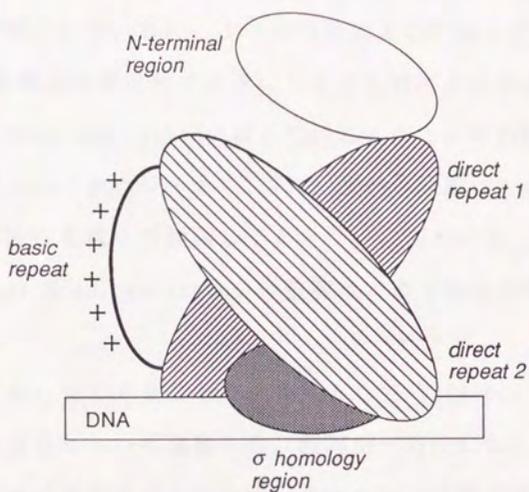


図 27 本研究の結果から推測される出芽酵母TF II Dの構造

また、点変異体を用いた実験でも、この領域に導入された変異に T F II D の両活性を完全に失わせるものが存在する (図 22, 24; 234L) ことから、この領域も TATA box 結合活性を含む T F II D 活性に何らかの役割を果たしていることが推察される。どのような機能をこの領域が果たしているか、1つの可能性としては、2つめの direct repeat の構造を安定化するというとも考えられるが、この領域が sigma homology region に属していることと、その原核生物のシグマ因子とのアナロジーから、TATA 配列の認識にかかわっているという可能性を敢えて強調しておきたい。図 27 に示した模式図における sigma homology region の位置はこの主張を反映したものである。

1章において T F II D がモノマーとして TATA box に結合することとその意義について議論した。転写が一方向におこなわれるためには転写開始複合体が非対称的に構成される必要があり、T F II D がモノマーとして TATA box に結合することはこの要請に適っていると考えられたが、direct repeat という対称的な構造が TATA box との結合に重要であるとすると、非対称性がどの構造によって保証されるのが問題となる。プロモーター DNA の構造からは、共通配列 (TATA<sup>T</sup>/A<sup>T</sup>/A) から予想されるように TATA box それ自身の非対称性 (26)、また、この周囲の塩基配列により引き起こされる非対称性 (27) が転写開始複合体の非対称的な分子集合を導き得るものとしてあげられる。したがって、これを認識して結合する T F II

DのDNA結合領域にも非対称性が存在すると考えるのが合理的で、2つの direct repeat に何らかのかたちで非対称性が導入されているものと考えられる。実際に、これら direct repeat が構造的、機能的に全く同等ではないことは、ここに導入した互いに相同な位置の点変異(110Kと201Kや、114Lと205L)が TATA box 結合活性は共に完全に失わせているものの、基本的転写活性には違った影響を与えていることから明らかである(図22, 24; lane 10, 26; 11, 28)。TFIID分子の構造からは、2つの direct repeat の一次構造の違いと、2つめの direct repeat の一部を占めてC末まで伸びる sigma homology region の存在およびその TATA box 結合における機能とが、2つの direct repeat に非対称性を導入し得るものとして指摘することができる。しかし、前段で議論したように、direct repeat に入らない sigma homology region 内の変異が TATA box 結合活性を完全に失わせることから、単なる2つの direct repeat の一次構造の違いによるというよりはむしろ、この sigma homology region の存在とその TATA 配列の認識にかかわるという機能が積極的にTFIID分子の非対称性を構造の上から保証しているものと考えたい。

2章において、basic repeat region が潜在的に他の因子と相互作用できる位置にあり、この相互作用によってもたらされた basic repeat region のわずかな conformation 変化が、TFIID分子全体の構造とその活性に大きな影響を与える可能性について議論した。

この潜在的な可能性は、転写制御の分子機構を考えるうえで極めて興味深い手掛かりを提供してくれる。序論で述べたように、転写制御因子は T F II D と相互作用することによって T F II D の conformation を変化させ、そして R N A ポリメラーゼ II や他の転写開始因子の分子集合を促進させることで転写の活性化を導くというモデルが提唱されている (9, 10)。そして、このような転写制御因子の転写活性化に必要な領域としてもっとも多く見いだされているのがアシディック領域である (14, 16)。アシディック領域とは、20-60 アミノ酸よりなる比較的酸性アミノ酸に富んだ領域であり、 $\alpha$  ヘリックスをとりやすく、またこのとき、酸性アミノ酸がヘリックスの片側に集まるという特徴をもつ (14)。ここで basic repeat region もまた  $\alpha$  ヘリックスをとりやすく、このとき塩基性アミノ酸がヘリックスの片側に集まるという事実が思い起こされる (12)。つまり、basic repeat region と転写活性化領域であるアシディック領域とが直接相互作用する可能性が強く考えられる。したがって、先のモデルとあわせて、アシディック領域をもつ転写制御因子による転写活性化の分子機構を考えると、以下のような仮説を立てることができる。まず、このアシディック領域が T F II D の basic repeat region と相互作用し、ここに conformation の変化を引き起こす。ついで、この basic repeat region の小さな conformation 変化が T F II D 分子全体に比較的大きな構造変化を引き起こす。そして、この構造変化が R N A ポリメラーゼ II や他の転写開始因子の分子集

合を促進させ、転写の活性化が導かれる。これはあくまで純然たる仮説の域を出ないが、転写制御因子であるVP16のアシディック領域がTFIIDと選択的に結合すること(28)や、同じくE1AがTFIIDのbasic repeat regionと結合すること(29)など、この仮説を支持する知見が最近次々と明らかになっている。

TFIIDがとっているこのような構造には何らかの必然性があるのだろうか。この出芽酵母の遺伝子をもとにして、分裂酵母(30, 42)、シロイヌナズナ(24)、ショウジョウバエ(31)、ヒト(32)においてTFIIDの遺伝子がハイブリダイゼーションやPCRを応用した方法で単離されている。その結果、図28に構造の概略を示したが、欠失変異体を用いた解析からTFIIDの全活性に必要な十分であることを明らかにしたC末の約180アミノ酸よりなる領域は、酵母からヒトに至るまで、全く相同なアミノ酸残基で80%以上、性質の似通ったアミノ酸残基まで加えると、ほぼ100%という驚異的なほど高度に保存されていることが明らかとなった。もちろん興味深い3つの構造はそのまま保存されており、この構造は、TFIIDがその活性を保つうえで必須であったことが推測される。また、RNAポリメラーゼII系の基本的転写因子群の中で最も精製が進んでいたTFIIBのクローニングが最近ようやく報告され、TFIIBも2つのdirect repeatをもち、さらに、1つめのdirect repeatのC端側にbasic repeat regionをもつことが明らかとなった(33)。TFIIDの場合は2つのdirect repeatの間にbasic repeat regionが位

