

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	転写伸長反応を抑制する因子群の同定と解析
Title(English)	
著者(和文)	山口雄輝
Author(English)	Yuki Yamaguchi
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第4077号, 授与年月日:1999年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第4077号, Conferred date:1999/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

転写伸長反応を抑制する因子群の  
同定と解析

東京工業大学生命理工学研究科  
バイオテクノロジー専攻

平成九年度入学 学籍番号 97D23194  
山口 雄輝

指導教官 半田 宏  
永田 恭介

## 目次

第1章 序論	
1.1 緒言	1
1.2 本研究の背景	2
1.2.1 転写反応の基本メカニズム	2
1.2.2 転写反応の制御メカニズム	3
1.2.3 転写阻害剤 DRB	4
1.2.4 新規転写伸長因子 DSIF の発見	5
1.3 本研究の目的	6
1.4 本論文の構成	7
図表	9
第2章 新規転写伸長因子 DSIF の構造と機能	
2.1 緒言	18
2.2 材料と方法	19
2.2.1 DSIF p160 の cDNA クローニング	19
2.2.2 プラスミドの構築	20
2.2.3 大腸菌組換え p160 および p14 の調製	21
2.2.4 p160 と p14 の相互作用の解析	22
2.2.5 in vitro 転写反応	23
2.2.6 トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ	23
2.2.7 GFP と蛍光顕微鏡	24
2.2.8 細胞周期の同調	24
2.3 結果と考察	26
2.3.1 DSIF サブユニット cDNA の単離	26
2.3.2 DSIF p160 と p14 の相互作用	27
2.3.3 p160 と RNA ポリメラーゼ II との相互作用	28
2.3.4 DSIF 活性に必要な構造領域の決定	29
2.3.5 p160 ドミナントネガティブ変異体の単離	30
2.3.6 DSIF の細胞内機能	32
2.3.7 p160 の発現パターン	32
2.3.8 細胞周期依存的な p160 のリン酸化	33
2.4 まとめ	35
図表	36

第3章 新規転写伸長因子 NELF の同定と精製	
3.1 緒言	54
3.2 材料と方法	56
3.2.1 転写因子と pol II の調製	56
3.2.2 in vitro 転写再構成系	57
3.2.3 NELF の精製	57
3.2.4 オリゴ dC テンプレートを用いた転写反応	58
3.3 結果と考察	59
3.3.1 組換え転写因子の調製	59
3.3.2 DRB の効果を示す in vitro 転写再構成系の確立	59
3.3.3 新規転写伸長因子 NELF の精製	60
3.3.4 NELF と DSIF による協調的な伸長抑制	62
3.3.5 pol II CTD のリン酸化による抗抑制	62
3.4 まとめ	64
図表	65
第4章 NELF の構造と機能	
4.1 緒言	80
4.2 材料と方法	81
4.2.1 NELF-E の cDNA クローニング	81
4.2.2 抗 RD 抗体の調製	81
4.2.3 RD のイムノディプリーション	81
4.2.4 Flag-NELF の調製	82
4.3 結果と考察	84
4.3.1 NELF-E cDNA の単離	84
4.3.2 抗 RD 抗体を用いた解析	84
4.3.3 Flag-NELF の免疫精製	85
4.3.4 NELF のイムノディプリーション	86
4.3.5 NELF サブユニットの要求性	87
4.3.6 NELF と他の因子との相互作用	88
4.4 まとめ	90
図表	91
第5章 総括	
5.1 緒言	102
5.2 新規転写伸長因子 DSIF	103

5.2.1 p160 の構造	103
5.2.2 DSIF の細胞内機能	104
5.3 新規転写伸長因子 NELF	105
5.3.1 モデル	105
5.3.2 負の伸長因子	105
5.3.3 CTD リン酸化の機能的役割	106
5.3.4 NELF の構造	107
5.4 医学・工学的展望	109
図表	111
参考文献	112
謝辞	119

# 第1章 序論

## 1.1 緒言

転写反応が、遺伝子発現の要であることは疑う余地もないだろう。セントラルドグマの最初のステップ、DNAより mRNA を合成する反応は、それ以降のどのステップよりも広いダイナミックレンジを持つ。近年の分子生物学の発展とともに、多くの生命現象が転写因子の言葉で記述されるようになってきた (図 1.1)。個体の初期発生、形態形成、器官形成は転写因子の独壇場である。ホメオボックスを持つ転写調節因子群がヒエラルキーを形成し、一個の受精卵から複雑な構造を導き出す担い手となっている。個体の形成後には、転写因子はシグナル伝達系の最下流として、ホメオスタシスの維持に不可欠な役割を果たす。外界の多様なストレスやウイルスの感染から身を守り、ホルモンや血糖値に応答して遺伝子発現を調節する。細胞周期、遺伝病、記憶、老化、癌発生との関わりも深く、まさに生物の一生を支配しているといっても過言ではないだろう。

他の生命現象にも繰り返しみられるように、転写反応には基本的な装置と、それを制御する装置とが存在する。10 万種類にのぼる遺伝子を時間的、空間的に適切に制御するために、複雑かつ巧妙なメカニズムが存在することは想像に難くない。本研究では、その最も基本となる転写反応の素過程の仕組みを研究対象とした。しかし単なる反応機構論にとどまらず、それを取り巻く転写反応全体、さらにはより高次の生命現象を見据え、それらとの関係を解き明かしていくことも目指した。

## 1.2 本研究の背景

### 1.2.1 転写反応の基本メカニズム

真核細胞には3種のRNAポリメラーゼ (RNA polymerases), pol I, pol II, pol III が存在する (Woychik と Young 1994; 図 1.2)。これらは12~16個程度のサブユニットからなる巨大な酵素で、それぞれ主に rRNA, mRNA, tRNA の転写に関与している。pol I, pol III が比較的少数の遺伝子の転写を担っているのに対し、pol II はヒトの場合 10 万種類とも言われる、タンパク質をコードする遺伝子の転写を担っている。また、pol II の最大サブユニットには、C 末端側に7アミノ酸配列が数十回繰り返されたドメイン CTD (C-terminal domain) が存在し、他のポリメラーゼにないもう一つの特徴となっている。この CTD は、多様な遺伝子発現の制御、あるいは mRNA のスプライシングといった pol II 特異的な現象に関与していると考えられているが、その詳細は不明である。

図 1.3 は pol II 系転写反応の素過程を示したものである。ポリメラーゼは単独でプロモーターを認識することはできず、基本転写因子 (general transcription factors; GTFs) とよばれる一群の転写因子の助けを借りる。最初のステップとして、基本転写因子と pol II がプロモーター上に集結し、開始前複合体 (preinitiation complex; PIC) を形成する。これを転写開始前反応 (preinitiation) という。ここにヌクレオチド3リン酸が加わると、プロモーターDNA の巻き戻しが起こり、転写産物の合成とともに pol II がプロモーターから離れる。これを転写開始反応 (initiation) という。その後、pol II は何千、何万塩基と転写産物の合成を続け、最終的に DNA より離脱する。これらをそれぞれ転写伸長反応 (elongation)、転写終結反応 (termination) という。pol II の CTD は、開始反応から伸長反応にかけて高度にリン酸化されることが知られている。

次に、基本転写因子について概説したい。in vitro での転写再構成実験を通して、TF (transcription factor) IIA から H という 6 つの基本転写因子が同定された (Orphanides ら 1996; 図 1.4)。この中で、TFIIA は必ずしも転写に必須ではないことが判明している。クルードな核抽出液の代わりに、TFIIA を除く 5 つの基本転写因子と pol II を混ぜると、転写反応を再構成することができる。

これらの基本転写因子の中で TFIID はプロモーターの TATA box を認識し、中心的な役割を果たしている。TFIID は TBP (TATA-binding protein) という中心サブユニットと、TAFs (TBP-associating factors) という 10 個程度の補助サブユニットからなる巨大な複合体である。基本転写反応には TBP のみで十分である。TFIIB は TBP の DNA 結合を安定化し、さらに TFIIF を引き寄せる働きをする。TFIIF は開始反応にも伸長反応にも関与することが知られる唯一の基本因子である。TFIIB と相互作用し、pol II をプロモーター上に引き寄せる働きをする。TFIIE は TFIIF の活性を制御し、TFIIF をプロモーター上に引き寄せる働きをする。TFIIF は基本転写因子の中で唯一、ヘリカーゼ活性やキナーゼ活性といった酵素活性を有しており、プロモーター DNA の巻き戻しに関与している可能性がある。

### 1.2.2 転写反応の制御メカニズム

数十万種類におよぶ遺伝子の転写を時間的、空間的に適切に制御するのは、これらとは異なる種類の、遺伝子特異的な転写調節因子 (transcription regulatory factors) である (図 1.3)。これらの因子は転写反応素過程の律速段階に働きかけ、転写を促進あるいは抑制すると考えらるが、これまでその標的は転写開始前反応であると一般に信じられていた。転写調節因子は、基本転写因子あるいは pol II と直接または間接的に相互作用し、これらをプロモーター上に引き寄せることで、開始前複合体の形成を促進すると考えられてきたのである。

しかし開始反応は転写のごく始まりに過ぎず、その後、数千、数万塩基と転写産物を合成する伸長反応が存在する。pol II の RNA 合成速度と遺伝子のサイズから考えると、細胞内の多くの遺伝子の転写伸長には、数十分ないしは数時間の時間が必要である。そして、もし全長の mRNA が転写されなければ、機能的なタンパク質は合成されない。従って、伸長反応は極めて重要な制御段階となり得る。

最近になり、前述のように伸長反応もまた転写制御の重要なステップであることが明らかとなってきた。第一に、普遍的に pol II の伸長反応を制御する「基本伸長因子 (general elongation factors)」が相次いで発見された (図 1.5)。TFIIF, SII, Elongin, ELL といった基本伸長因子はいずれも pol II と直接相互作用し、伸長反応を促進する



活性を有している (Uptain ら 1997; Shilatifard 1998)。これらのうち、TFIIIF は前述の通り、転写開始反応にも必須である。また、Elongin, ELL は癌遺伝子との関わりが明らかとなっており、伸長反応の制御が生物学的に重要な意味を持つことが示唆される。第二に、転写調節因子のいくつかは、実際に伸長反応をも標的としていることが報告された。つまり伸長反応は、開始反応を経たポリメラーゼが勝手に DNA 上を走り続ける反応ではなく、複雑に制御された反応であることが分かってきたのである。

### 1.2.3 転写阻害剤 DRB

この伸長反応の仕組みを解析する上で非常に有効なツールとなり得るのが、薬剤 DRB (5,6-dichloro- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole) である (Yamaguchi ら 1998)。DRB は図 1.6 に示したような構造を持つヌクレオシド類似体であり、pol II による転写反応の特異的な阻害剤として古くより知られている。DRB は pol I や pol III の転写には全く影響しない。様々な解析から、DRB は転写の伸長段階を阻害することが明らかとなっている (Chodosh ら 1989)。その構造から、ATP を消費する反応を競合的に阻害していると考えられる。興味深いことに、DRB は *in vivo* やクルードな *in vitro* 転写系においては転写を強く阻害するが、非常に精製された系では阻害効果を発揮しない (Sehgal ら 1976; Zandomeni ら 1982)。つまり DRB の標的は pol II の RNA 合成反応そのものでも基本転写因子でもなく、他の未同定な因子であると予想される。このような因子は、DRB 感受性の転写活性化因子、あるいは DRB 依存的な転写抑制因子だと想像できる。DRB はクラス II 遺伝子の転写を普遍的に阻害するので、これらの因子の働きもまた普遍的だと考えられる。

DRB はまた、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) の潜在的な治療薬としても知られている。HIV が潜伏感染した培養細胞において、DRB は HIV の増殖を強く阻害する (Chritchfield ら 1997)。HIV の転写はゲノム末端の LTR (long terminal repeat) プロモーターより開始するが、潜伏感染時には、その転写は転写開始点より 50 bp ほど下流の TAR (Tat response element) 配列で停止してしまう (Jones と Peterlin 1994; 図 1.7)。TAR は RNA エlement として働き、ステムループ構造をとって、pol II の伸長反応を阻害すると考えられる。しかし細胞が刺

激を受け、HIVにコードされたTatタンパク質が一旦発現すると、TatはこのTARに結合して伸長反応の停止を解除し、著しく転写を活性化する。すなわちTatは、遺伝子特異的な伸長促進因子とすることができる。Tatの作用機構の解明は、HIV研究の中心課題の一つである。DRBはTatによる転写活性化を打ち消す働きを示す。このことから、DRBの作用に関わる因子はまた、Tatの作用にも関与していると考えられる。

#### 1.2.4 新規転写伸長因子DSIFの発見

以上のような考察に基づき、我々はDRB依存的な転写阻害に関わる因子の探索を試みた。in vitroにおいて転写反応は、ヒトHeLa細胞の核抽出液(nuclear extract; NE)を用いて起こすことができる。この転写はDRBによって強く阻害される。この核抽出液をホスホセルロースカラム(P11)により3つの画分に分画したところ、ほとんどの基本転写因子とpol IIは1 M KCl溶出画分、P1.0に回収された(図1.8)。この画分のみを用いて転写反応を起こすことはできたが、この転写はDRBに非感受性だった(レーン1,2)。ここにさらに0.3 M溶出画分P.3を加えると、DRB感受性が回復した(レーン3,4)。このことから、P.3の中に、基本的な転写反応には不必要だが、DRB依存的な転写阻害に関与する因子が含まれていることが分かった。この単純なアッセイ系により、P.3よりDRB感受性誘導因子DSIF(DRB sensitivity-inducing factor)を精製することに成功した(Wadaら1998a)。

DSIFに関してこれまでに得られた知見を図1.9にまとめた。精製したDSIFは、160 kDa(p160)と14 kDa(p14)の2つのサブユニットから構成されていた。2つのポリペプチドを分離し、再構成する実験から、両方のサブユニットとも活性に必須であることが分かった。また、p160に対する抗体を調製し、免疫沈降を行なったところ、p160がpol IIと物理的に相互作用することが分かった。DSIFの働きはin vitroで詳細に検討され、DRB感受性を誘導するほか、条件によってはDRBによらずに転写を抑制したり、あるいは促進することが判明した(Wadaら1998a)。

### 1.3 本研究の目的

本研究の目的は、pol II の伸長反応を制御する因子群の同定と解析である。それにあたって、転写伸長阻害剤 DRB をツールとして用いた。我々は既に DRB 依存的転写阻害に関わる因子 DSIF を同定したが、この現象に他の未同定な因子が関与している可能性も考えられる。そこで、DRB の作用に関わる因子をすべからく明らかにし、DRB の作用機構を明らかにすることを一つの目標とした。

しかし DRB はあくまで非天然の化合物であり、DSIF やその他の因子は本来の生理機能を有しているはずである。これらの因子が *in vivo* で伸長反応、さらにはより高次の生命現象といかに関わっているのか興味を持ち、細胞生物学的なアプローチも試みた。

前述のように、DRB はほとんど全てのクラス II 遺伝子に作用するので、その作用に関わる因子もまた普遍的だと考えられる。DRB の解析を通して、伸長反応の新規かつ基本的な制御段階を明らかにできるだろう。また、転写伸長因子はより高次の生命現象と密接に関わっている可能性が高い。特に DRB の作用に関わる因子は HIV Tat との関連も示唆され、それらの解析は大変有意義である。工学的な視点に立てば、RNA ポリメラーゼは毎分数十から数百塩基の RNA を合成する分子モーターである。本研究によって、このモーターを正および負に自在に制御できるようになる可能性がある。