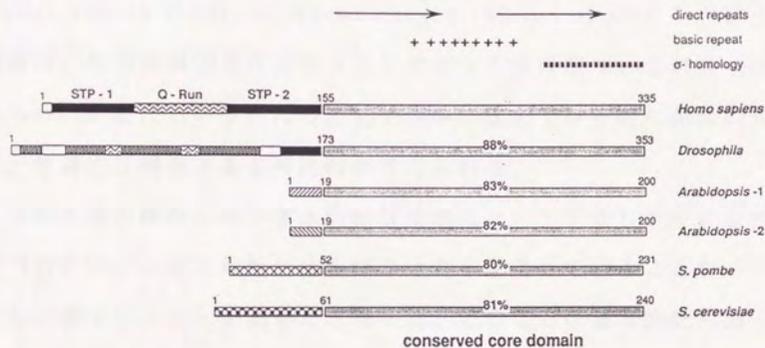


図 28 各種TFII Dの一次構造

%は、それぞれの高度に保存されたC末領域のヒトとの相同性を示す。ヒトN末領域のSTPはセリン・スレオニン・プロリンに富んだ領域を、Q-runは、グルタミン残基の連続を示す。

置していたという違いはあるが、おおまかには direct repeat 1-basic repeat region-direct repeat 2 という共通のモチーフが両基本的転写因子に存在していたということになる。ここで興味深いことに、TF II B も転写制御因子 VP16 のアシディック領域と結合することが示されており(34)、TF II B もまた、ある系では転写活性化にかかわっている可能性が議論されている。このことから、direct repeat 1-basic repeat region-direct repeat 2 という構造は、転写制御因子などからのシグナルを受け取り、これを conformation 変化というかたちで分子全体に伝えていくのに都合の良い、普遍的な構造である可能性が考えられる。

点変異体の解析から、基本的転写反応には、TF II D がそれぞれ単独で TATA box と安定な複合体を作る活性を保持していることが必ずしも必要でないことが明らかとなった。このことは基本的転写因子群の中に TF II D と TATA box との結合を安定化させる因子が存在することを示唆している。ここで、ハウスキーピングタイプの遺伝子など、転写開始点付近に TATA box をもたない遺伝子が存在するが、このような遺伝子の転写反応にも TF II D が必要であることがいくつかの例で示されている(48, 49)。そして、このようなプロモーターでは、TF II D は他の因子と相互作用し、その助けを借りてプロモーター DNA と複合体を形成していることが考えられる。したがって、このような TATA box の存在しない遺伝子の転写反応に TF II D がかかわっていることと、その機構を考えると、今回見い

だされたような、TATA box と安定な複合体を形成することはできないが、転写活性は示すような変異体が存在することは、極めて reasonable であり、また逆に、TATA-less のプロモーターからの転写反応において今述べたような機構が存在することを支持するものであると思われる。また、このような変異体を用いることにより、安定な複合体を形成するのに必要な因子を同定することが可能である。そして、この因子と T F II D との相互作用の詳細や、その転写開始反応に占める位置を明らかにすることにより、転写開始反応における基本的転写因子の分子集合の機序について、さらに新しい知見を提供できるものと考ええる。

以上、わたしは転写開始反応とその制御において中心的な役割を果たしている TATA box 結合因子 T F II D の構造活性相関の解析を行い、従来知られていたような塩基配列特異的 D N A 結合因子とは本質的に大きく異なるその構造的特徴を明らかにし、それらのもつ意義について議論を加えた。89年当時から比べると、いくつかの基本的転写因子のクローニングが報告されるなど(33, 45, 46, 47)、転写開始反応の研究をめぐる環境はようやく整いつつある。その中で、比較的少数の因子に収斂しつつあるかに見えた基本的転写因子群が、精製・クローニングが進み、個々の因子の特徴が分子レベルでより明らかになって行くにつれて予想以上に数が増え(現在 T F II J (44)の存在が報告されている)、本年度(1992年)中にも基本的には達成されるかに見えた転写開始反応の分子レベルでの機構解明へ向

けての道筋は、やや複雑化の様相を示しつつある(43)。しかし、TFIIDはこの中で中心的な役割を担っている因子であり、また、本研究によって、その構造的基盤と機能とが最も明確に把握された基本的転写因子となった。今後、転写開始反応において、TFIIDがどういった因子とどのような相互作用をすることによって転写開始複合体の形成を導くのかといった、地味ではあるが興味深い問題を、本研究から得られた知見と、ここで作成しキャラクタライズをおこなった数々の変異体を用いて掘り下げていくことにより、生命とその維持において根本をなしているシステムのひとつである、転写反応全体の分子レベルでの理解に近づいて行けるものと考ええる。

## 材 料 と 方 法

### 0. 一般的な手法

ここで特に取り上げなかったもの、もしくは簡単にしかふれていないものについては、文献(35)に従っておこなった。

### 1. 変異体DNAの作製(19, 36)

Kunkelらにより報告された方法にしたがって行った。以下に示すように、大きく3つの段階よりなる。

#### ・オリゴDNAの合成と精製

望んだ変異を導入できるようデザインしたオリゴDNAを、ホスホアミダイドを用いた固相合成法により合成した。このとき、合成するオリゴDNAの配列は、基本的には変異をもたない部分の長さが変異を含んだ部分をはさんでそれぞれ15-18baseとなるように決定した。また変異の導入されたDNAの同定を容易にするために、それぞれ新たな制限酵素部位が導入されるよう工夫した。合成されたDNAは濃アンモニア水中、65°Cで1時間処理することにより担体より回収した。この粗オリゴDNAを以下のように精製した。まず減圧下で乾燥後、その残渣をFA dye(98% formamide, 0.1% BPB, 0.1% Xylene Cyanol)300 $\mu$ lに溶解させ、このうち100 $\mu$ lを7M Urea-10%ポリアクリルアミド電気泳動にかけた。BPBがゲルの下端に来たところで泳動を停止し、ゲルを1 $\mu$ g/mlの臭化エチジウムを含む蒸留水中で5分間おだやかに振とうさせたのち、UVトランスイルミネーター(366nm)上で完全長のオリゴDNAに相当するバンドを検出した。これを切り出し、細かくつぶしたのち、PAGE eluti

on buffer (500mM 酢酸アンモニウム、1mM EDTA、0.1% SDS) 300-500 $\mu$ lに懸濁し、37°Cで24時間振とうさせた。遠心後、上清を回収し、等量のフェノールおよびクロホルムでそれぞれ抽出したのち、1/10量の酢酸ナトリウム(pH6.0)と2.5倍量のエタノールを加えてよく攪拌し、ドライアイス中で10分間放置した。4°C、10000g、10分間遠心して得られる沈殿を70%エタノールで洗った後、40 $\mu$ lのstDDWに溶解し、精製オリゴDNA標品とした。