#### 1.4 本論文の構成 <sup>抑制</sup>

『転写伸長反応を抑制する因子群の同定と解析』と題した本論文は本章を含め、全5章から構成されている。

第1章「序論」では、本論文の背景を論じ、全般的な導入部とした。本研究の目的と、本論文の構成を示した。

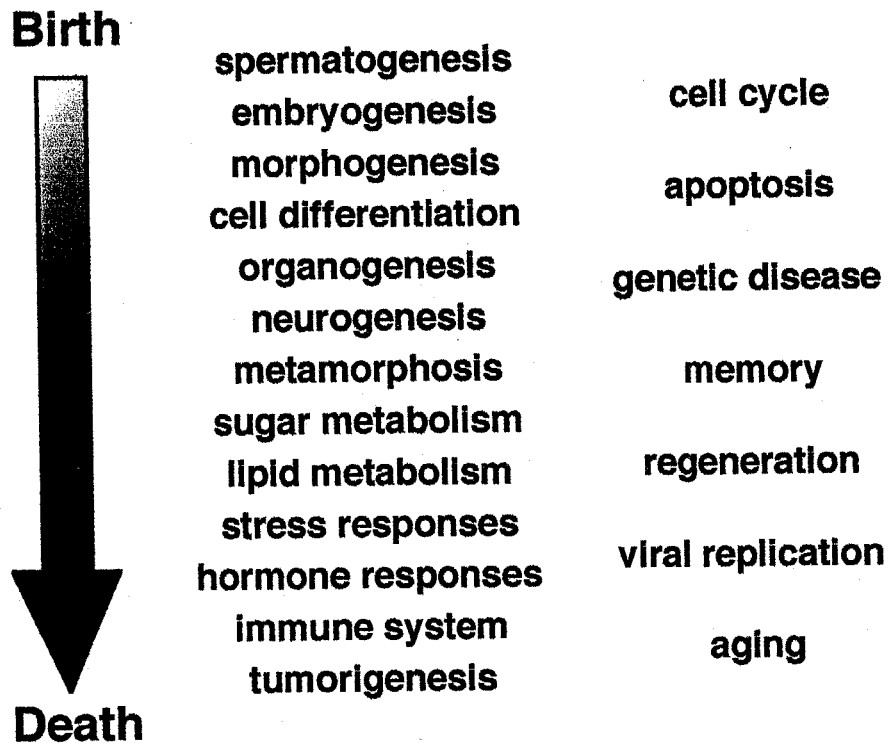
第2章「新規転写伸長因子 DSIF の構造と機能」では、DSIF の特に p160 のドメイン構造を明らかにすること、そして DSIF の細胞内機能を解析することを目的とした。DSIF は p160 と p14 という2つのサブユニットからなる。cDNA クローニングの結果、これらは酵母の転写因子 Spt5、Spt4 のヒトホモログであることが分かった。p160 と p14 は極めて安定な複合体を形成することを示し、その結合に関わる p160 のドメインを決定した。また、DSIF 活性に必要な p160 の領域を決定し、p160 のドメイン構造を明らかにした。以上の結果に基づき、ドミナント・ネガティブに作用する p160 変異体を同定した。この変異体を用いて、DSIF が *in vivo* で転写を抑制していることを明らかにした。DSIF の酵母ホモログは、染色体構造の維持に関与していることが示唆されている。そこで DSIF の発現パターンを調べたところ、p160 は核内にドット状に存在していた。また、p160 は細胞周期に依存して、分裂期に高度にリン酸化されることが分かった。これらの結果、DSIF は、酵母における遺伝学的な解析結果と一致して、染色体構造とも関係する可能性が示唆された。

第3章「新規転写伸長因子 NELF の同定と精製」では、DRB の作用機構を明らかにするため、DRB 感受性を示す *in vitro* 転写再構成系を確立し、DRB 依存的な転写阻害に関わる因子をすべからず明らかにすることを目的とした。再構成系を用いて DRB 感受性を検討した結果、DSIF とは異なる DRB 感受性誘導因子を見出し、これを NELF と名付けた。精製 NELF は5本のポリペプチドから構成されていた。DRB 感受性にはさらに別の因子 P-TEFb も必要であり、DRB の効果はこれら3つの因子に依存して誘導されることが分かった。P-TEFb は他のグループにより同定された伸長促進因子であり、pol II の CTD をリン酸化するキナーゼでもある。詳細な解析の結果、DSIF と NELF は協調的に pol II の伸長反応を抑制すること、そして CTD のリン酸化および P-TEFb がその抑制を解除することが判明した。DRB は P-TEFb の

キナーゼ活性を強く阻害することから、DRB は、DSIF と NELF による伸長抑制を P-TEFb が解除するのを阻害していると思われる。

第4章「NELF の構造と機能」では、NELF サブユニットの構造を解析するとともに、NELF の作用の分子機構を理解することを目的とした。cDNA クローニングの結果、NELF の最小サブユニットは RD という、機能不明の既知タンパク質であることが判明した。RD の抗体を作製し、RD が NELF 活性の一部を担っていることを種々の方法で確かめた。次に、NELF タンパク質の簡便な精製法を確立した。Flag タグを付加した RD を構成的に発現するような HeLa 細胞株を樹立し、Flag 抗体を用いて、その細胞溶解液より Flag-RD を含む複合体を精製した。すると、特異的かつ定量的に RD 以外の 4 つの NELF サブユニットが共精製され、NELF が細胞内で非常に安定な複合体を形成していることが分かった。また、「不完全な」NELF 複合体は活性を持たず、5 つのサブユニットが NELF 活性に重要であることが示唆された。NELF と他の因子との相互作用を検討した結果、NELF は DSIF および非リン酸化型 pol II と結合するが、リン酸化型 pol II とは結合しないことが判明した。以上の結果、CTD のリン酸化が、NELF と pol II の相互作用を制御していることが明らかとなった。

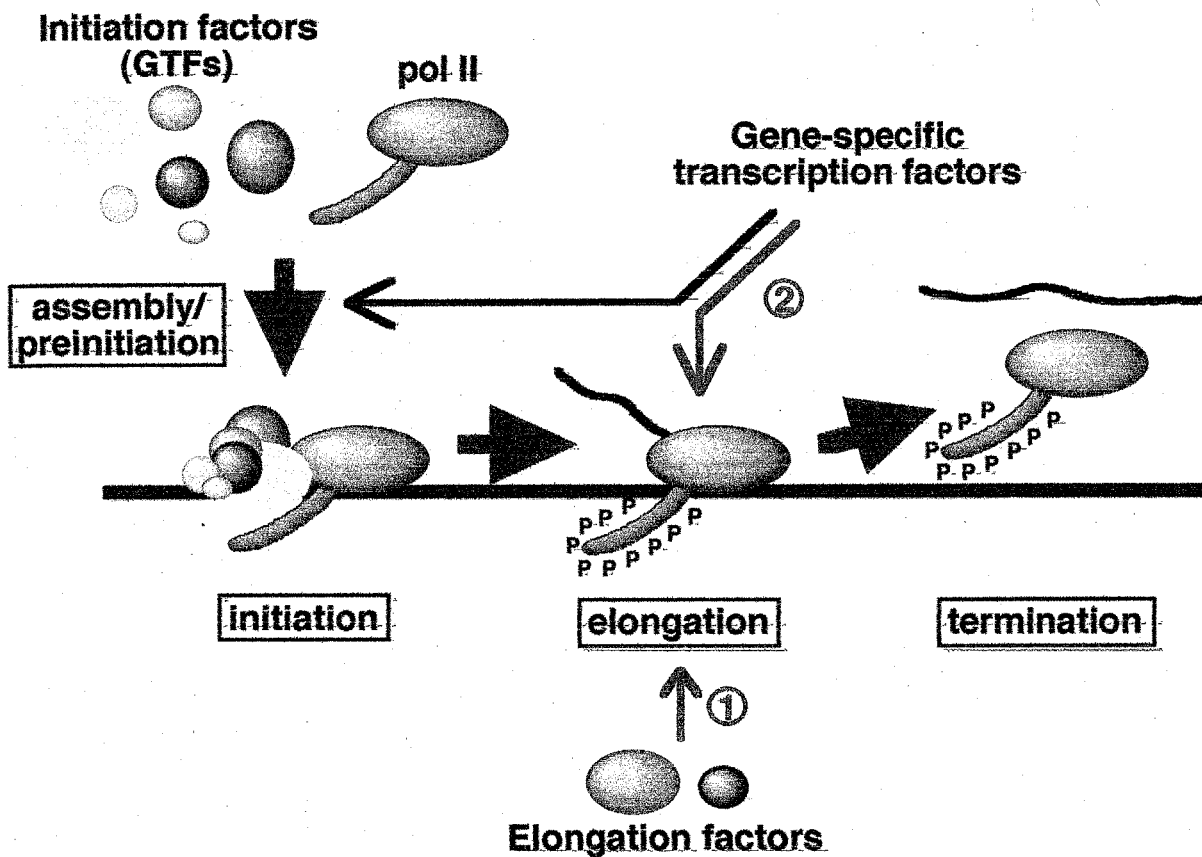
第5章「総括」では、本研究の結果をまとめ、本研究成果の重要性を論じた。また、得られた知見に基づいて、DSIF や NELF の生物学的役割について考察し、今後の展望を述べた。



**Figure 1.1** Transcription regulation plays essential roles in many biological processes. See text for the detail.

	<b>RNA polymerase I (pol I)</b>	<b>RNA polymerase II (pol II)</b>	<b>RNA polymerase III (pol III)</b>
<b>subunits</b>	14	12	16
<b>target genes</b>	1 (18S, 5.8S, 28S rRNA)	~100,000 (protein- encoding genes)	>100 (tRNAs & 5S rRNA)
<b>features</b>		The largest subunit has the repetitive C-terminal domain (CTD)	

**Figure 1.2 Eukaryotic RNA polymerases.** Eukaryote has three different RNA polymerases, namely pol I, pol II and pol III. They are composed of 12-16 subunits and are responsible for transcription of rRNA, mRNA and tRNA genes respectively. The largest subunit of pol II has the unique C-terminal domain (CTD), which contains a heptapeptide sequence repeated 26 times in yeasts and 52 times in humans.



**Figure 1.3 Basic mechanism of transcription by RNA polymerase II. Transcription reaction consists of distinct steps called preinitiation, initiation, elongation and termination. Preinitiation has long been regarded as the most important regulatory step. However, recent studies indicate that elongation step also plays a critical role.**



	subunit(s)	function
<b>TFIIA</b>	<b>3</b>	<b>mediates activation signals stabilizes TBP-TATA interaction</b>
<b>TFIIB</b>	<b>1</b>	<b>stabilizes TBP-TATA interaction recruits TFIIF and pol II</b>
<b>TFIID</b>	<b>TBP</b>	<b>binds TATA element recruits TFIIA and TFIIB</b>
	<b>TAFs &gt;10</b>	<b>mediates various activation signals</b>
<b>TFIIE</b>	$\alpha$	<b>recruits TFIIH</b>
	$\beta$	<b>stimulates TFIIH catalytic activities</b>
<b>TFIIF</b>	<b>RAP74 RAP30</b>	<b>recruits pol II enhances elongation</b>
<b>TFIIH</b>	<b>8</b>	<b>functions in promoter opening and clearance possesses helicase and kinase activities</b>
<b>pol II</b>	<b>12</b>	<b>transcribes mRNA</b>

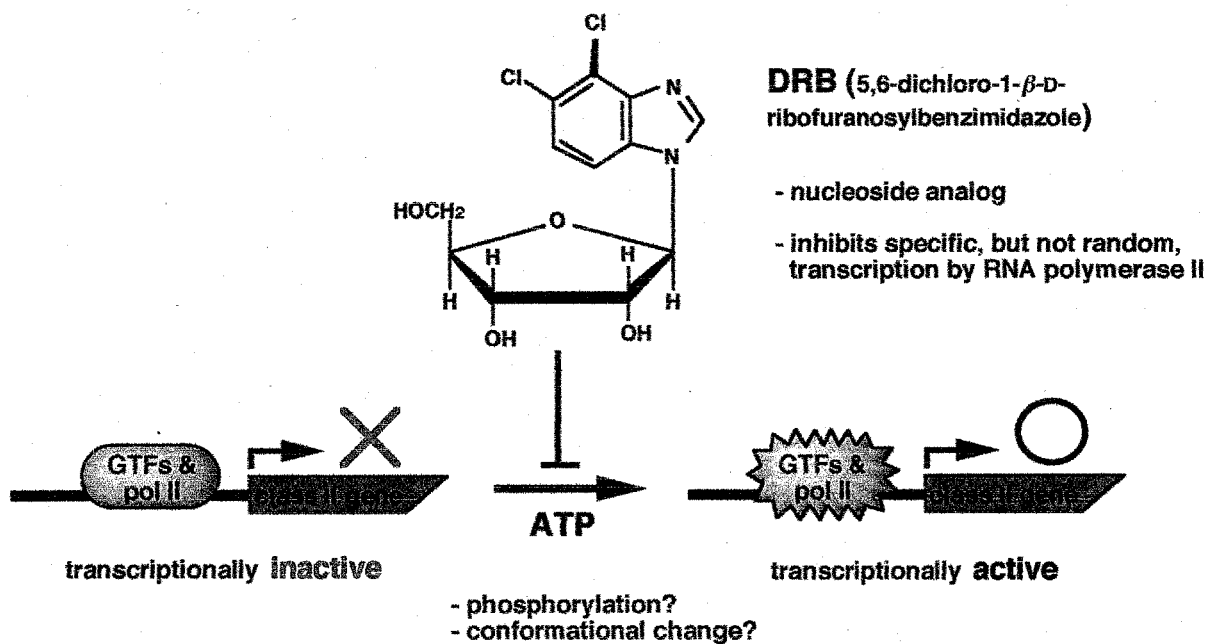
**Figure 1.4 Factors required for transcription in vitro. Six general transcription factors (GTFs) were identified using biochemical complementation assays. See text for the detail.**

1) Many general elongation factors have been identified, which are implicated in tumorigenesis

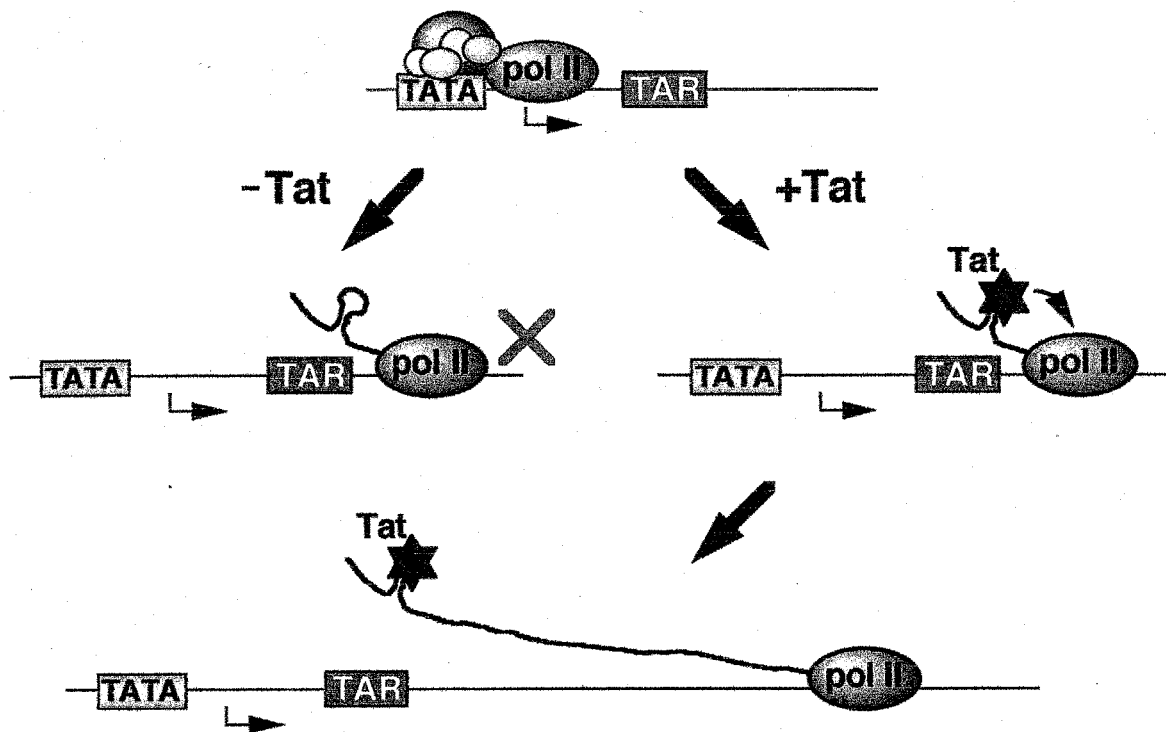
	subunit (size)	features
TFIIF	RAP74 (74 kDa) RAP30 (30 kDa)	
SII	(38 kDa)	
Elongin	A (110 kDa) B (18 kDa) C (15 kDa)	] interact with the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product
ELL	(80 kDa)	encoded by a putative proto-oncogene

2) Several activators reportedly target, not only initiation, but also elongation step of transcription