#### ・ウラシルを含んだ単鎖DNAの調製

出芽酵母TFII D遺伝子のコーディング領域をすべて含むSpeI-AccI DNA断片(837bp)をプラスミドpGEM7Zf(+)(Promega)のXbaI-SmaIサイトに組み込んだ。これをDNA内にウラシルを取り込むようになった大腸菌の変異株BW313(*dut<sup>-</sup>, ung<sup>-</sup>*)に導入し、その新鮮なコロニーを、50mlのプラスチックチューブに入った3mlの2 $\times$ YT培地(1.6% tryptone, 0.8% yeast extract, 0.5% NaCl 選択薬剤として50 $\mu$ g/mlのAmpicilineを含む)に移し、37°Cで6-9時間激しく振とうした。この菌液のうち1mlを1リットル容のフラスコに入った100mlの2 $\times$ YT培地に加え、これにさらにウリジンを終濃度0.4 $\mu$ g/mlになるように加えた。37°Cで1時間激しく振とうしたのち、ヘルパーファージM13K07( $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^{10}$  pfu/ml)を1ml加え、さらに37°Cで12-18時間激しく振とうした。この菌液を氷上で冷却後、5000gで15分間遠心し、上清を回収した。これにPEG8000を終濃度3%、NaClを終濃度0.5Mになるようそれぞれ加え、室温で15分間放置した。200g、10分間遠心して得られた沈殿をその20-30倍量のTE buffer(10mM Tris-Cl(pH7.4)、1mMEDTA)に懸濁し、これを等量のフェノールおよびクロホルムでそれぞれ2回ずつ抽出したのち、1/10量の酢酸ナトリウム(p

H6.0)と2.5倍量のエタノールを加えてよく攪拌し、ドライアイス中で10分間放置した。4°C、10000g、10分間遠心して得られる沈殿を70%エタノールで洗った後、40 $\mu$ lのTE bufferに溶解し、ウラシルを含む単鎖DNA標品とした。

#### ・変異を含んだ相補鎖の合成と変異体の同定

50mM Tris-Cl(pH7.4), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 1mM ATP溶液に、精製したオリゴDNAを1ng/ $\mu$ l, T4 polynucleotidekinaseを0.25unit/ $\mu$ lになるように加え、37°Cで1時間保温した。さらに65°Cで10分間保温して酵素を失活させたのち、0.06倍量の20 $\times$ SSC(3M NaCl, 0.3M sodium citrate)を加えた。この溶液の10 $\mu$ lに2 $\mu$ lのウラシルを含む単鎖DNA(0.5-1 $\mu$ g)を加え、攪拌したのち、70°Cに保温した。これを約1時間かけて40°Cまで徐々に冷却したのち氷中に移した。これに10mM ATP, 5mM dNTPmix, stDDWをそれぞれ2 $\mu$ lづつ加え、さらにT4 DNAligase(1unit/ $\mu$ l), Sequenase Ver. 2.0(10units/ $\mu$ l; chemically modified T7 DNAPolymerase)をそれぞれ1 $\mu$ l加えた(total 20 $\mu$ l)。これを氷上に5分、ついで室温に5分それぞれ放置した後、37°Cで90分間保温した。次いで80 $\mu$ lのTE bufferを加えて反応を停止させた後、-20°Cで凍結させて酵素を失活させた。この10 $\mu$ lに含まれるプラスミドDNAを適当な大腸菌(dut<sup>+</sup>, ung<sup>+</sup>; ex. HB 101, DH5 $\alpha$ , JM105)に導入し、出現したコロニーから小スケールでプラスミドDNAを調製した。変異が導入されていれば出現するはずの制限酵素サイトの有無で、求める変異を含んだ変異体DNAをまず同定した。間違いなく求める変異が導入されているかどうかはその塩基配列を決定することにより確認した。

## 2. 変異体タンパクの調製(12)

in vitro transcription-translation法により行った。前項のように作製した変異体遺伝子を含むプラスミドDNAを制限酵素BamHIで切断した。このDNA 5  $\mu$ gを40mM Tris-Cl (pH7.4), 10mM NaCl, 10mM DTT, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM spermidine, 0.5mM NTPmix溶液50 $\mu$ l中で25unitsのRNAsin(ribonuclease inhibitor)と20unitsのT7 RNAPolymeraseとともに37°Cで2時間保温した。次いでRNase-free DNaseを10units加え、さらに10分間保温してプラスミドDNAを完全に分解した。等量のフェノールで2回、フェノール-クロロホルムで1回、クロロホルムで1回それぞれ抽出後、エタノール沈殿を2回くりかえし、最終的に得られた沈殿を70%エタノールで洗った後、10 $\mu$ lのstDDWに溶解し、mRNA標品とした。このmRNA標品1  $\mu$ lを70%ウサギ網状赤血球ライゼート, 20 $\mu$ Mアミノ酸混合液(メチオニン不含), 10units RNAsin, 20 $\mu$ Ci <sup>35</sup>S-Methionine溶液25 $\mu$ l中において30°Cで60分間保温し、氷冷後50%グリセロールを6 $\mu$ l加えた。こうして調製した変異体タンパクを発現したライゼートは分注後直ちにドライアイス上で急速に凍結したのち、-70°Cで保存した。

## 3. TATA box 結合活性の検出(4)

ゲルシフト法により行った。まず、アデノウイルス2型主要後期遺伝子のTATA boxを含むAvaII-RsaI DNA断片189bpを2%アガロースゲルから切り出して精製した。この精製したDNA断片250ngを50mM Tris-Cl(pH7.8), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 80 $\mu$ M dGTP, 80 $\mu$ M TTP溶液50 $\mu$ l中において100 $\mu$ Ciの $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPと4unitsのKlenow fragmentとともに室温で15分間放置した。次いで2mM dATP, dCTPをそれぞれ2 $\mu$ l加え、さらに室温で15分間放置した。これをフェノール-クロロホルムで1回抽出した後、Yeast tR