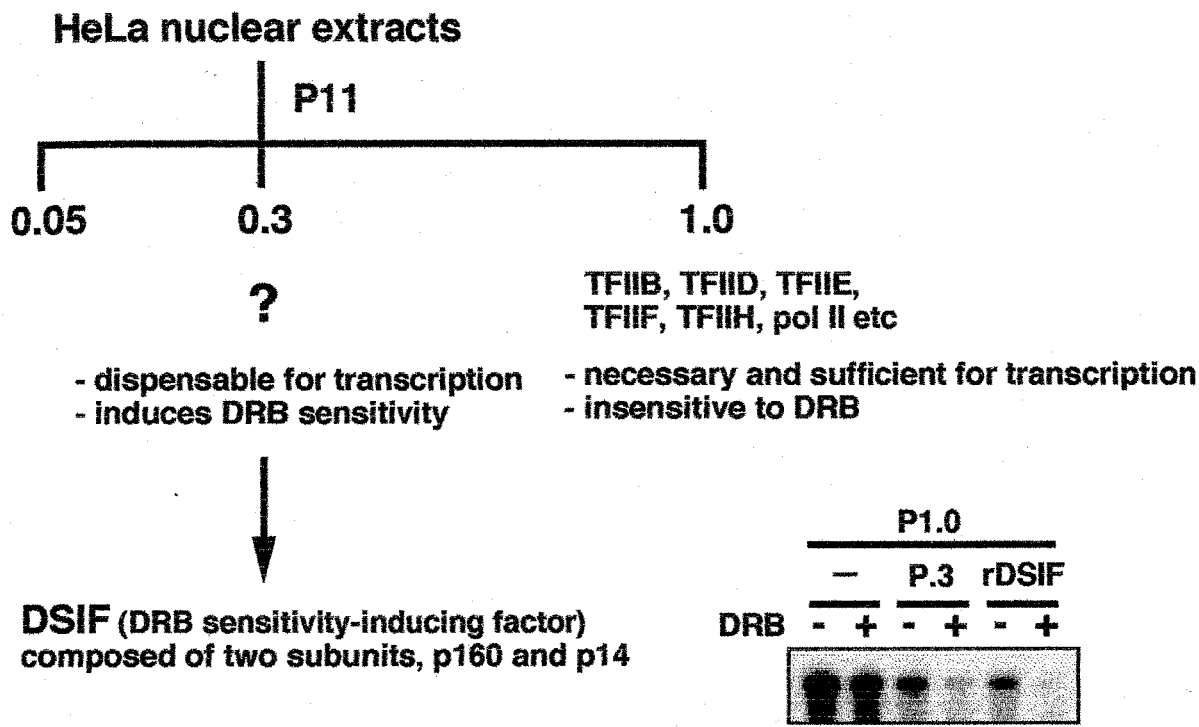
Figure 1.5 Elongation step of transcription as a critical target for its regulation.



**Figure 1.6 Transcription inhibitor DRB. DRB is a nucleoside analog and specifically inhibits pol II transcription elongation. DRB is supposed to inhibit an ATP-dependent reaction that is essential for transcription, probably a phosphorylation reaction.**

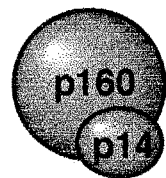


**Figure 1.7** A model for Tat activation of HIV transcription. Transcription elongation of HIV genome normally terminates at an element called TAR, which locates within ~50 bp downstream of the transcription start site. TAR acts in cis as an RNA element, and forms a stem-loop structure that may directly impedes pol II elongation. The HIV-encoded transactivator Tat binds the TAR element and releases the paused polymerase.



**Figure 1.8 Identification of DSIF.** HeLa cell nuclear extract was separated on a phosphocellulose (P11) column into three fractions, namely P.05, P.3 and P1.0. P1.0 contained most of the GTFs and pol II and was sufficient for transcription in vitro. However, this transcription was not sensitive to DRB and the addition of P.3 restored DRB-sensitivity. Using such assays, DSIF was purified from P.3.

- composed of p160 and p14.
- Both subunits are essential for function.
- p160 binds pol II.
  
- induces DRB-sensitivity.
- represses transcription in vitro when the large amount is used.
- activates transcription in vitro in the low NTP concentration.



**human DSIF**

**Figure 1.9 Properties of DSIF**

## 第2章 新規転写伸長因子 DSIF の構造と機能

### 2.1 緒言

DRB 依存的な転写阻害に関わる因子 DSIF がヒト HeLa 細胞より精製された (図 1.8)。精製された DSIF は 160 kDa (p160) と 14 kDa (p14) の2つのサブユニットからなり、図 1.9 に示したような性質を持つことが明らかとなっている。しかし、依然として次のような多くの疑問点が残されている。

- (1) p160 と p14 の一次構造は？
- (2) p160 と p14 は互いに結合するのか？ するとしたらどのように？
- (3) 巨大なタンパク質である p160 のどの領域が活性に重要なのか？
- (4) DSIF はどのように pol II と結合するのか？ また、DSIF は pol II の伸長反応に直接、影響しうるのか？
- (5) DSIF は *in vivo* で、どのような役割を果たしているのか？

本章では、以上のような疑問点をふまえて、DSIF の特に p160 のドメイン構造を明らかにすること、そして DSIF の細胞内機能を明らかにすることを目的とした。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 DSIF p160 および p14 の cDNA クローニング

Wada ら (1998a) の方法により、HeLa 細胞の核抽出液より DSIF を大量調製した。10  $\mu$ g の p160 を含んだ mono Q 画分を、7.5% SDS (sodium dodecylsulfate)-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) により分離し、p160 のバンドを切り出した。ゲル中で p160 タンパク質を Lysyl-C エンドペプチダーゼ (Wako) により消化し、得られたペプチドを逆相 HPLC (high performance liquid chromatography) によって分離後、アミノ酸配列をエドマン分解によって解析した。その結果、4 本のアミノ酸配列、DWFAK, SWVRLK, DMLEFPAQELRK, DNRFAVALDSEQNNIHVK が得られた。データベースを検索したところ、これらはいずれも新規の配列であることが判明した。そこで、後者の 2 本の配列を元に、次のような混合プライマー、5'-TT(AGCT)ACATG(AG)AT(AG)TT(AG)TT(CT)TG(CT)TC-3', 5'-GA(CT)ATG(CT)T-(AGT)GA(AG)TT(CT)CC(AGT)GC(AGCT)CA(AG)GA-3' を合成し、これらをプライマーとして、HeLa mRNA より RT (reverse transcription) -PCR を行なった。28 サイクルの後、416 bp の DNA 断片が増幅された。これをプローブとして、 $\lambda$ gt-10 HeLa cDNA ライブラリーをスクリーニングした。~2 x 10<sup>6</sup> フェージより 3 つの陽性クローンが得られ、これらはいずれも 2.0 kb 程度の 3' 側部分 cDNA を含んでいた。5' 側 cDNA を取得するため、RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR の方法を用いた (Frohman ら 1988)。p160 特異的なプライマー、5'-CGGCACAATGAGG-CCTGTGT-CG-3' を用いて、HeLa mRNA より 1 本鎖 cDNA を合成した。遺伝子特異的なプライマーとアンカープライマーを用いて PCR を 2 回繰り返した結果、~1.8 kb の 5' 側部分 cDNA が得られた。これらをシーケンシングした結果、全長 cDNA には 1087 アミノ酸をコードする ORF (open reading frame) が存在し、そこに上記の 4 つのアミノ酸配列がすべて含まれることが判明した。この配列は Genbank accession No. AB000516 に登録されている。

p14 は、すでに報告されているヒト SPT4 ホモログ、SUPT4H (Genbank accession No. U43923) の cDNA 配列を元にプライマーを設計し、HeLa mRNA より RT-PCR により増幅した。



## 2.2.2 プラスミドの構築

### p160 $\Delta$ acidic

p160 の 1-175 アミノ酸を欠損した変異体、p160 $\Delta$ acidic を調製するため、pBS-DSIF<sub>Nterm</sub> に含まれる p160 cDNA の BamHI 断片を、pBS-DSIF<sub>Cterm</sub> の BamHI 部位に挿入した。このプラスミドの XbaI (filled-in)-EcoRI (filled-in) 断片を pET-14b (Novagen) の BamHI (filled-in) 部位に挿入し、これを SpeI と XhoI で切断し、Mung bean nuclease 処理し、再連結することで pET-p160 $\Delta$ acidic を得た。

### p160 $\Delta$ p14BD

p160 の 176-314 アミノ酸を欠損した変異体、p160 $\Delta$ p14BD を調製するため、pBS-FLAGp160 に含まれる p160 の PvuI (blunt end)-SacII 断片を、pBS-FLAGp160 の BamHI (Mung bean nuclease 処理)-SacII 部位に挿入した。このプラスミドの NdeI-ApaI 断片を pET-DSIFp160 の NdeI-ApaI 部位に挿入することで pET-p160 $\Delta$ p14BD を得た。

### p160 $\Delta$ NusG

p160 の 314-516 アミノ酸を欠損した変異体、p160 $\Delta$ NusG を調製するため、pBS-FLAGp160 に含まれる p160 の NdeI-PvuI (blunt end) 断片を、pET-DSIFp160 の NdeI-SmaI 部位に挿入することで pET-p160 $\Delta$ NusG を得た。

### p160 $\Delta$ repeat

p160 の 758-936 アミノ酸を欠損した変異体、p160 $\Delta$ repeat を調製するため、pBS-p160<sub>Cterm</sub> を NcoI 消化、Klenow 処理、そして SmaI 部分消化することにより、758-936 アミノ酸をコードする DNA 断片を除去した。このプラスミドの SmaI-BstEII 断片を、pET-DSIFp160 の SmaI-BstEII 部位に挿入することで pET-p160 $\Delta$ repeat を得た。

### p160 $\Delta$ KOW1 および $\Delta$ KOW2

p160 の 421-447 アミノ酸および 473-499 アミノ酸を欠損した変異体、p160 $\Delta$ KOW1 および  $\Delta$ KOW2 を調製するため、PCR に基づいた overlap extension 法 (Higuchi ら 1988) を用いた。欠損部位を含んだ正逆方向の変異プライマーを合成

し、2回のPCRによって得られた変異を含む p160 cDNA 断片を pET-14b に挿入することで、pET-p160 $\Delta$ KOW1 および pET-p160 $\Delta$ KOW2 を得た。

#### GST-p14

pBS-DSIFp14 に含まれる p14 の BamHI 断片を、pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia) の BamHI 部位に挿入することで、pGEX-p14 を得た。

#### Flag-p160 および Flag-p160 $\Delta$ NusG

pBS-FLAGp160 および pBS-FLAGp160 $\Delta$ NusG の EcoRI 断片を pCAGGS (Niwa ら 1991) の EcoRI 部位に挿入することで、pCMV-FLAGp160 および pCMV-FLAGp160 $\Delta$ NusG を得た。

#### HA-p14

pBS-DSIFp14 に含まれる p14 の BamHI (filled-in) 断片を、pCAGGS 誘導体である pCHA の BstEII (filled-in) 部位に挿入することで、pCMV-HAp14 を得た。pCHA は HA エピトープ、YPYDVPDYA をコードする配列を含んでいる。

#### p160-GFP

pBS-FLAGp160 を EcoRV と BstEII で消化し、Klenow 処理した後、p160 の 1-980 アミノ酸をコードする断片を、GFP 用の発現プラスミド pEGFP (Clontech) の PstI (blunt) 部位に挿入することで、pEGFP-p160 を得た。

### 2.2.3 大腸菌組換え p160 および p14 の調製

r-DSIF は r-p160 と r-p14 を 10:1 で混合したものである。これらは His タグを N 末端側に付加した形で、大腸菌より発現、精製した。pET-p160 および pET-p14 をそれぞれ大腸菌 BL21 (DE3) 株に導入し、100  $\mu$ g/ml アンピシリンを含んだ LB 液体培地中、37 $^{\circ}$ C で培養した。600 nm における濁度が 0.6 になった時点で、IPTG (isopropyl-D-thiogalactoside) を終濃度が 1 mM となるように加え、さらに 4 時間培養した。4 $^{\circ}$ C、3,000 x g で 15 分遠心して菌体を回収し、PBS (phosphate buffered-saline) で 2 回洗浄後、培養液に対して 1/50 容の 1xBinding バッファー (Novagen) に懸濁した。これらを断続的に 30 分、超音波破碎した後、4 $^{\circ}$ C、13,600 x g で 30 分遠心し、さらに孔径 0.45  $\mu$ m のフィルターに通すことでライセートを調製した。ライセートを Ni<sup>2+</sup>

カラム (Novagen; His-Bind resin) にアプライし、指示された方法により組換えタンパク質を精製した。精製 r-p14 は効率よく、高純度で精製できたが、r-p160 は大部分が素通り画分に回収され、また、溶出画分には多くの分解産物が含まれていた。そこで、これをさらにディスク・プレパラティブ電気泳動装置 (日本エイドー) にかけて、全長のものを分取した。r-p160 と r-p14 タンパク質は最終的にアセトン沈澱し、ペレットを 6 M グアニジン塩酸塩にて溶解し、0.1 M KCl を含んだ HGE [20 mM HEPES (pH 7.9), 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol]、すなわち HGE.1 (HGE 以下の数字は KCl の濃度を表す) に対して透析することにより調製した。

*in vitro* で翻訳した p160 およびその誘導体を調製するため、pBS-p160, pBS-p160<sub>Nterm</sub>, あるいは pBS-p160<sub>Cterm</sub> を適当な制限酵素で切断した。C 末端側を欠損した変異体を調製する場合には、p160 の ORF 内を切断した。直鎖化したプラスミドを T7 あるいは T3 RNA polymerase で転写した後、ウサギ網状赤血球ライセートの翻訳系 (Promega) を用いて、<sup>[35S]</sup>メチオニンの存在下で翻訳した。

#### 2.2.4 p160 と p14 の相互作用の解析

##### *in vivo* における相互作用

pCMV-FLAGp160 (10 µg) および pCMV-HAp14 (10 µg) を単独あるいは組み合わせて、 $2 \times 10^6$  個の HeLa 細胞にトランスフェクションした。その 48 時間後に、細胞を 500 µl の High Salt バッファー (50 mM Tris [pH 7.9], 500 mM NaCl, 1% NP-40) を用いて溶解し、遠心後の上清を得た。このライセートを 2 µg の抗 Flag M2 単クローン抗体 (Sigma) と 2 時間、4°C で混合し、これを 20 µl の protein G Sepharose (Amersham Pharmacia) と 1 時間、4°C で混合した。High Salt バッファーで 3 回洗浄した後、免疫沈降物を 50 µl の SDS サンプルバッファーで溶出し、含まれるタンパク質をイムノブロッティングにより解析した。Flag-p160 および HAp14 は、抗 Flag 抗体および抗 HA (12CA5) 抗体 (Gibco BRL) とそれぞれ反応させ、ECL (enhanced chemiluminescence) 試薬 (Amersham Pharmacia) を用いて可視化した。

##### *in vitro* における相互作用

~5  $\mu\text{g}$  の GST (glutathione S-transferase) あるいは GST-p14 タンパク質を 20  $\mu\text{l}$  の glutathione Sepharose 4B レジン (Amersham Pharmacia) と結合させた。これを、*in vitro* で翻訳し、 $[^{35}\text{S}]$  標識された p160 の野生体および誘導体と、100  $\mu\text{l}$  の NETN バッファー [50 mM Tris (pH 7.9), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA] 中、1 時間、4°C で混合した。NETN で 3 回洗浄した後、結合タンパク質を 50  $\mu\text{l}$  の SDS サンプルバッファーで溶出し、SDS-PAGE およびフルオログラフィーにより解析した。

### 2.2.5 *in vitro* 転写反応

HeLa 細胞の核抽出液、およびそのホスホセルロースカラム (P11) 画分 P.1, P.3, P1.0 は Wada ら (1998a) の方法により調製した。転写の鋳型としては、スーパーコイルしたプラスミド pTF3-6C<sub>2</sub>AT を用いた (Wada ら 1991)。これは、380 塩基のグアニン塩基を含まない転写産物を生じる。転写反応は基本的に Wada ら (1998a) の方法に従った。図 2.8 では、P1.0 (2  $\mu\text{l}$ ), P.3 (4  $\mu\text{l}$ ), r-p14 (3 ng), r-p160 あるいはその誘導体 (30 ng), そして pTF3-6C<sub>2</sub>AT (250 ng) を含んだ 20  $\mu\text{l}$  の反応液を 45 分、30°C でプレインキュベーションした。ここに 2.5  $\mu\text{l}$  の NTP mix [終濃度 60  $\mu\text{M}$  ATP, 600  $\mu\text{M}$  CTP, 5  $\mu\text{M}$  UTP, 80  $\mu\text{M}$  3'-O-methyl-GTP (すべて Amersham Pharmacia), および 50 units の RNase T1 (Gibco BRL)] そして 2.5  $\mu\text{l}$  のバッファーあるいは DRB (Sigma; 10 mM, エタノール中にてストック; 終濃度 50  $\mu\text{M}$ ) を添加することで、転写反応を開始させた。10 分後に反応を停止させ、転写産物を 8%尿素変性 PAGE により解析した。一方、図 2.13 では、HeLa 核抽出液 (4  $\mu\text{l}$ ) および p160 $\Delta$ NusG (0-200 ng) を含んだ反応液を図示した時間プレインキュベーションし、上記の方法で反応を進めた。

### 2.2.6 トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

HeLa S3 細胞は、10%牛胎児血清 (Cansera International) および L-グルタミンを含んだ minimal essential medium (ニッスイ; MEM) を用いて、組織培養用のディッシュ上で維持した。6 cm のディッシュに  $3 \times 10^5$  個の細胞を撻き、20 時間後に標

準的なリン酸カルシウム法 (Ausubel ら 1995) によって、全量 10  $\mu\text{g}$  の DNA (5  $\mu\text{g}$  の図示したレポータープラスミド、様々な量の pCMV-FLAGp160 $\Delta$ NusG と空ベクター) をトランスフェクションした。DNA-CaPO<sub>4</sub> の共沈澱は 6 時間後に除去した。細胞を 48 時間後に回収し、300  $\mu\text{l}$  の培養細胞溶解液 (東洋インキ) を用いてライセートを調製した。それらのルシフェラーゼ活性は、ルミノメーター (Berthold; Lumat) を用いて測定した。その値はタンパク量を用いて補正し、pCMV-FLAGp160 $\Delta$ NusG を含まないときの値を 1 とした相対値 (fold activation) で表した。

### 2.2.7 GFP と蛍光顕微鏡

HeLa 細胞をカバーガラス (12x32 mm, 厚さ 0.12-0.17 mm) 上に捲き、pEGFP-p160 をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした。トランスフェクションの 48 時間後に、Hoechst 33342 (Sigma) を終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように培地に添加し、さらに 30 分インキュベーションした。細胞の付着した面を下にしてカバーガラスをスライドチャンバー (Nunc) 上に置き、チャンバー内部に培地が満たされた状態で、マニキュアにより密閉した。これを正立型蛍光顕微鏡 (Zeiss; Axiovert) により観察し、ASA400 の 35 mm カラーフィルム (Fuji) で撮影した。

### 2.2.8 細胞周期の同調

HeLa 細胞を 10 cm ディッシュに捲き、12 時間後にチミジン (Sigma; 200 mM, PBS 中にてストック) を終濃度が 2 mM となるように添加した。16 時間培養した後、培地交換し、チミジンを除去することで G1 期におけるブロックを解除した。さらに 8 時間培養した後、ノコダゾール (Sigma; 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ジメチルスルホキシド中にてストック) を終濃度が 40 ng/ml となるように添加した。その 30 時間後に培地交換し、M 期のブロックを解除した。ノコダゾール添加の 10~32 時間後に、細胞をトリプシン処理にて回収し、その 1/5 を FACS (fluorescence-activated cell scanner) 解析に、残りを p160 のイムノブロッティングに用いた。

細胞を PBS で洗浄し、冷エタノールにより固定した。細胞を 30 分から一晩、4°C

で放置した後、500  $\mu$ l の PBS に再懸濁し、10 mg/ml RNase A を 1  $\mu$ l 加え、37°C で 30 分インキュベーションした。ここにヨウ化プロピジウム (Sigma; 1 mg/ml, PBS 中にてストック) 5  $\mu$ l を加え、暗所にて 15 分インキュベーションした。これを FACS 装置 (Becton Dickinson; FACScan) にかけて、細胞あたりの DNA 含有量を測定した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 DSIF サブユニット cDNA の単離

大量精製した DSIF p160 サブユニットを Lysyl エンドペプチダーゼで消化し、逆相 HPLC でペプチドを分離した。得られたピークをエドマン分解にて解析した結果、4つのアミノ酸配列 DWFAK, SWVRLK, DMLEFPAQELRK, DNRFAVALDSEQN NIHVK を得た。データベース検索の結果、これらすべてが新規配列だったため、後者の2本のペプチドを元に 'guessmer' を設計し、PCR を行なった。HeLa mRNA を鋳型として RT-PCR したところ、416 bp の産物が得られた (図 2.1)。この産物はちょうど p160 cDNA の中央部分に位置していた。この配列をプローブとして  $\lambda$ gt-10 HeLa cDNA ライブラリーをスクリーニングした。~2 x 10<sup>6</sup>個のファージより3つのポジティブクローンが得られ、いずれも~2.0 kb の3'側部分 cDNA を含んでいた (図 2.1)。cDNA の5'側を取得するため、RACE-PCR を行なった。2回にわたる PCR の結果、~1.8 kb の5'側 cDNA が得られた (図 2.1)。シーケンシングの結果、これらの重なり合う cDNA は、1087 アミノ酸をコードする単一の ORF (open reading frame) を持っており、そこに4つのペプチド配列がすべて含まれることが判明した。得られた塩基配列と、そこから予想されるアミノ酸配列を図 2.2 に示す。これとよく類似した配列が、他の2つのグループからも最近報告されている (Chiang ら 1996; Stachora ら 1997)。

p160 cDNA のコンピュータ解析を行なったところ、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の SPT5 という遺伝子との全長に渡る相同性が明らかとなった。これらおよび線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の Spt5 ホモログの相同性を図 2.3 に示した。以上の結果、p160 は Spt5 のヒトホモログだと考えられる。1087 アミノ酸からなる p160 には、特徴的な配列が数多く存在する。N 末端側には非常に酸性アミノ酸に富んだ領域が、C 末端側には6アミノ酸からなる反復配列が存在する。さらに中央部分には、大腸菌において転写終結に関与する NusG という因子と相同性を示す 20 アミノ酸からなる領域が4箇所存在する (Greenblatt ら 1993; Mogridge ら 1995)。この 20 アミノ酸配列は一部のリボソームタンパク質にも保存されていることが最近報告され、KOW モチーフと命名されている (Kyrpides ら 1996)。これらの因子の共通性

から、RNA ポリメラーゼあるいは RNA との結合に関与する可能性が提案されているが、実際の機能は全く不明である。

SPT (suppressor of Ty) 遺伝子ファミリーは、酵母のトランスポゾン Ty が挿入されて異常をきたした HIS4 や LYS2 遺伝子の発現を正常に復帰させるサプレッサー変異として同定された (Winston ら 1992; Winston と Carlson 1992)。基本転写因子 TBP が Spt15 と同一であったことなどから、SPT ファミリーが重要な転写因子をコードしていると予想される。しかしこれらの内、生化学的な機能が判明しているものは少ない。SPT ファミリーは、変異体の表現型などに基づき、いくつかのサブファミリーに分類されている。SPT5 は SPT4, 6, 13, 14 とともに一つのサブファミリーを形成している。興味深いことに、SPT13 および 14 がヒストン H2A, H2B をそれぞれコードしていたことから、SPT4, 5, 6 がクロマチン構造の制御に関与することが示唆されている。クロマチン構造と伸長反応との関連については後で考察したい。

我々は、酵母において Spt5 が Spt4 と結合するという情報を得た (Hartzog ら 1998)。SPT4 のヒトホモログ、SUPT4H の cDNA は既に報告されており、その予想されるタンパク質の分子量は p14 (14 kDa) に近かった (Hartzog ら 1996)。我々は DSIF p14 が Supt4h ではないかと予想し、このタンパク質を大腸菌より発現、精製した。in vitro 転写反応でこの組換え体を調べたところ、p14 と同じく、p160 と共に DRB 感受性を誘導するという結果を得た (データ示さず)。よって p14 は SPT4 のヒトホモログであるとの結論に達した。

### 2.3.2 DSIF p160 と p14 の相互作用

最初に、p160 と p14 との相互作用について検討した。in vivo における相互作用を検討するため、Flag と HA というエピトープタグを N 末端側に付加した p160 および p14 の cDNA を、HeLa 細胞にトランスフェクションした。細胞のライセートを調製し、Flag 抗体あるいは HA 抗体でイムノブロッティングしたところ、Flag-p160 と HA-p14 の発現がそれぞれ確認できた (図 2.4, レーン 1-4)。これらのライセートを Flag 抗体で免疫沈降し、沈降物を同様にイムノブロッティングしたところ、その中に HA-p14 が含まれていた (レーン 5-8)。この結果、p160 と p14 は細胞内で複合



体を形成することが分かった。

次に *in vitro* において相互作用を検討した。ここで用いた GST pull-down 法を簡単に説明する。大腸菌より GST 融合 p14 タンパク質を大量に調製し、GST とグルタチオンとの結合を介してこれをカラムに固定化する。この親和性カラムに、*in vitro* で転写・翻訳し、<sup>35</sup>S 標識した p160 タンパク質を通し、カラムへの結合を調べる。p160 はコントロールの GST カラムには全く結合しなかったのに対し、GST-p14 のカラムには強く結合した (図 2.5, レーン 1-3)。p14 は亜鉛フィンガー (Zn finger) 様のモチーフを持っているため、2 価イオンやキレート剤がこの結合におよぼす効果を調べた。しかし何ら影響は認められず (レーン 4, 5)、この結合に亜鉛フィンガーは関与していないと思われる。また、1 M KCl および 1% NP-40 の存在下でも同様の結合が観察されたことから (レーン 6)、p160-p14 複合体は非常に安定だと考えられる。

さらに、p14 との結合に関与する p160 の領域を GST pull down 法により決定した。一連の p160 変異体を作製し、p14 との結合を検討したところ、図 2.6 下にまとめたような結果が得られた。プラスは野生体と同様の強い結合を示す変異体、マイナスは全く結合を示さない変異体である。C 末端側は結合に関与しておらず、N 末端側のみで p14 に結合した。この領域をさらに詳しく調べたところ、太い線で示した 176~270 番目のアミノ酸領域が p14 との結合に十分であることが分かった。

### 2.3.3 DSIF 活性に必要な構造領域の決定

次に、DSIF 活性に必要な p160 の構造領域を決定した。本研究で用いた *in vitro* 転写反応について説明する (図 2.7)。当研究室で古くより用いられてきたアデノウイルス E4 遺伝子プロモーターの下流に、グアニン塩基を含まない 380 bp のカセットを挿入したプラスミドを転写の鋳型として用いる。この鋳型を、転写装置の供給源である核抽出液あるいは精製した転写因子と混ぜ、45 分間プレインキュベーションする。ここに GTP 以外のヌクレオチド 3 リン酸を添加し、転写反応を 10 分間行なう。この反応中にグアニン塩基を認識する RNase T1 を加えておくことで、仮に 380 塩基以上伸びてしまってもこの酵素によって消化され、380 塩基に揃った転写産物が得られる。これを尿素変性 PAGE で分離し、オートラジオグラフィーにより検出する。

p160 の特徴的な配列である酸性領域、NusG 相同領域、繰り返し領域を欠損した変異体および、図 2.6 で明らかにした p14 結合領域を欠損した変異体を作成した。NusG 相同領域については、4 箇所の相同領域を 1 つだけ削ったような変異体も作成した (図 2.8D)。これらの変異体は、大腸菌にて His 融合タンパク質として発現させ、ニッケルカラムで精製したのち、SDS ポリアクリルアミドゲルから回収し、再生することで調製した。これらのタンパク質の銀染色の結果を図 2.8A に示した。これらの変異体を p14 と共に P1.0 の転写系に加え、DRB 存在下あるいは非存在下で転写反応を行なった (図 2.8B)。p160 を加えないと、DRB 感受性は示さない (レーン 1, 2)。ここに野生体あるいは繰り返し領域を欠損した変異体を加えると DRB 感受性を誘導したが、他の変異体は全て DRB 感受性を誘導しなかった。以上の結果、酸性アミノ酸領域、p14 結合領域、NusG 相同領域は DSIF 活性に必須であることが示唆された。特に NusG 相同領域の KOW1, KOW2 は僅か 20 アミノ酸を欠いただけで活性を失ってしまうことから、特に重要な機能を担っていると思われる。また、p14 と p160 の複合体形成が活性に重要であることも示唆された。

#### 2.3.4 p160 と RNA ポリメラーゼ II との相互作用

次に DSIF と pol II との相互作用について検討した。図 2.9B に示したような一連の p160 変異体を、*in vitro* で転写・翻訳することにより調製した。これらを精製した pol II と混合した後、pol II に対する抗体 (8WG16) で免疫沈降し、これらの変異体が pol II と共に沈澱するかどうかを調べた (図 2.9A)。p160 野生体の結合を 100 として百分率で示した。太い線で示したのは 4 つの NusG 相同領域である。NusG もまた大腸菌の RNA ポリメラーゼに結合することから、この部分が pol II への結合に関与しているのではないかと予想した。しかし実際には予想と異なる結果が得られた。まず p160 の C 末端側も N 末端側も結合に不必要だった。中央の領域を詳しく調べたところ、NusG 相同領域に隣接した N 末端側の領域 (313 から 420 番目アミノ酸) が pol II との結合を主に担っていることが分かった。しかし、NusG 相同領域のみでも弱い結合が観察され、この領域もまた pol II との結合に関与している可能性は否定できない。

DSIF は pol II に結合することから、pol II の伸長反応を直接制御している可能性が考えられる。この可能性を検討するため、オリゴ dC テンプレートをを用いた転写反応を行なった。これは 2 本鎖 DNA の 3' 側、片末端にデオキシシトシン (dC) を数十塩基付加した鑄型である。通常、pol II は基本転写因子なしにプロモーターを認識することはできないが、この dC 末端の場合には単独で効率良く認識することができる。このオリゴ dC テンプレートは、これまで TFIIIS, TFIIIF, Elongin といった基本伸長因子の活性を測定するのに用いられてきた (Ueno ら 1992; Kitajima ら 1994; Aso ら 1995)。

精製した pol II と鑄型をプレインキュベーションし、NTP を加えて経時的に観察すると、転写の伸長の局面を見ることができる (図 2.10, レーン 1-4)。ここに組換え (r)DSIF を加えたところ、全く変化は認められなかった (レーン 5-8)。様々な条件下で DSIF の効果を検討したが、有意な違いを認めることはできなかった (データ示さず)。一方、基本伸長因子 TFIIIF をこの反応系に加えたところ、著しい伸長反応の促進が観察された (レーン 9-12)。以上の結果、DSIF は pol II に結合はするものの、伸長反応に影響を及ぼさないことが分かった。

これまでの結果をまとめると図 2.11 のようになる。p14 および pol II との結合領域は、酸性領域と NusG 相同領域との間にそれぞれマッピングされた。図 2.11 上は p160 の疎水性をプロットしたものである。p14 結合領域は比較的疎水的であり、疎水結合が DSIF サブユニット間の結合に関与しているものと推定される。また、DSIF 活性には N 末端側のほとんど全ての領域が必要だった。

### 2.3.5 p160 ドミナントネガティブ変異体の単離

最後の、そして最も重要な疑問は DSIF の *in vivo* における役割である。*in vivo* で解析法としては、目的の因子を細胞に過剰発現させ、その影響を調べる方法が最も一般的に行なわれている。そこで p160 と p14 を様々な組み合わせで HeLa 細胞に導入し、*in vivo* の転写反応に及ぼす効果を検討した。その結果、ほとんど有意な効果を認めることはできなかった (データ示さず)。しかしこの結果から、DSIF が細胞内で転写に作用していないと直ちに結論づけることはできない。というのも、内在性 DSIF

が細胞内のすべての転写反応に既に参加していれば、あるいは DSIF が転写反応に参加するステップが律速段階でなければ、DSIF の量を増やしたところで、その効果は期待できない。

そこでこれに代わる手法として、ドミナントネガティブ (dominant negative) 変異体を用いることを考えた。ドミナントネガティブ変異体とは、それ自身活性を失った上、機能的に重要な相互作用を野生体から奪うことにより、trans に野生体の活性まで抑えてしまう変異体のことである (図 2.12)。遺伝子破壊の難しい動物細胞において、ある因子の細胞内活性を下げたときの影響を調べる方法として良く用いられる。p160 は p14 と安定な複合体を形成するので、p14 と結合するが活性のないような p160 変異体は、ドミナントネガティブに働く可能性が高い。このような変異体として、NusG 相同領域の欠損変異体を用いた。