NAを10 $\mu$ g加えてSephadexG50カラムによるゲルろかをおこない、標識されたDNA断片を未反応のヌクレオチドと分離した。こうして調製したDNA断片1ng(10000-30000cpm)と変異体タンパクを発現したライゼー  
ト0.5 $\mu$ lを12mM Tris-Cl (pH7.9 at 4 $^{\circ}$ C), 40mM Hepes(pH8.4), 4mM MgCl<sub>2</sub>,  
0.12mM EDTA, 6mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.12mg/ml BSA, 12% Glycerol, 60m  
M KCl溶液25 $\mu$ l中において、キャリアーとして100ngのpoly dG-dCとともに  
30 $^{\circ}$ Cで40分間保温した。このとき、標識したDNA断片は最後に  
加えた。このうち20 $\mu$ lを4% Acrylamide-bis(60:1), 5% Glycerol, 25mM T  
ris, 190mM Glycine, 1mM EDTA, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM DTTよりなるポリアクリ  
ルアミドゲルにアプライし、電極バッファーに25mM Tris, 190mM Glycin  
e, 1mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>を用いて、120V定電圧で3時間泳動した。この  
ゲルを減圧下乾燥させ、オートラジオグラムをとった。

#### 4. 核抽出液の調製(50)

すべての操作は4 $^{\circ}$ Cでおこなった。2 $\times$ 10<sup>10</sup>個のHeLa細胞をPBSで1度  
洗った後、400mlのHypotonic Buffer(10mM Tris-Cl (pH7.3 at 4 $^{\circ}$ C), 10  
mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1mM PMSF)に懸濁し、15  
00g, 5分間遠心した。沈殿に細胞の1/4量のHypotonic Bufferを加え、  
氷上に10分間放置した後、Dunce homogenizer(B pestle)で15ストローク  
ホモゲナイズし、3000g, 15分間遠心した。この沈殿に、沈殿の半量の  
20mM Tris-Cl(pH7.3 at 4 $^{\circ}$ C), 20mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 10mM  $\beta$   
-Mercaptoethanol, 25% Glycerol, 1mM PMSF溶液を加え、Dunce homogeni  
zer(B pestle)で6ストロークホモゲナイズした。これをおだやかに攪  
拌しながら、沈殿の半量の20mM Tris-Cl(pH7.3 at 4 $^{\circ}$ C), 1.2M KCl, 1.5mM  
MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 25% Glycerol, 1mM PMSF溶

液を約30分をかけて滴下した。さらに30分間攪拌後、20000g, 30分間遠心し、上清を20mM Tris-Cl(pH7.3 at4℃), 0.2mM EDTA, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 1mM PMSF溶液中で透析した。なお、ここで得られた沈殿は50mM Tris-Cl(pH7.9 at 4℃), 5mM  $MgCl_2$ , 0.1mM EDTA, 0.5mM DTT, 25% Glycerol, 1mM PMSF溶液20ml中でDunce homogenizer(B pestle)で20ストロークホモゲナイズしたのち液体窒素中で急速に凍結させて、-70℃で保存した(nuclear pellet)。KCl濃度が100mMに達した時点で透析を中止し、10000g, 10分間遠心したのち上清を液体窒素中で急速に凍結させた。これを核抽出液として-70℃で保存した。

#### 5. 転写活性の検出-I (1, 12, 51)

*in vitro* transcription-translation法により調製したTFIIDおよびその変異体の転写活性は以下のようにして検出した。まず核抽出液を47℃で15分間保温してTFIID活性を欠失した核抽出液(heat treated nuclear extract)を調製した。このheat treated nuclear extract 7  $\mu$ lにTFIIDもしくはその変異体を発現させたライゼート 8  $\mu$ lを加え、これにNTPmix(final 0.5mM), HEPES(pH8.4)(final 24mM),  $MgCl_2$ (final 9.6 mM), KCl(final 60mM), Glycerol(final 12%)、さらにアデノウイルス2型主要後期遺伝子の-259から+536までを含んだプラスミドpMLH1を0.5  $\mu$ gをそれぞれ加え、最終容量を25  $\mu$ lとした。これを30℃で60分間保温したのち、Stop buffer(150mM sodium acetate(pH6.0), 10mM EDTA, 0.5% SDS, 180  $\mu$ g/ml yeast tRNA)75  $\mu$ lを加えて反応を停止させた。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出をおこなったのち、アデノウイルス2型主要後期遺伝子の+25から+54までとハイブリダイズできる、5'末端を $^{32}P$ で標識したオリゴDNAを0.2ng ( $3 \times 10^5$  cpm)加えてエタノール沈

殿をおこなった。沈殿を70%エタノールで洗った後、40mM Tris-Cl(pH7.4), 400mM NaCl, 1mM EDTA, 0.2% SDS溶液30 $\mu$ lに溶解し、これを90°Cで3分間保温したのち37°Cで12時間保温した。エタノール沈殿をおこない、その沈殿を70%エタノールで洗った後、50mM Tris-Cl(pH8.3), 75mM KCl, 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.5mM dNTPmix, 75 $\mu$ g/ml Actinomycin D溶液50 $\mu$ lに溶解し、AMV reverse transcriptase 10unitsを加え、42°Cで60分間保温した。エタノール沈殿を2回繰り返したあと、10 $\mu$ lのFA dyeに溶解し、95°Cで5分間保温したのち氷中で急冷した。これを7M Urea-12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ゲルを減圧下で乾燥後オートラジオグラムをとった。

#### 6. RNAポリメラーゼIIの調製(52)

以下の操作はすべて4°Cでおこなった。45mlのnuclear pelletあたり50 $\mu$ lの10mg/ml Antipain, 10mg/ml Chymostatin, 10mg/ml Leupeptin, 10mg/ml Pepstatin, 1M PMSF溶液をそれぞれ加え、Dunce homogenizer(B pestle)で3ストロークホモゲナイズした後、3.8M Ammonium sulfate(pH7.9)溶液を3.8ml加えて激しく攪拌した。こうして得られた粘性の高い溶液約100mlを200ml容のビーカーにとり、Branson sonifierを用いてマイクロチップの最高出力で20秒間づつ15回超音波処理をおこなった。粘性の下がった溶液に100 $\mu$ lの10mg/ml Antipain, 10mg/ml Chymostatin, 10mg/ml Leupeptin, 10mg/ml Pepstatin, 1M PMSF溶液をそれぞれ加えよく攪拌したのちBeckman 45Tiローターで38000rpm, 90分間遠心した。上清を回収し、2倍量の50mM Tris-Cl(pH7.9), 0.5mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 25% Glycerol溶液と33 $\mu$ lの10mg/ml Antipain, 10mg/ml Chymostatin, 10mg/ml Leupeptin, 10mg/ml Pepstatin, 1M PMSF溶液をそれぞれ加えて攪拌

後、Beckman 45Tiローターで38000rpm, 60分間遠心した。上清を回収し、これをおだやかに攪拌しながら10% Polyethyleneimineを終濃度0.25%になるよう滴下し、さらに15分間攪拌した。この溶液をBeckman 45Tiローターで30000rpm, 20分間遠心し、沈殿を回収した。nuclear pellet 540ml分の沈殿を0.25M Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED buffer(50mM Tris-Cl(pH7.9), 0.1mM EDTA, 0.5mM DTT, 25% Glycerol)170mlにDunce homogenizer(B pestle)を用いて溶解し、30分間攪拌したのちBeckman 45Tiローターで30000rpm, 20分間遠心し、上清を回収した。上清をおだやかに攪拌しながら、その3倍量の3.8M Ammonium sulfate(pH7.9)溶液を、次いでstDDWを30ml加え、さらに30分間攪拌した。Beckman 45Tiローターで38000rpm, 90分間遠心して得られた沈殿をTGED bufferにAmmonium sulfateの濃度が500mMになるようにDunce homogenizer(B pestle)を用いて溶解し、これをおだやかに攪拌しながら1/5量の36%PEG溶液を加え、さらに20分間攪拌した。この溶液をBeckman 45Tiローターで13000rpm, 10分間遠心して上清を回収し、これにTGED bufferをAmmonium sulfateの濃度が100mMになるように加え、さらにBeckman 45Tiローターで35000rpm, 30分間遠心した。こうして得られた上清を、0.1M Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで平衡化したDEAE-cellulose DE52カラム(40ml)にアプライし、0.3M Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで溶出した。タンパク濃度を測定し、そのpeak fractionを集め、これにTGED bufferをAmmonium sulfateの濃度が80mMになるように加えた。これをただちに80mM Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで平衡化したDEAE-Sephadex A25カラム(20ml)にアプライし、0.25M Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで溶出した。タンパク濃度を測定し、そのpeak fractionを集め、これにTGED bufferをAmmonium sulfate

の濃度が50mMになるように加えた。これをただちに50mM Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで平衡化したphospho-cellulose P11カラム(4ml)にアプライし、0.2M Ammonium sulfate(pH7.9)を含むTGED bufferで溶出した。タンパク濃度を測定し、そのpeak fractionを集め、これにTGED bufferをAmmonium sulfateの濃度が100mMになるように加え、分注したのち急速にドライアイス上で凍結させ、 $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。これをRNAポリメラーゼII標品として使用した。

### 7. 基本的転写因子の調製(23)

概略を図29に示す。すべての操作は $4^{\circ}\text{C}$ でおこなった。核抽出液約500mlを、0.1M KClを含むbuffer C(20mM Tris-Cl(pH7.9 at  $4^{\circ}\text{C}$ ), 0.2mM EDTA, 10mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.5mM PMSF)で平衡化したP11カラム(120ml)にアプライした。これを順に0.3M KClを含むbuffer C(360ml)、0.5M KClを含むbuffer C(300ml)、0.85M KClを含むbuffer Cで溶出した。タンパク濃度を測定してそれぞれpeak fractionを回収し、0.05M KClを含むbuffer Cに対して透析し、KCl濃度を100mMに調整した。P11-0.5M KCl画分を、0.1M KClを含むbuffer Cで平衡化したDE52カラム(50ml)にアプライし、素通り画分(P11(0.5)-DE52(0.1))と0.3M KClを含むbuffer Cで溶出するタンパク画分(P11(0.5)-DE52(0.3))とを回収した。素通り画分(P11(0.5)-DE52(0.1))を0.1M KClを含むbuffer Cで平衡化したsingle strand DNA agarose(15ml)カラムにアプライし、0.1Mから0.5MまでのKCl濃度勾配をもつbuffer Cで溶出した。転写活性を測定し、その活性画分を回収して、0.05M KClを含むbuffer Cに対して透析し、KCl濃度を100mMに調整した。これをTF II B画分として、分注後急速にドライアイス上で凍結させ、 $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。タンパク画分(P11(0.5)-DE52(0.3))