まず  $\Delta$ NusG がドミナントネガティブに働くかどうか、in vitro で調べた。 $\Delta$ NusG タンパク質を HeLa 核抽出液と 45 分間混合し、DRB 感受性を検討した (図 2.13A)。レーン下の数字は、DRB による阻害の程度を表している。DRB を加えると通常、核抽出液の転写は 10 数%に阻害される (レーン 1, 2)。ここに  $\Delta$ NusG を 200 ng 加えると、DRB 感受性が僅かに低下した (レーン 7, 8)。この反応に用いた核抽出液中には p160 がおよそ 30 ng 含まれているので、内在性 p160 に対し 6, 7 倍過剰量の  $\Delta$ NusG が加えられたことになる。ここで得られた効果が弱かったため、 $\Delta$ NusG の量を一定にして、今度はプレインキュベーションの時間を変えてみた。内在性 p160 と  $\Delta$ NusG が置き換わるのに、ある程度時間がかかるのではないかと考えたからである。すると図 2.13B に示したように、プレインキュベーションの時間を 180 分に延ばしたとき、DRB 感受性が著しく低下した。以上の結果、 $\Delta$ NusG は in vitro でドミナントネガティブに働き、核抽出液の DRB 感受性を打ち消すことが分かった。のみならず、この結果から次の 3 つのことがらが導かれる。

- (1)  $\Delta$ NusG がドミナントネガティブに働いたことから、この変異体は特定の機能、おそらく p14 との結合能を保持していたと考えられる。よって、NusG 相同領域の欠損によって DSIF 活性を失ったのは、単にポリペプチドの misfolding のせいではなく、

この領域がコードする特定の機能を失ったためだと推定される。

(2) 同じ理由で、p160 と p14 の複合体形成が DSIF 活性に重要であることも、改めて示唆される。

(3) DSIF が DRB 依存的な転写阻害に不可欠であることが、この異なる方法によって改めて示唆される。

### 2.3.6 DSIF の細胞内機能

$\Delta$ NusG 変異体を用いて、DSIF が *in vivo* で転写に及ぼす効果をルシフェラーゼアッセイにより検討した。様々なプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを、 $\Delta$ NusG の発現プラスミドとともに HeLa 細胞にトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性と  $\Delta$ NusG の発現レベルを調べた。図 2.14B が p160 のイムノブロットングで、上の一定なバンドが内在性 p160、下のバンドが  $\Delta$ NusG に相当する。 $\Delta$ NusG の DNA 量を 3 点変化させたが、これらのシグナルを比較すると 2 点目で内在性 p160 と同レベル、3 点目では 3 倍ほど  $\Delta$ NusG が発現したことが分かる。しかしここでトランスフェクションの効率を考慮に入れる必要がある。免疫染色により調べると、トランスフェクションした細胞の 1/3 程度にしか実際には遺伝子が導入されないことが分かる (データ示さず)。従って、遺伝子の導入された細胞だけを考慮すると、 $\Delta$ NusG は 2 点目で内在性 p160 の 3 倍、3 点目で 9 倍程度、発現したことになる。つまり、3 点目が *in vitro* で顕著なドミナントネガティブ効果が観察された量におよそ相当する。このとき、ルシフェラーゼ活性はプロモーターの種類によらず、 $\Delta$ NusG の量依存的に増加し、最大 5 から 10 倍程度活性化された (図 2.14A)。細胞内の DSIF 活性を抑えた結果、転写が促進されたということは、DSIF は本来、細胞内で転写を抑制しているという結論が導かれる。

### 2.3.7 p160 の発現パターン

次に、DSIF が転写反応に限らず、細胞機能とどのように関わっているのか明らかにしたいと考えた。その手掛かりとして、p160 の発現パターンを解析した。ヒト各

組織より mRNA を採取し、ノーザンブロッティングにより p160 の発現を調べた。その結果、内蔵、脳、骨格筋と調べたすべての組織で~3.6 kb の単一バンドのシグナルが得られた (図 2.15)。このサイズは p160 の cDNA 長とほぼ一致し、p160 mRNA 由来のバンドであると考えられる。以上のことから、p160 は組織によらず、普遍的に発現していることが分かった。p14 のノーザンブロッティングはすでに報告されており、p160 同様、普遍的な発現パターンを示す (Hartzog ら 1996)。

次に p160 の細胞内局在を調べた。その方法として、クラゲ (*Aequorea victoria*) の発光タンパク質 GFP (green fluorescence protein) を用いた。GFP は外来の基質などを要求せずに緑色の蛍光を発するタンパク質で、現在各方面で応用されている。GFP と p160 の融合タンパク質を HeLa 細胞に導入すれば、p160 の細胞内局在に応じて緑色の蛍光が観察されるはずである (図 2.16)。GFP の利点として、細胞を生きのまま無傷の状態を観察できる点が挙げられる。従来の蛍光抗体法だと、細胞を有機溶媒などを用いて固定する必要がある、この操作が細胞内の微細構造を破壊してしまう危険があった。

図 2.17 左は GFP-p160、右は DNA を染色する Hoechst 33342 をそれぞれ可視化した、HeLa 細胞の顕微鏡写真である。中央は両者を重ね合わせたものである。緑色のシグナルが丸く、核に一致して得られたことから、p160 は核に局在することが分かった。しかし注意してみると、核に一様に存在しているのではなく、ドット状に分布していることが分かる。これが一体何を意味するのか今のところ不明だが、DSIF が特定の核内構造と相互作用している可能性が示唆される。ちなみに、ドット状の局在を示すタンパク質としては、スプライシング因子、一部の転写因子や pol II、セントロメアやテロメア関連因子、核マトリックス (nuclear matrix) 因子などが知られている。

### 2.3.8 細胞周期依存的な p160 のリン酸化

酵母 SPT4, 5, 6 はクロマチン構造との関連が示唆されているが、特に細胞分裂時の姉妹染色体の分離 (sister chromatid segregation) に関与しているという報告がある。DSIF もまた細胞周期によって制御されている可能性を考え、細胞周期における

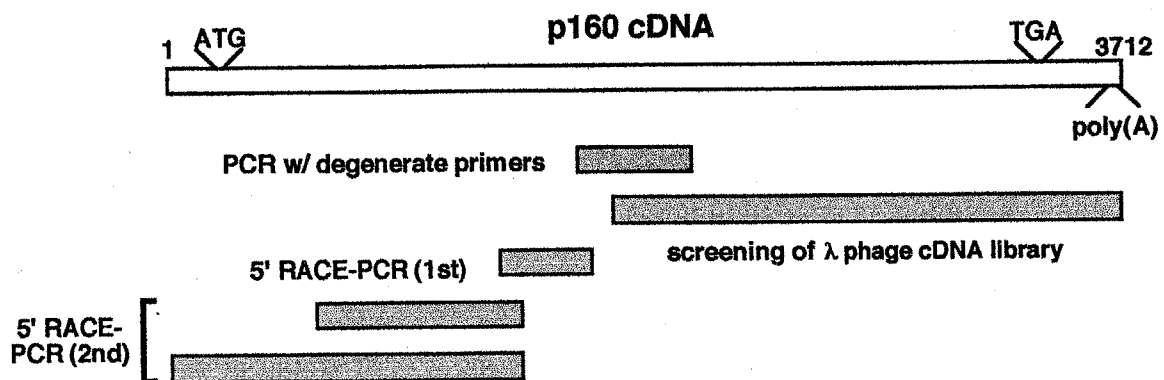
p160 の発現パターンを調べた。チミジンブロックにより G1 期に同調した HeLa 細胞を解放後、nocodazole を添加して再び M 期に同調した。経時的に細胞を回収し、FACS を用いて細胞周期の進行を調べるとともに、イムノブロットティングにより p160 を検出した (図 2.18)。すると、M 期への進入と共に移動度の遅い p160 のバンドが出現し、大部分の p160 がこの位置にシフトすることが分かった。この p160 をアルカリフォスファターゼ処理すると移動度が元に戻ることから、このシフトはリン酸化によるものである (Stachora ら 1996; データ示さず)。以上の結果、p160 は M 期特異的に高度にリン酸化されることが判明した。p160 の C 末端側繰り返し配列には CDK (Cyclin-dependent kinase) のコンセンサス配列が多数存在しており、M 期特異的 CDK がこのリン酸化に関与していると推定される。このリン酸化の機能的意味については現在解析中である。

## 2.4 まとめ

本章をまとめる。

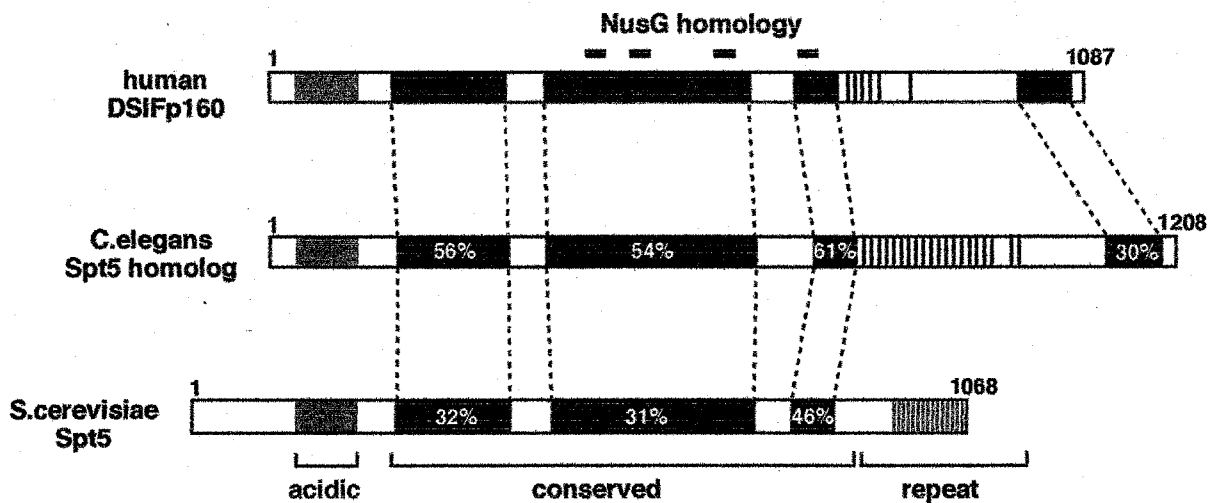
- (1) p160は酵母 Spt5 のヒトホモログである。
- (2) p160が p14 と相互作用することを示し、結合領域を決定した。
- (3) p160 の DSIF 活性に必要な領域を決定した。
- (4) p160 の pol II 結合領域を決定した。p160 は単独では pol II の伸長反応に影響しないことを示した。
- (5) p160 のドミナントネガティブ変異体を単離し、それを用いて DSIF が *in vivo* で転写を抑制することを明らかにした。
- (6) p160 は普遍的に発現する核内タンパク質で、ドット状の局在パターンを示す。
- (7) p160 は分裂期で高度にリン酸化される。



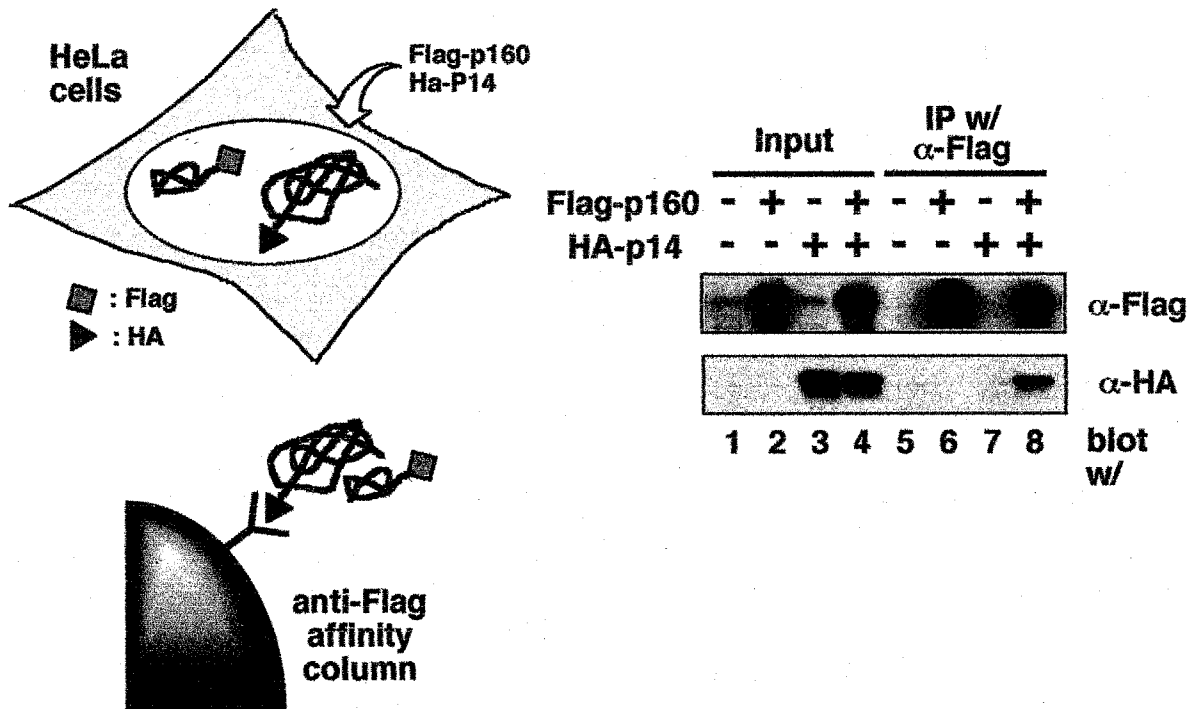


**Figure 2.1 Cloning strategy for DSIF p160. p160 cDNA was isolated using three different techniques. The 416 bp central part (pink) was isolated by PCR using 'geussmers' as primers. The 3' part (yellow) was isolated from screening of  $\lambda$ gt-10 HeLa cDNA library. The 5' part (light blue) was isolated by RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR as described in Materials and methods.**





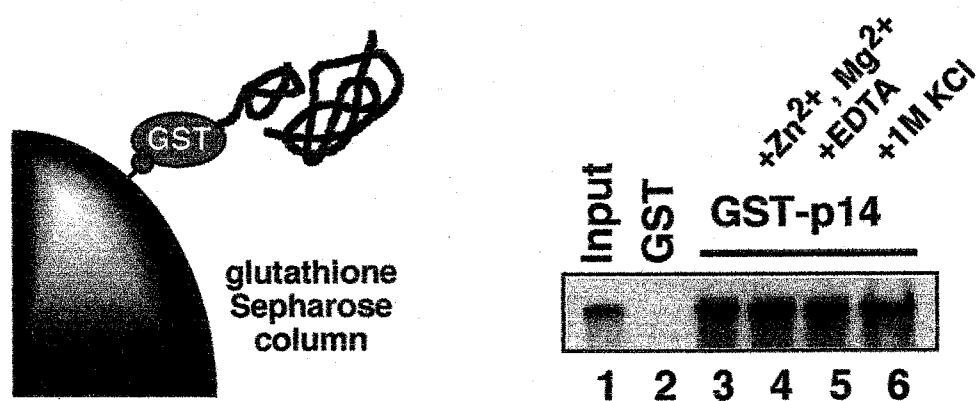
**Figure 2.3 Evolutionary coservation of p160.** Human DSIF p160, the *Caenorhabditis elegans* Spt5 homolog of unknown function and *Saccharomyces cerevisiae* Spt5 are schematically aligned. Positions of the acidic domain, the highly conserved region and the C-terminal repeats are marked by boxes. Numbers in the boxes indicate the amino acid identity within those regions. Also shown at the top are the regions with similarity to *E. coli* NusG.



**Figure 2.4** p160 interacts with p14 in vivo. pCMV-FLAGp160 and pCMV-HAp14 were transfected into HeLa cells either individually or in combination. The cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag antibody. The lysates (10% of the input, lanes 1-4) and the immunoprecipitated materials (lanes 5-8) were analyzed by immunoblotting with anti-Flag and anti-HA antibody.