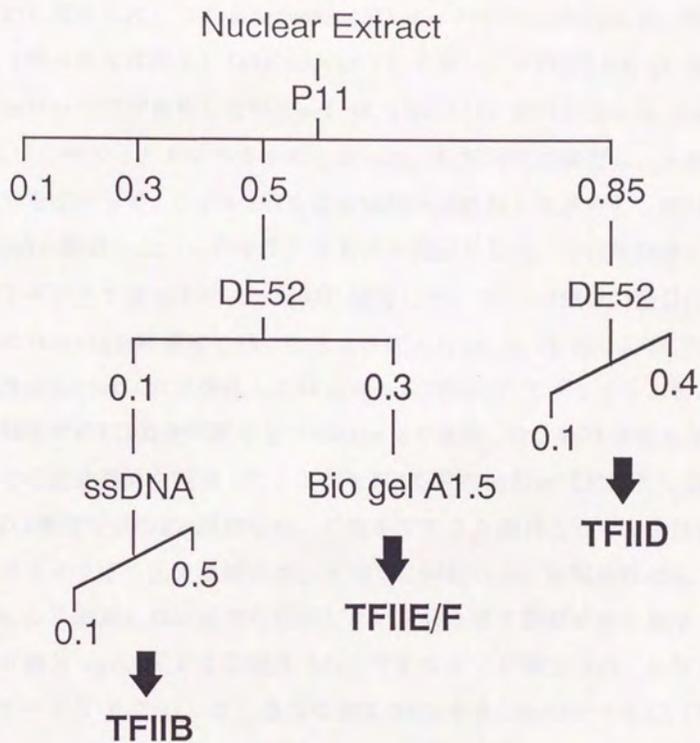


図 29 基本的転写因子の調製法

数字は溶出に用いた KCl の濃度 (M) を示す。水平な線はステップでの溶出を、傾きのある線は濃度勾配をかけての溶出をあらわす。

)には、3倍量の3.8M Ammonium sulfate(pH7.9)溶液を加え、1時間おだやかに攪拌した。これをBeckman 45Tiローターで30000rpm, 60分間遠心して得られた沈殿を1.8mlのbuffer Cに溶解し、その2/3を0.4M KClを含むbuffer Cで平衡化したBio gel A1.5(mesh200-400)カラム(1.5cm×60cm)にアプライし、ゲルろかをおこなった。転写活性を測定し、その活性画分を回収して、0.05M KClを含むbuffer Cに対して透析し、KCl濃度を100mMに調整した。これをTFII E/F画分として、分注後急速にドライアイス上で凍結させ、-70°Cに保存した。P11-0.85M KCl画分は、これにTween40を終濃度0.1%になるよう加えた後、0.1M KCl, 0.1% Tween 40を含むbuffer Cで平衡化したDE52カラム(15ml)にアプライし、0.1Mから0.4MまでのKCl濃度勾配をもつbuffer Cで溶出した。転写活性を測定し、その活性画分を回収して、0.05M KClを含むbuffer Cに対して透析し、KCl濃度を100mMに調整した。これをTFII D画分として、分注後急速にドライアイス上で凍結させ、-70°Cに保存した。転写活性は以下のようにして測定した。活性を測定したい画分と既に調製済みの画分(TFII B画分 2 $\mu$ l、TFII D画分 1 $\mu$ l、TFII E/F画分 2 $\mu$ l、RNAポリメラーゼII 0.25 $\mu$ l)に、適当な濃度のKClを含むbuffer Cを10.75 $\mu$ l加え、KCl濃度を100mMに調整した。これにMichél's mix(500 $\mu$ M ATP, 500 $\mu$ M UTP, 125 $\mu$ M CTP, 200mM Hepes(pH 8.4), 40mM MgCl<sub>2</sub>)を5 $\mu$ l、1M DTTを0.14 $\mu$ l、2.5mM 3'-o-methyl GTPを0.5 $\mu$ l、RNasin(40units/ $\mu$ l)を0.02 $\mu$ l、RNaseT<sub>1</sub>(5units/ $\mu$ l)を0.03 $\mu$ l、pMLC<sub>2</sub>ATを1 $\mu$ g、 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP(3000Ci/mM; 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)を0.5 $\mu$ lそれぞれ加え、stDDWを加えて全量を25 $\mu$ lにした。これを30°Cで45分間保温し、このうちの20 $\mu$ lをおよそ1cm径のDE81 paper上にスポットした。これを0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>で2分間づつ5回、蒸留水で1回、エタノールで1回洗浄し、赤外線ランプで乾燥させた。このDE81 paper

上にのこったカウントを液体シンチレーターで測定し、その値から活性を算出した。

#### 8. 大腸菌による組み換え体タンパクの生産(22)

T7 RNAポリメラーゼを用いた方法を使っておこなった。変異体遺伝子を制限酵素NdeIとBamHIで切断し、これをpET3aのNdeI-BamHIサイトに導入した。これを大腸菌株BL21(LysS)に導入し、得られた新鮮なコロニーを50mlのプラスチックチューブに入った5mlのM9TB培地(1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 選択薬剤として20 µg/mlのAmpicilineを含む)に移し、37°Cで6-9時間激しく振とうした。この菌液がわずかに濁ったところ(OD<sub>595</sub> ~ 0.1)で1mlの50% Glycerolを加えてよく攪拌した後、分注して-70°Cで保存した(Glycerol stock)。このGlycerol stock 200 µlを500mlのM9TB培地に移し、激しく振とうしながら30°Cで保温した。OD<sub>595</sub>が0.7から1.0のあいだにIPTGを終濃度0.4 mMになるよう加えたのち、さらに30°Cで3時間保温した。以下の操作はすべて4°Cでおこなった。菌液を氷上に30分間放置して冷却後、2000gで5分間遠心して菌体を回収した。これを20mM Tris-Cl(pH7.9 at 4°C), 20mM NaCl溶液で洗浄後50mlプラスチックチューブに移し、20mM Tris-Cl(pH7.9 at 4°C), 500mM NaCl, 50mM β-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin溶液を全量で10mlになるように加え、よく懸濁した。これをBranson sonifierを用いてマイクロチップのレベル2で30秒間づつ15回超音波処理をおこなった。溶液のOD<sub>595</sub>がもとの10%以下になっていることを確認後、NP40を終濃度0.1%になるように加え、10分間おだやかに攪拌した。これを10000gで30分間遠心して上清を回収し、これを組み換え体TFIIDまたはその変異体を含んだ大

腸菌ライゼートとして、分注後急速にドライアイス上で凍結させ、 $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。

### 9. 転写活性の検出 - II (23)

組み換え体 T F II D およびその変異体の転写活性は以下のようにして観察した。組み換え体 T F II D またはその変異体を含んだ大腸菌ライゼートを  $0.2\text{M KCl}$ ,  $0.2\text{mg/ml BSA}$  を含む buffer C で 20 倍に希釈した。この  $1\mu\text{l}$  に T F II B 画分  $2\mu\text{l}$ 、T F II D 画分  $1\mu\text{l}$ 、T F II E / F 画分  $2\mu\text{l}$ 、RNA ポリメラーゼ II  $0.25\mu\text{l}$  と  $0.1\text{M KCl}$ ,  $0.2\text{mg/ml BSA}$  を含む buffer C を  $10.75\mu\text{l}$  加え、これに Michél's mix ( $500\mu\text{M ATP}$ ,  $500\mu\text{M UTP}$ ,  $125\mu\text{M CTP}$ ,  $200\text{mM Hepes}$  (pH 8.4),  $40\text{mM MgCl}_2$ ) を  $5\mu\text{l}$ 、 $1\text{M DTT}$  を  $0.14\mu\text{l}$ 、 $2.5\text{mM } 3'\text{-o-methyl GTP}$  を  $0.5\mu\text{l}$ 、RNasin ( $40\text{units}/\mu\text{l}$ ) を  $0.02\mu\text{l}$ 、pMLCA<sub>2</sub>T を  $1\mu\text{g}$ 、 $\alpha\text{-}^{32}\text{P-CTP}$  ( $3000\text{Ci}/\text{mM}$ ;  $10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) を  $0.5\mu\text{l}$  それぞれ加え、stDDW を加えて全量を  $25\mu\text{l}$  にした。これを  $30^{\circ}\text{C}$  で 60 分間保温したのち、Stop buffer  $75\mu\text{l}$  を加えて反応を停止させた。フェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出をおこなったのち、エタノール沈殿をおこなった。この沈殿を  $20\mu\text{l}$  の FA dye に溶解し、これを  $90^{\circ}\text{C}$  で 5 分間保温したのち、水中で急冷した。これを  $7\text{M Urea}$ -5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、ゲルを減圧下で乾燥後オートラジオグラムをとった。