**p160: synthesized in vitro using rabbit reticulocyte  
lyaste, 35S-labeled**

**GST-p14: expressed and purified from E. coli**



**Figure 2.5 p160 interacts with p14 in vitro. [<sup>35</sup>S] labeled p160 was incubated with either GST-p14 affinity column (lanes 3-6) or control GST column (lane 2) under various conditions. After extensive washing with the same buffer, bound p160 was eluted and analyzed. Lane 1 represents 20% of the input. The binding and washing conditions were as follows: NETN buffer (lanes 2 and 3); NETN+10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (lane 4); NETN+10 mM EDTA (lane 5); NETN+1M KCl (lane 6).**

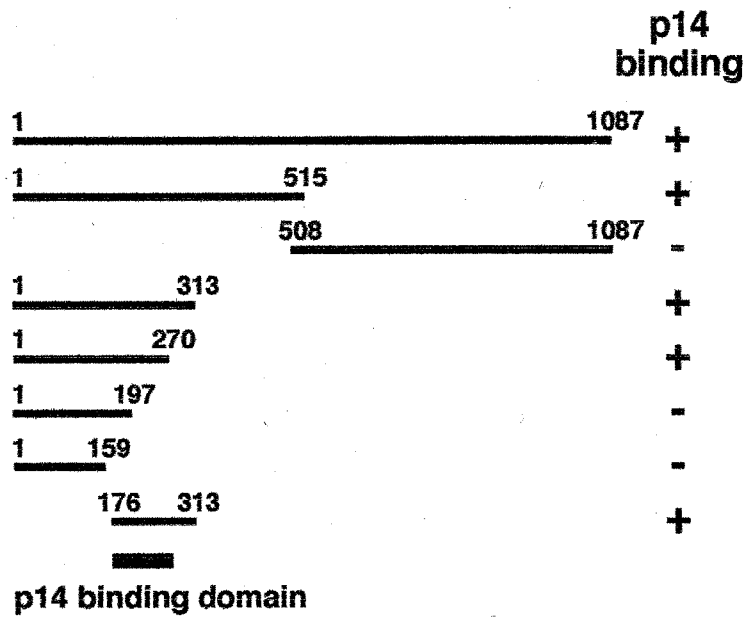
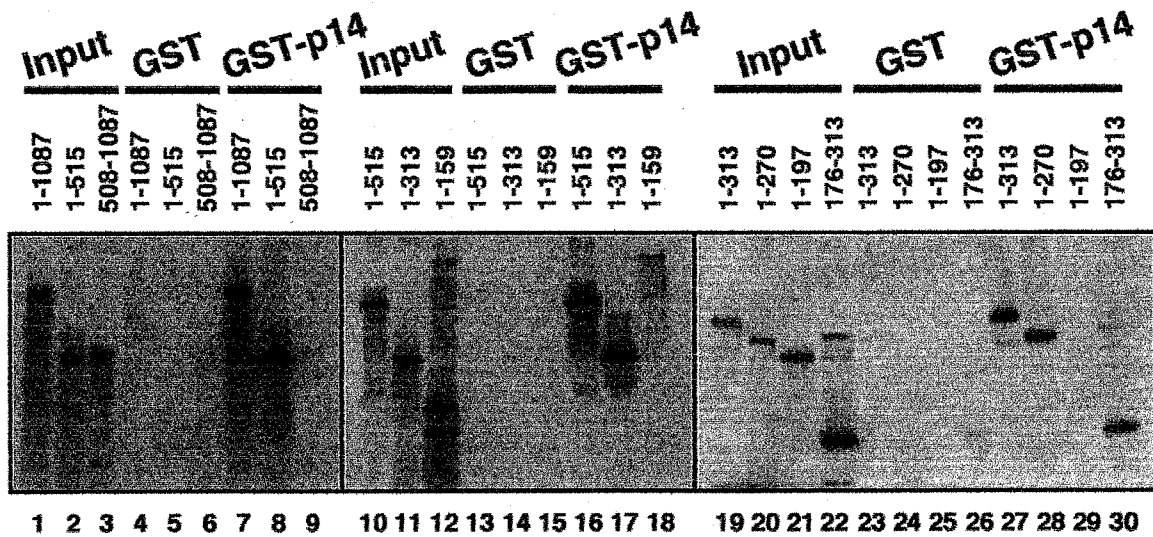
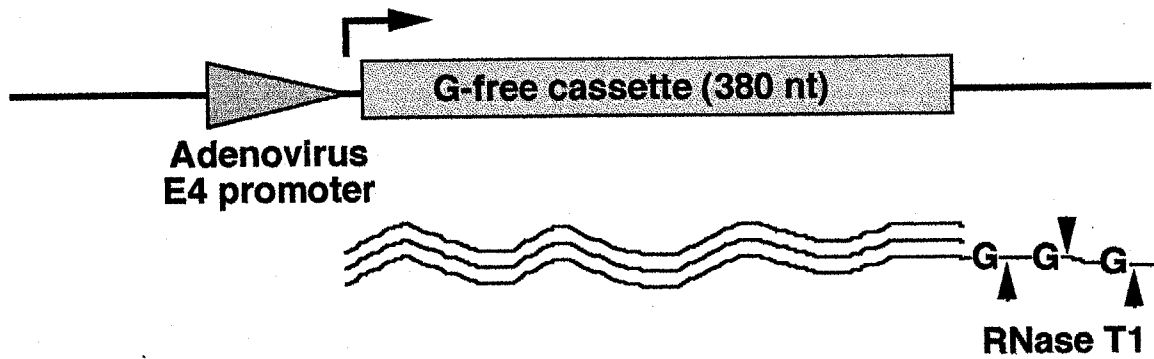
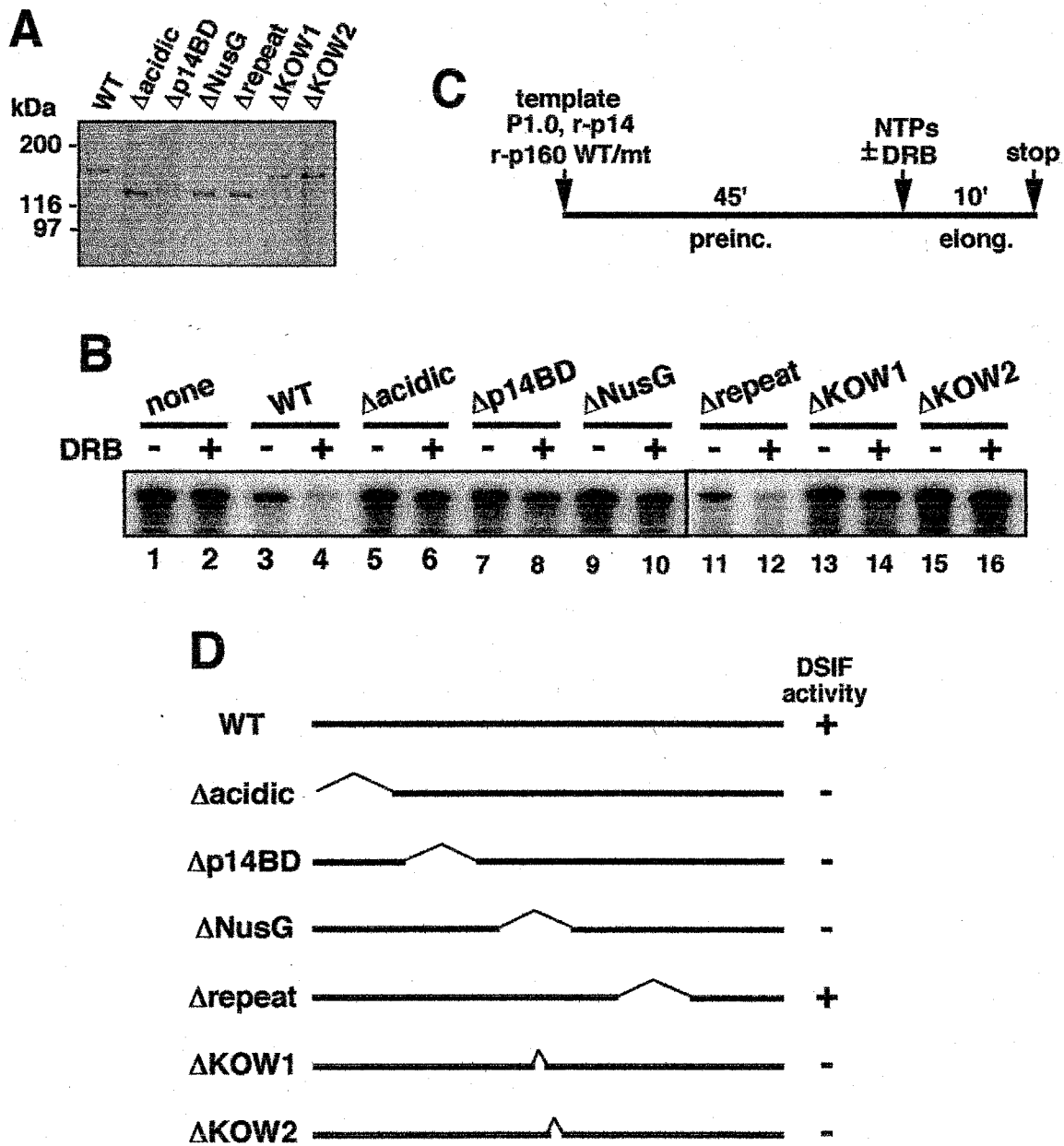


Figure 2.6 Region of p160 responsible for p14-binding. Various forms of [<sup>35</sup>S] labeled p160 were produced in vitro, and their interactions with GST-p14 were analyzed as in Figure 2.5. These results are summarized below.



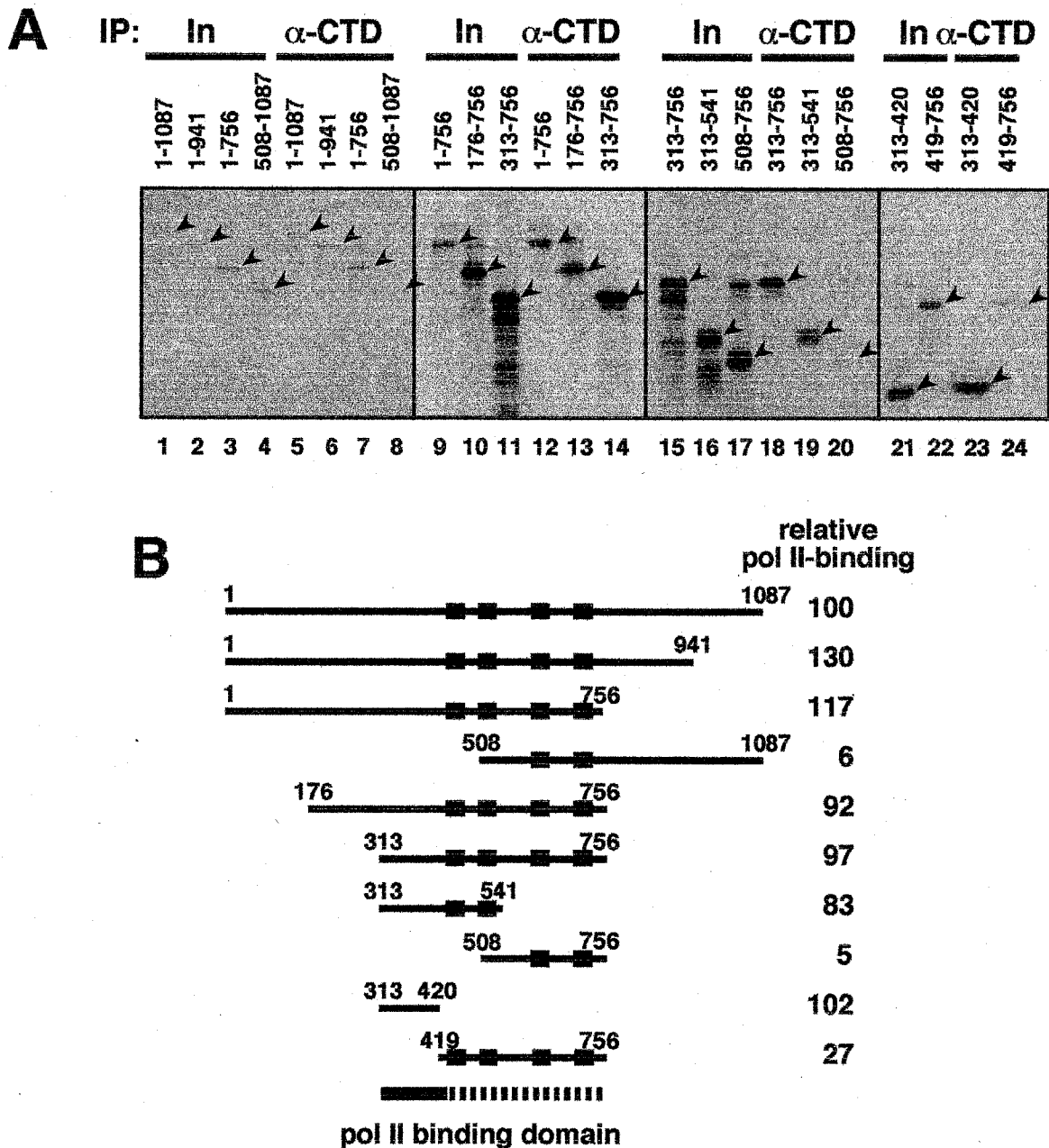
- 1) incubate transcription components with the template for 45 min at 30 °C
- 2) initiate transcription by addition of NTPs lacking CTP
- 3) elongate transcription for 10 min in the presence of RNase T1

**Figure 2.7 In vitro transcription assay.**

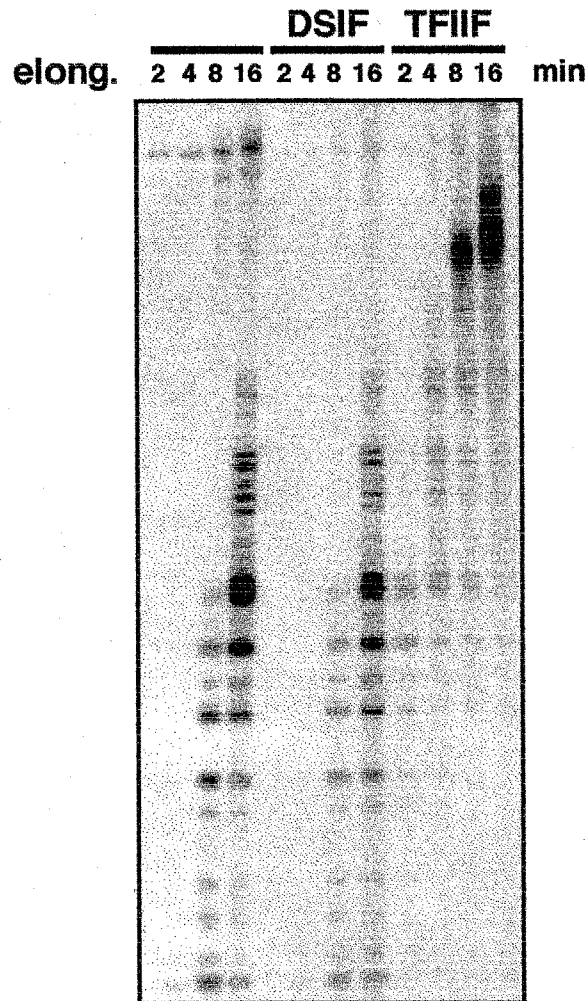
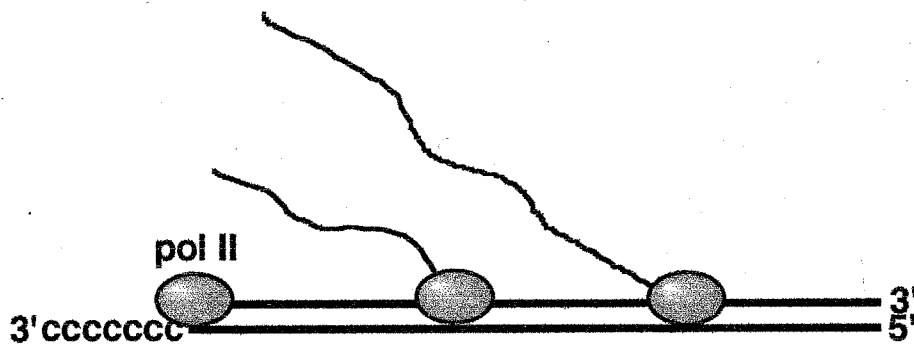


**Figure 2.8** Regions of p160 required for its function. (A) SDS-PAGE analysis of a series of p160 deletion mutants. r-p160 wild type and various mutants were expressed and purified from *E. coli*, as described in Materials and Methods. Aliquots of these proteins (20 ng) were subjected to 7.5% SDS-PAGE, and stained with silver. The positions of size markers are indicated to the left. (B) DRB sensitivity-inducing activity of the p160 mutants. r-p160 wild type and mutants were assayed for their DSIF activity, as diagrammed in (C). Three different preparations of the recombinant proteins were tested expect for Dp14BD, and the representative experiment was shown. These results are summarized in (D).

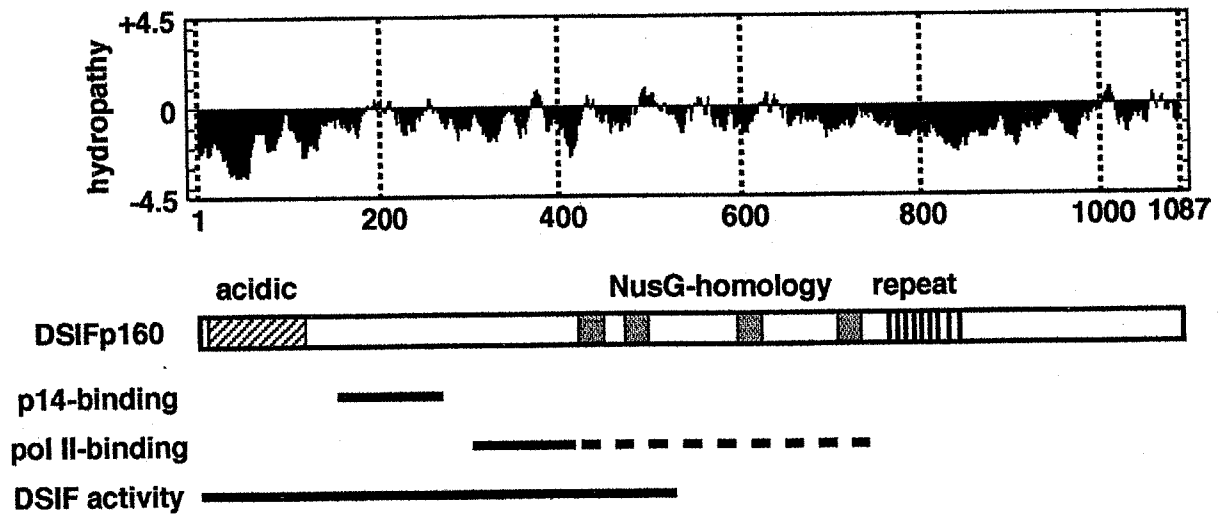




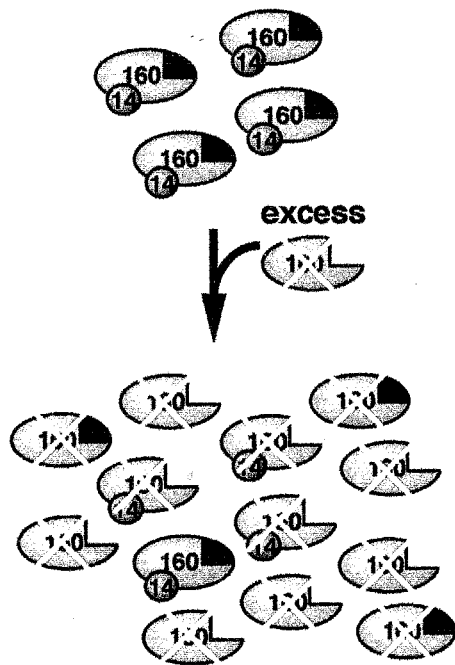
**Figure 2.9 Mapping the region of p160 involved in pol II-binding.** (A) In vitro translated p160 wild type or its derivatives were incubated with purified pol II (250 ng) and anti-CTD (8WG16) monoclonal antibody (BabCo) (2  $\mu$ g) for 2 h at 4 C in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 8.0), 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA and 1 mM DTT. The immunocomplexes were precipitated with protein G Sepharose, washed three times with the same buffer, eluted with SDS sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE and fluorography. Input (In) lanes represent 10% of the inputs. (B) Summary of the results. Relative bindings to pol II are calculated using NIH Image software, and are indicated to the right. Wild type binding is expressed as 100. The positions of the KOW motifs are indicated by black boxes.



**Figure 2.10** Elongation assays using an oligo dC-tailed template. Effect of DSIF on pol II elongation was directly determined using an oligo dC-tailed template as described in Materials and Methods. DSIF showed no detectable effect on pol II elongation, while TFIIF greatly enhanced elongation.



**Figure 2.11** A modular structure of p160. Results of deletion analyses were schematically summarized. Regions required for p14-binding, pol II-binding, and DSIF activity were indicated with thick bars. Also shown at the top is a hydropathy plot of Kyte and Doolittle. The N-terminal acidic region is very hydrophilic, while the p14-binding region is relatively hydrophobic.

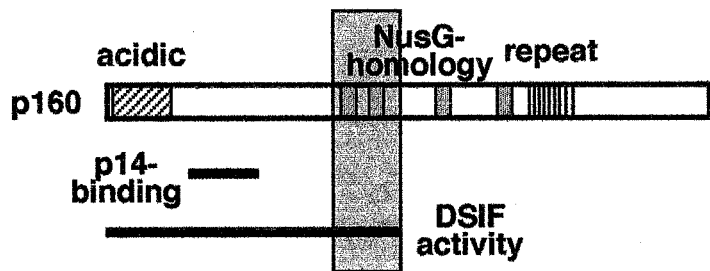


**REQUIREMENT**

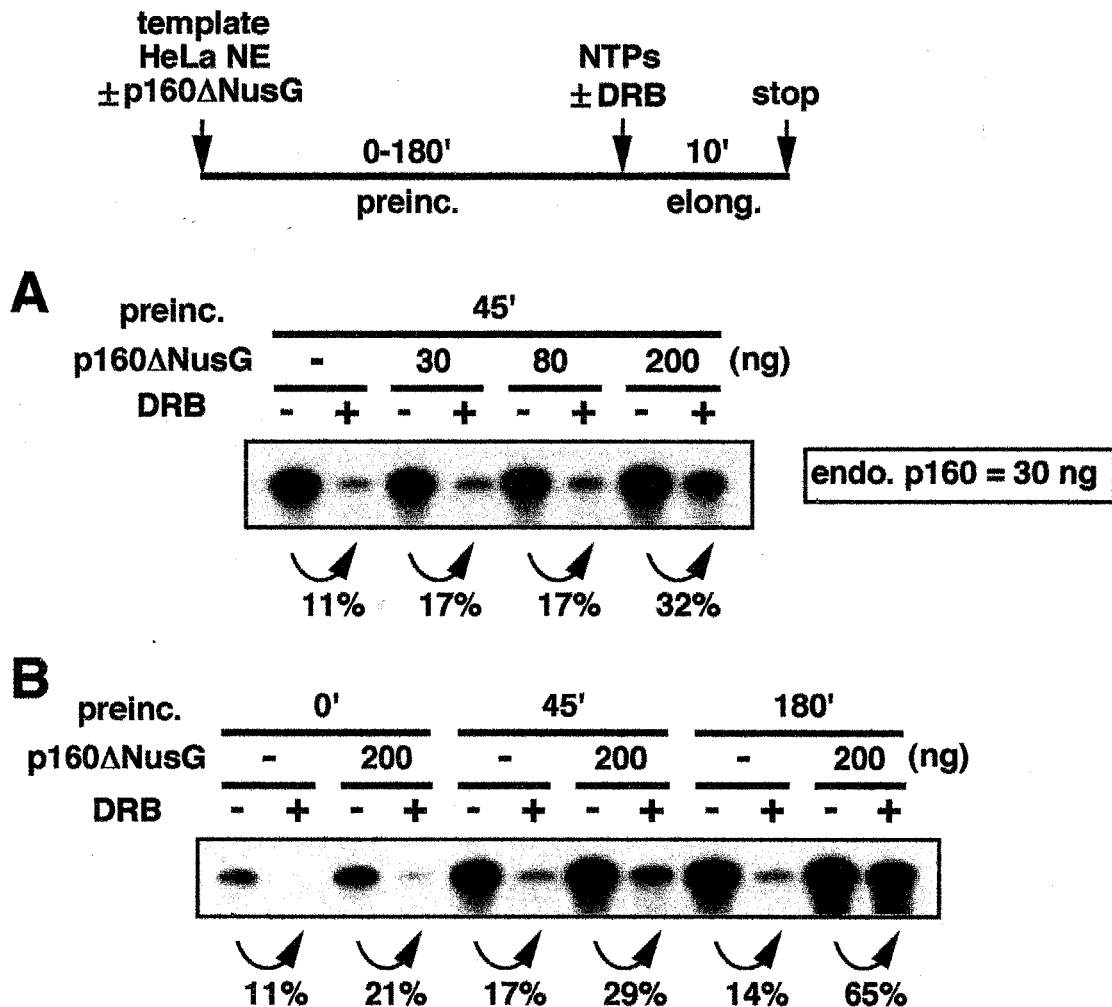
- forms a complex with other component(s)
- lacks some function(s)

**USEFULNESS**

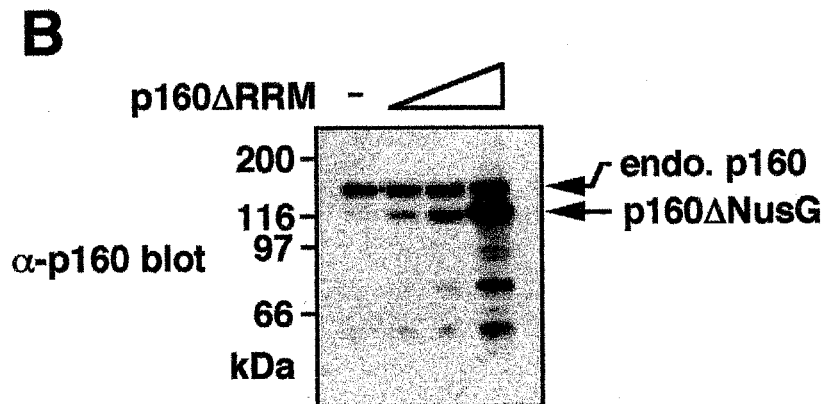
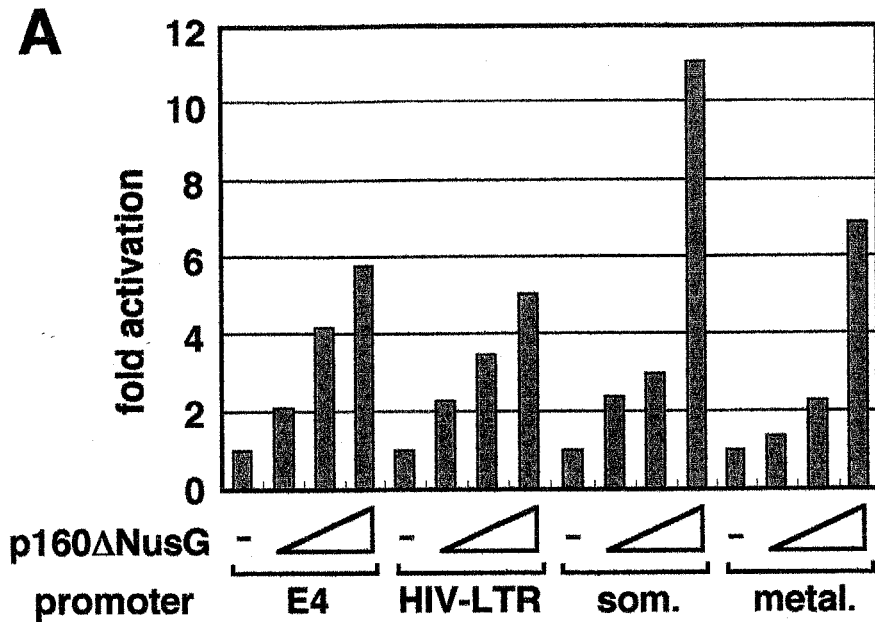
- The factor's function can be analyzed by reducing its activity in vitro or in vivo.



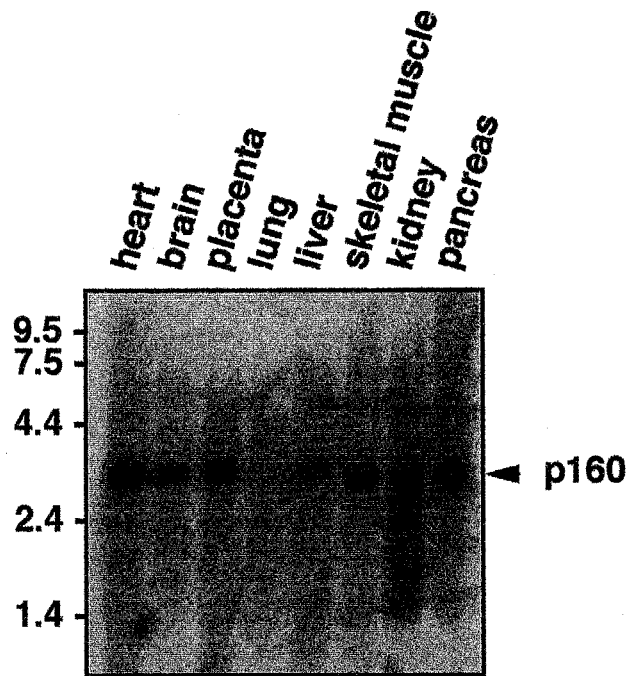
**Figure 2.12 Dominant negative mutant.**



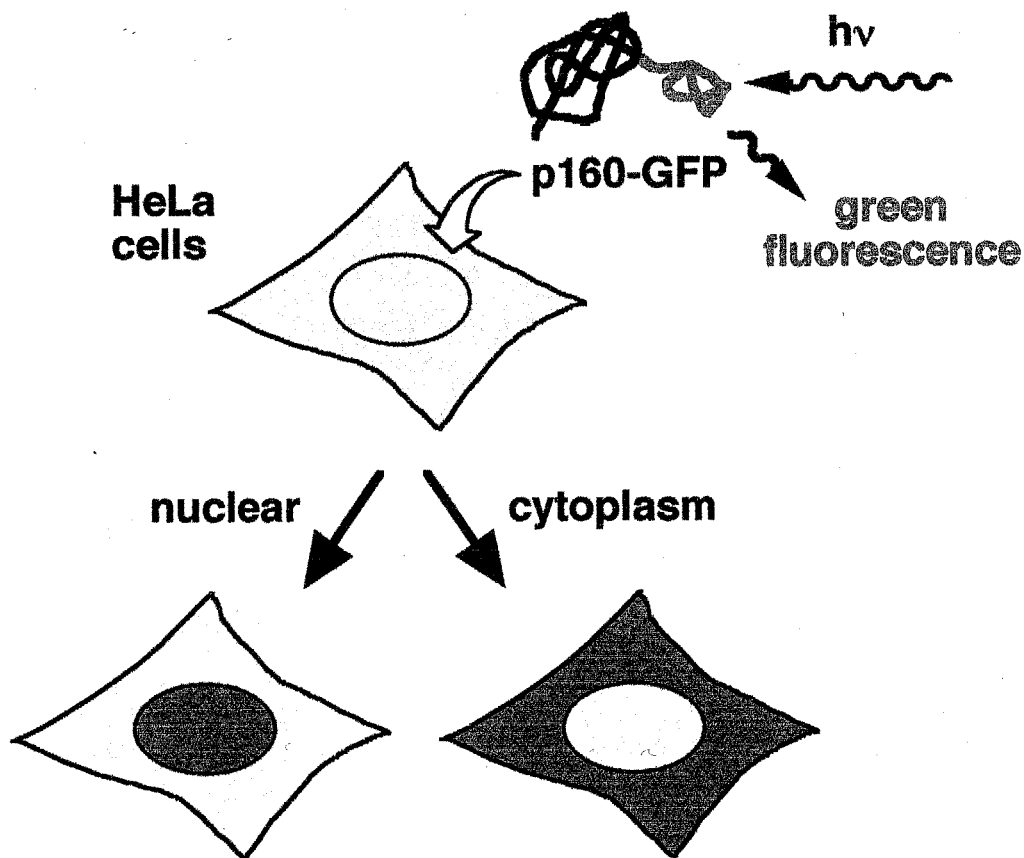
**Figure 2.13 Identification of a p160 mutant that acts in a dominant-negative manner in vitro.** (A) and (B) Indicated amounts of p160 ΔNusG protein were incubated with HeLa nuclear extract (NE) and template for indicated time, and transcription reactions were carried out as diagrammed at the top. The transcripts were quantified by BAS image analyzer (Fuji). The relative inhibition by DRB was calculated and shown below.