## 参 考 文 献

1. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity and TATA box-promoter interactions of TFIIID  
Nakajima, N., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.  
Mol. Cell. Biol. 8 4028-4040 (1988)
2. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins  
Breathnach, R. and Chambon, P.  
Annu. Rev. Biochem. 50 349-383 (1981)
3. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II  
Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A. and Roeder R.G.  
J. Biol. Chem. 255 11992-11996 (1980)
4. Purification of a yeast TATA box-binding protein that exhibits human transcription factor IID activity  
Horikoshi, M., Wang, C.K., Fujii, H., Cromlish, J.A., Weil, P.A. and Roeder R.G.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 4843-4847 (1989)
5. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Identification of general transcription factor TFIIIG  
Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Yamamoto, T., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 9158-9162 (1990)
6. Separation and partial characterization of three functional steps in transcription initiation by human RNA polymerase II  
Hawley, D.K. and Roeder R.G.  
J. Biol. Chem. 260 8163-8172 (1985)
7. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II  
Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A. and Guarante, L.  
Cell 56 549-561 (1989)
8. Mechanism of RNA polymerase II-specific initiation in vitro: ATP requirement and uncapped runoff transcripts  
Bunick, D., Zandomeni, R., Ackerman, S. and Weinmann, R.  
Cell 29 877-886 (1982)
9. Mechanism of action of a yeast activator: direct effect of Gal4 derivatives on mammalian TFIIID-promoter interaction  
Horikoshi, M., Carey, M.F., Kakidani, H. and Roeder R.G.  
Cell 54 665-669 (1988)

10. Transcription factor ATF interacts with TATA factor to facilitate establishment of a preinitiation complex  
Horikoshi, M., Hai, T., Lin, Y.-S., Green, M.R. and Roeder R.G.  
*Cell* 54 1033-1042 (1988)
11. Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system  
Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A. and Guarante, L.  
*Nature* 337 37-42 (1989)
12. Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIIID that binds TATA box  
Horikoshi, M., Wang, C.K., Fujii, H., Cromlish, J.A., Weil, P.A. and Roeder R.G.  
*Nature* 341 299-303 (1989)
13. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins  
Johnson, P.F. and McKnight, S.L.  
*Annu. Rev. Biolchem.* 58 799-839
14. How eukaryotic transcriptional activators work  
Ptashne, M.  
*Nature* 335 683-689 (1988)
15. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins  
Mitchell, P.J. and Tjian, R.  
*Science* 245 371-378
16. A new class of yeast transcriptional activators  
Ma, J. and Ptashne, M.  
*Cell* 51 113-119 (1987)
17. A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor  
Cavallini, B., Huet, J., Plassat, J.-L., Sentenac, A., Egly, J.-M. and Chambon, P.  
*Nature* 334 77-80 (1988)
18. Cloning of the gene encoding the yeast protein BTF1Y, which can substitute for the human TATA box-binding factor  
Cavallini, B., Faus, I., Matthes, H., Chipoulet, J.M., Winsor, B., Egly, J.-M. and Chambon, P.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 9803-9807 (1989)
19. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection  
Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour R.A.  
*Meth. Enzymol.* 154 367-382 (1987)

- 20.5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics  
Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. and Fink, G.R.  
Meth.Enzymol. 154 164-175 (1987)
- 21.GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA  
Hope, I.A. and Struhl K.  
EMBO J. 6 2781-2784 (1987)
- 22.Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes  
Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W.  
Meth.Enzymol. 185 60-89 (1990)
- 23.Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II : Analysis by a rapid and quantitative in vitro assay  
Sawadogo, M. and Roeder R.G.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82 4394-4398 (1985)
- 24.Arabidopsis thaliana contains two genes for TFIIID  
Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Chua, N.-H.  
Nature 346 390-394 (1990)
- 25.A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD and myc proteins  
Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D.  
Cell 56 777-783 (1989)
- 26.The relationship between the "TATA" sequence and transcription initiation site at the HIS4 gene Saccharomyces cerevisiae  
Nagawa, F. and Fink, G.R.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82 8557-8561
- 27.A downstream initiation element required for efficient TATA box binding and in vitro function of TFIIID  
Nakatani, Y., Horikoshi, M., Brenner, M., Yamamoto, T., Francois B., Roeder, R.G. and Freese E.  
Nature 348 86-88 (1990)
- 28.Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to TATA box factor TFIIID  
Stringer, K.F., Ingles, J.C. and Greenblatt J.  
Nature 345 783-786 (1990)
- 29.Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor  
Lee, W.S., Kao, C.C., Bryant, G.O., Liu, X. and Berk, A.J.  
Cell 67 365-376 (1991)

30. Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* TFIIID gene reveals a strong conservation of functional domains present in *Saccharomyces cerevisiae* TFIIID  
Hoffmann, A., Horikoshi, M., Wang, C.K., Schroeder, S., Weil, P.A. and Roeder, R.G.  
*Genes Dev.* 4 1141-1148 (1990)
31. cDNA clone encoding *Drosophila* transcription factor TFIIID  
Munich, M.L., Iida, C.T., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Parker, C.S.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 9148-9152
32. Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIIID)  
Hoffmann, A., Sinn, E., Yamamoto, T., Wang, J., Roy, A., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.  
*Nature* 346 387-390 (1990)
33. Cloning of a human gene encoding the general transcription initiation factor II<sub>B</sub>  
Ha, I., Lane, W.S. and Reinberg, D.  
*Nature* 352 689-695 (1991)
34. Binding of general transcription factor TFII<sub>B</sub> to an acidic activating region  
Lin, Y.-S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D. and Green, M.  
*Nature* 353 569-571 (1991)
35. Molecular Cloning: A laboratory manual  
Sambrook, J., Fritsch, F. and Maniatis, T.  
Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory (1989)
36. 変異体 DNA の作製  
山本 融  
生物学実験講座 V : 遺伝子  
広川書店 印刷中
37. Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions  
Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A. and Guarente, L.  
*Cell* 58 1173-1181 (1989)
38. Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences  
Davidson, B., Egly, J.-M., Mulvihill, E.R. and Chambon, P.  
*Nature* 301 680-686 (1983)
39. Compilation of transcription regulation proteins  
Wingender, E.  
*Nuc. Acid Res.* 16 1879-1902 (1988)

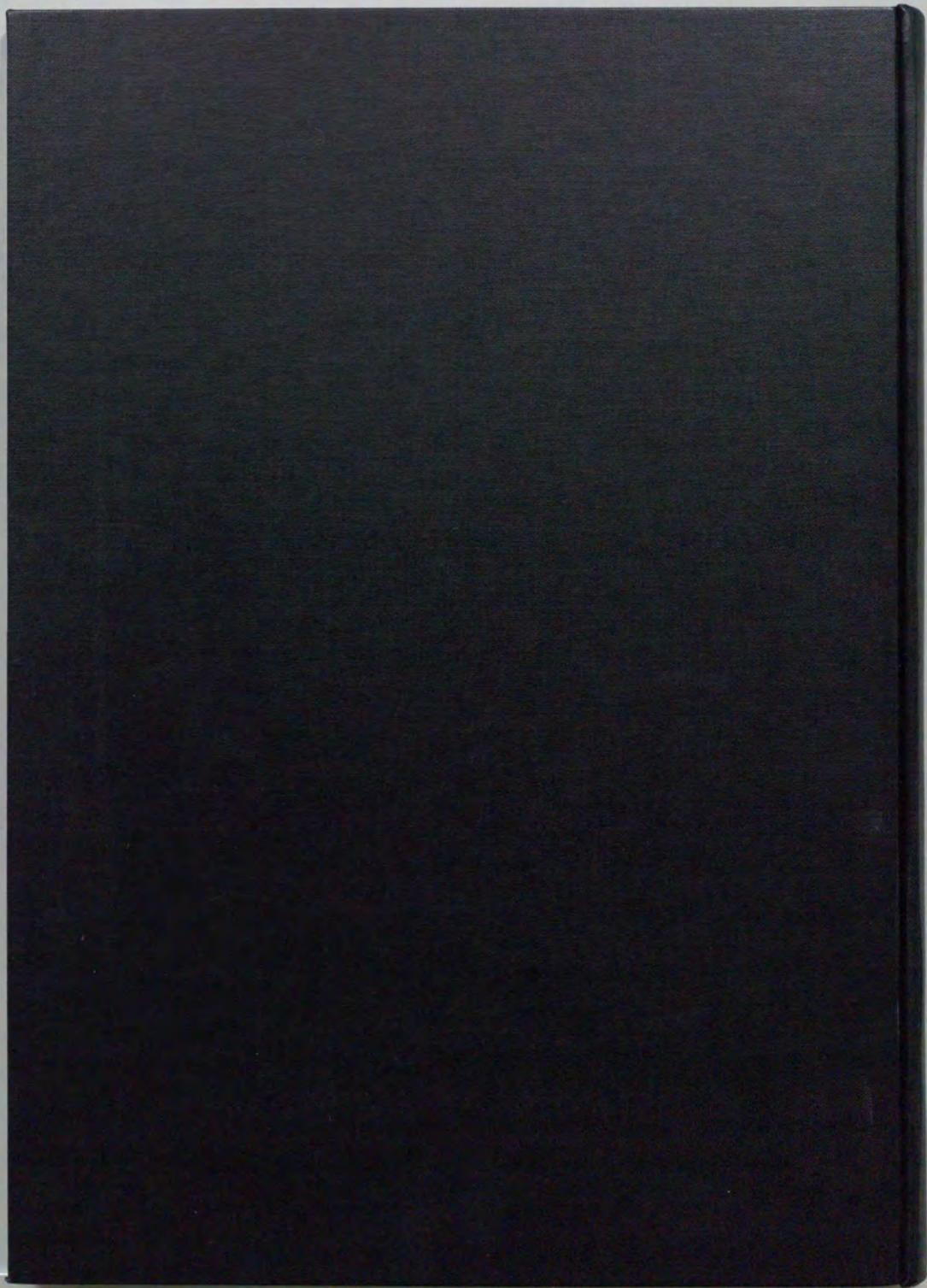
40. Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses  
 Jons, N.C., Rigby, P.W.J. and Ziff, E.B.  
*Genes Dev.* 2 267-281 (1988)
41. Yeast TATA-box transcription factor gene  
 Schmidt, M.C., Kao, C.C., Pei, R. and Berk, A.J.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 7785-7789 (1989)
42. Striking conservation of TFIIID in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*  
 Fikes, J.D., Becker, D.M., Winston, F. and Guarente, L.  
*Nature* 346 291-294 (1990)
43. The Complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly  
 Roeder, R.G.  
*TIBS* 16 402-408 (1991)
44. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: Purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IJ  
 Cortes, P., Flores, O. and Reinberg, D.  
*Mol. Cell. Biol.* 12 413-421 (1992)
45. Structure and functional properties of human general transcription factor IIE  
 Peterson, M.G., Inostroza, J., Maxon, M.E., Flores, O., Admon, A., Reinberg, D. and Tijian, R.  
*Nature* 354 369-373 (1991)
46. Structural motifs and potential  $\sigma$  homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIIE  
 Ohkuma, Y., Sumimoto, H., Hoffmann, A., Shimasaki, S., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.  
*Nature* 354 398-401 (1991)
47. Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIIE  
 Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Sinn, E., Kato, H., Shimasaki, S., Horikoshi, M. and Roeder, R.G.  
*Nature* 354 401-404 (1991)
48. Transcriptional activation by Sp1 as a directed through TATA or initiator : Specific requirements for mammalian transcription factor IID  
 Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J. and Baltimore, D.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 4509-4513 (1990)

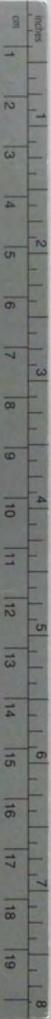
49. Transcription from TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex  
Pugh, B.F. and Tjian, R.  
Genes Dev. 5 1935-1945 (1991)
50. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei  
Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G.  
Nuc. Acid Res. 5 1475-1489 (1983)
51. Engrailed, a homeodomain protein can repress in vitro transcription by competition with the TATA box-binding protein transcription factor IID  
Ohkuma, Y., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Desplan, C.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 2289-2293 (1990)
52. Bitter, G.A.  
Anal. Biochem. 128 294-301 (1983)

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、常に厳しくも温かい御指導・御助言を賜りました東京大学薬学部名取俊二教授に深く感謝いたします。また、海外の第一線の研究室で仕事をするという得難い機会を与えてくださいました東北大学抗酸菌病研究所帯刀益夫教授に心から感謝いたします。そして、どこの馬の骨ともわからない一介の大学院生を受け入れてくださったロックフェラー大学 Robert G. Roeder 教授に深く感謝いたします。また、時にあたって適切な助言を惜しまれなかった東京大学薬学部関水久助教授をはじめとする微生物薬品化学教室の皆様、並びに東北大学抗酸菌病研究所黒岩厚助教授をはじめとする細胞生物学研究部門の皆様、また、Alexander Hoffmann君をはじめとするロックフェラー大学生化学・分子生物学研究室の皆様にも深く感謝いたします。末尾になりましたが、本研究を進めるにあたり直接御指導いただいたのみならず、公私にわたりあらゆる場面で叱咤激励をいただいたロックフェラー大学堀越正美助教授御夫妻に心より深く感謝申し上げます。そして、ここに記した方々からの有形、無形の御指導にあらためて感謝の念と、また、堀越助教授のあくなきバイタリティーに深い尊敬の念とを記して本稿を終えさせていただきます。ありがとうございました。

山本 融





### Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
Blue patch	Cyan patch	Green patch	Yellow patch	Red patch	Magenta patch	White patch	3/Color patch	Black patch

### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