**Figure 2.14 DSIF represses transcription from various promoters in vivo.** (A) Reporter plasmid (5  $\mu$ g) containing either adenovirus E4 promoter (E4), HIV long terminal repeat (LTR), mouse somatostatin promoter (som.), or mouse metallothionein promoter (met.) was cotransfected with pCMV-FLAGp160DNusG (0.2, 1, 5  $\mu$ g) into HeLa cells as described in Materials and Methods. Obtained luciferase activities were normalized by protein amount, and expressed as fold activation. (B) The same representative samples were also examined for expression of p160. The cell lysates (10  $\mu$ g) were analyzed by immunoblotting with anti-p160 monoclonal antibody. The positions of the expressed mutant and the endogenous (endo.) p160 are indicated by arrows.

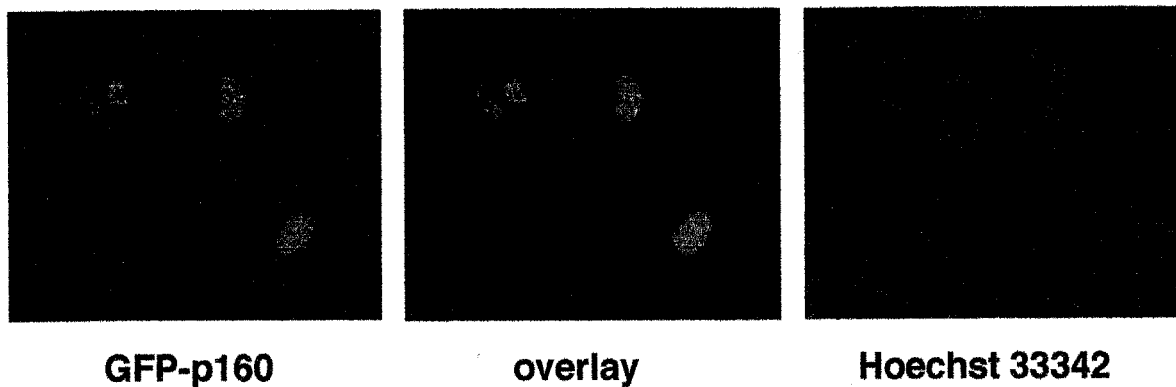


**Figure 2.15** Northern blot analysis of p160. A multiple tissue Northern blot (Clontech) containing 2 mg of poly(A)<sup>+</sup> mRNA per lane was probed for p160 expression. Northern blotting was performed using a standard technique with a random-labeled 417 bp fragment (from 1528 to 1944 nucleotides) of the p160 cDNA. A human  $\beta$ -actin probe (Clontech) was also used to confirm equivalent loading of intact RNA (not shown). The positions of size markers (in kb) are indicated to the left.

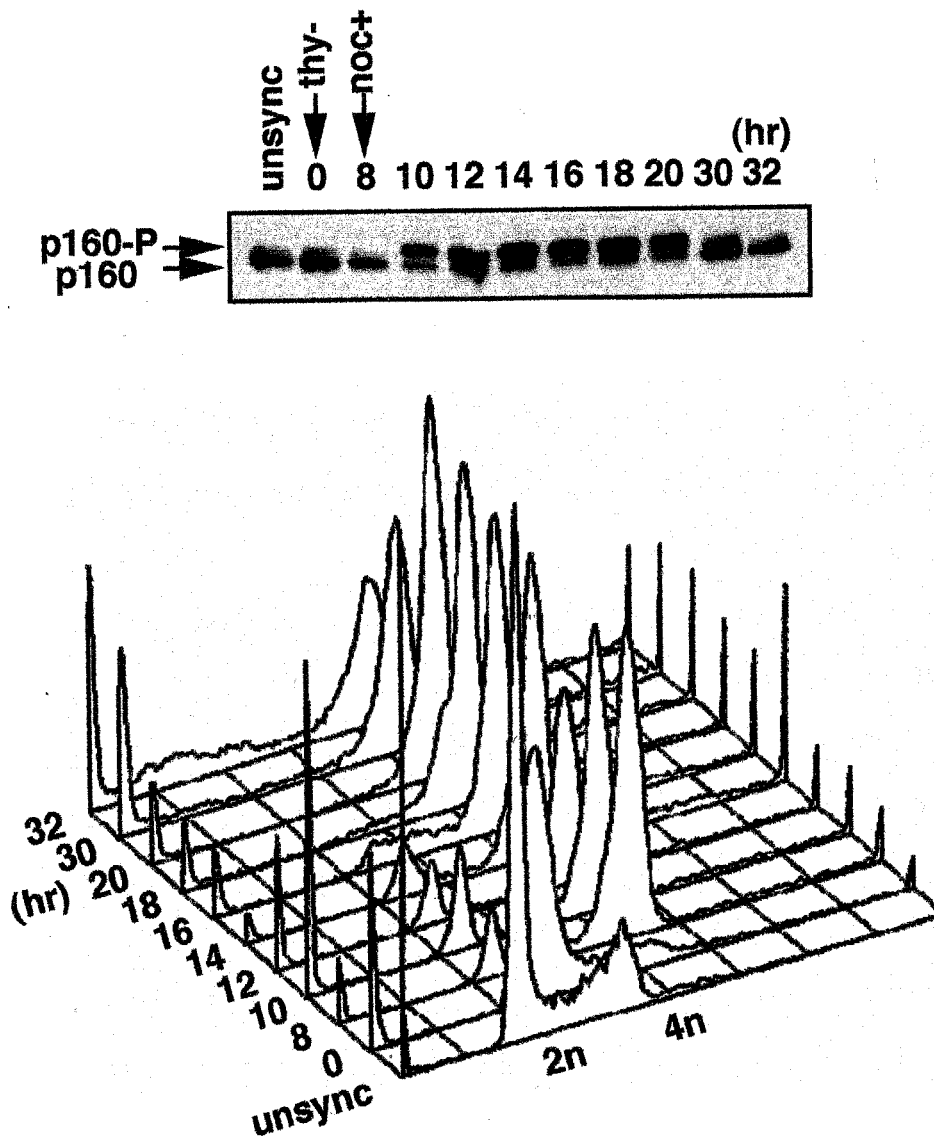


**Figure 2.16 Determination of subcellular localization using GFP. The jellyfish green fluorescence protein (GFP) yields a bright green fluorescence when expressed in cells and illuminated by blue or UV light. Detection of GFP can be performed with living cells. GFP-fusion to a heterologous protein allows for its in vivo localization.**





**Figure 2.17** Subcellular localization of p160. pEGFP-p160 was transfected into HeLa cells. 48 h post transfection, cells were treated with 2  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 for 30 min and examined with the fluorescence microscopy Axiovert (Carl Zeiss). The images were overlaid using the Photoshop software (Adobe).



**Figure 2.18 Cell cycle-dependent phosphorylation of p160.** HeLa cells were synchronized using a double thymidine block and a subsequent nocodazole block. 40 ng/ml nocodazole was added 8 h after the release from G1 arrest and removed 30 h after the release. At the indicated time, aliquots of cells were either lysed for immunoblotting or fixed for FACS analysis. Electrophoretic mobility of p160 was changed due to phosphorylation during mitosis.

## 第3章 新規転写伸長因子 NELF の同定と精製

### 3.1 序論

DRB を用いた解析を通して、新規転写因子 DSIF の同定に成功した。しかし DRB の作用機構を明らかにしていくためには、より精製された系で DRB 依存的な転写阻害を再構成する必要がある。そこでまず、そのような転写系を確立し、もし存在するならば DRB の作用に関わる他の因子を同定することを本章の目的とした。そしてこうしたアプローチにより、DRB の作用機構を明らかにしていこうと考えた。

私がこうした課題に取り組んでいたとき、他のグループにより DRB の直接の標的であろうと思われる因子が同定された。それは P-TEFb (positive transcription elongation factor b) と呼ばれる転写伸長因子で、その実体は cyclin T と CDK9 (PITALRE) からなるタンパク質リン酸化酵素だった (図 3.1; Marshall と Price 1992, 1995; Marshall ら 1996; Zhu ら 1997; Peng ら 1998)。P-TEFb は pol II CTD を高度にリン酸化し、そのキナーゼ活性および伸長促進活性は DRB によって著しく阻害される。P-TEFb はまた HIV (human immunodeficiency virus) の Tat タンパク質と結合し、Tat による転写活性化に関与していることが示されている (Mancebo ら 1997; Zhu ら 1997; Wei ら 1998)。

P-TEFb の作用機構として、図 3.2 のようなモデルがたてられている。すなわち、P-TEFb は CTD をリン酸化することにより伸長反応を促進する。DRB はそのリン酸化を阻害することで伸長反応を阻害する。しかしこのモデルには少なくとも2つの問題点がある。第一に、P-TEFb のリン酸化の標的は本当に CTD なのか？ 2つの事柄が対応しているからといって、必ずしも因果関係がそこに存在する訳ではない。第二に、仮に CTD が標的だとしても、CTD のリン酸化がどのように伸長反応に影響するのか？ CTD・リン酸化の意義は現在の転写研究に残された大きな謎のひとつである。CTD は開始反応から伸長反応にかけて高度にリン酸化される (図 1.3) ため、そのリン酸化は伸長反応に重要な役割を果たしていると多くの研究者が信じているが、これまでその関連性を明確に示した報告は全くない。

DSIF と P-TEFb が共に、DRB 依存的な転写阻害に関わっていることから、これらの因子が機能的に相互作用している可能性が考えられた。そこで、本論文では割愛するが、これらの関係をクルードな *in vitro* 転写系で解析し、P-TEFb が DSIF の負の作用を取り去ることにより転写を活性化する、という結果を得た (Wada ら 1998b)。しかしながら、クルードな系ではさらなる反応機構の解析が困難であり、前述のように、より精製した系の確立が望まれた。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 転写因子と pol II の調製

DRB 感受性を示す転写再構成系を確立するため、P1.0 を HGE.1 に対して透析した。これを同バッファーで平衡化した 60 ml の DEAE (diethylaminomethyl) Sepharose FF カラム (Amersham Pharmacia) にアプライした。カラムを同バッファーで洗浄後、結合タンパク質を HGE.3, HGE1.0 を用いて溶出した。0.3 M 画分を 1.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含んだ HGE に対して透析し、Phenyl Superose HR5/5 カラム (Amersham Pharmacia, 1.0 ml) にアプライした。結合タンパク質を 1.0 M から 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の 15 ml の直線勾配で溶出した。

基本転写因子の分布は、それぞれに対する抗体を用いたイムノブロッティングにより追跡した。Phenyl の素通り画分には TFIID, TFIIH および pol II が含まれていた。転写反応はまずこれらのカラム画分を用いて再構成し、後に TFII B, TFII E, TFII F を組換えタンパク質で置き換えた。これら組換えタンパク質の調製法は Wada ら (1998a) の方法による。

#### P.1/P.3 conc

P.1 と P.3 を 12 ml ずつ混合し、固体の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を飽和するまで加えて 4°C で一晚放置し、4°C、13,600 x g で 30 分遠心することにより、塩析したタンパク質を沈澱させた。沈澱を 3 ml の 0.5xHGE.05 に溶解し、同バッファーに対して透析した。

#### P-TEFb

本研究で用いた P-TEFb は、HeLa 核抽出液を部分精製した画分である。その存在は、P-TEFb の CDK9 サブユニットに対する抗体 (Santa Cruz) を用いたイムノブロッティングにより追跡した。P-TEFb の多くは P1.0 に含まれており、上記のカラム画分を調べたところ、Phenyl の結合画分に見い出された。この活性画分をプールして、P-TEFb として用いた。

#### pol II

図 3.12 で用いた pol II は Usuda ら (1991) の方法に従って精製した。図 3.14 で用いた pol II $\alpha$  および pol II $\alpha$  は Kim と Dahmus (1988) および Lu ら (1991) の方法により精製した。また、pol II $\beta$  は Buratowski と Sharp (1991) の方法に従い、pol II $\alpha$

を 30℃で 30 分、0.25 µg/ml のキモトリプシンで限定分解することにより調製した。

### 3.2.2 in vitro 転写再構成系

転写の鋳型としては、スーパーコイルしたプラスミド pTF3-6C<sub>2</sub>AT および pML-dC<sub>2</sub>AT を用いた。これらはアデノウイルスの E4 および主要後期遺伝子プロモーターの支配下で、380 および 270 塩基のグアニン塩基を含まない転写産物を合成する (Watanabe ら 1990; Wada ら 1991)。pTF3-6C<sub>2</sub>AT (25 ng), pML-dC<sub>2</sub>AT (225 ng), および様々なタンパク性因子を含んだ 20 µl の反応液を 30℃、45 分間プレインキュベーションし、Wada ら (1998a) の方法で転写反応、およびその後の操作を行なった。P1.0 を用いた転写系においては、2 µl の P1.0 conc (Wada ら 1998a) を用いた。再構成系においては、P1.0 由来の Phenyl の素通り画分 (5 µl), rTFIIB (30 ng), rTFIIE (α, 5 ng; β, 3 ng), rTFIIF [RAP (RNA associated protein) 74, 15 ng; RAP30, 15 ng], そして示された箇所では P-TEFb 画分 (6 µl) を用いた。DSIF に関しては、P.1/P.3 conc (2 µl) あるいは rDSIF (p160, 30 ng; p14, 3 ng) を用いた。

### 3.2.3 NELF の精製

HeLa 核抽出液 120 ml (約 840 mg) より調製した P.3 画分 (約 200 mg) を、HGE を用いて KCl 濃度が 0.15 M になるよう希釈し、これを HGE.15 で平衡化した DEAE Sepharose FF カラム (60 ml) にアプライした。カラムを同バッファーで洗浄し、結合タンパク質を HGE.225, HGE.3 および HGE1.0 を用いて段階溶出した。p160 に対する抗体でイムノプロットングした結果、DSIF は 0.3 M の段階に溶出されたことが分かったが、NELF 活性は 0.225 M KCl の段階に溶出された。0.225 M 溶出画分を 10 mg ずつ、HGE.225 で平衡化した HiTrap Heparin カラム (Amersham Pharmacia, 5 ml) に直接アプライした。カラムを同バッファーで洗浄後、HGE.3 および HGE1.0 を用いて段階溶出した。NELF 活性は 0.3 M KCl の段階に回収された。この画分 (約 5 mg) を、HGE を用いて KCl 濃度が 0.25 M になるよう希釈し、mono Q HR5/5 カラム (Amersham Pharmacia; 1.0 ml) にアプライした。カラムを洗浄後、結合タンパク質を 0.25 から 0.4 M KCl の直線勾配 (15 ml) で溶出した。0.30 M 付

近に溶出される活性画分をプールし、0.75 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を含んだ HGE に対して透析した。これ (約 0.8 mg) を次に Phenyl Superose HR5/5 カラムにアプライし、0.5 から 0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の直線勾配 (15 ml) で溶出した。活性画分をプールし、HGE.1 に対して透析した。これを mono S PC 1.6/5 カラム (Amersham Pharmacia; 0.1 ml) にアプライし、結合タンパク質を 0.1 から 0.35 M KCl の直線勾配 (1.5 ml) で溶出した。NELF 活性は 0.23 M KCl 付近に回収され、66, 61, 59, 58 および 46 kDa のタンパク質が活性と共に溶出された。この NELF 画分を、さらに HGE.1 で平衡化した Superdex ゲルろ過カラム (Amersham Pharmacia; 2.4 ml) にアプライした。NELF の仮のサブユニットは挙動を共にし、分子量約 300 kDa の位置に溶出された。840 mg の HeLa 核抽出液より 2-3  $\mu\text{g}$  の各 NELF サブユニットが得られた。

### 3.2.4 オリゴ dC テンプレートをを用いた転写反応

オリゴ dC テンプレート dC3.8 は報告された方法により調製した (Kitajima ら 1994)。伸長反応には、dC3.8 (100 ng), pol II (0.5-1.5  $\mu\text{l}$ ), そして場合によってはいくつかのタンパク因子を、20  $\mu\text{l}$  の 6 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 0.5xHGE.05 中で 30°C、30 分間プレインキュベーションした。ここに 3  $\mu\text{l}$  の NTP mix (終濃度 50  $\mu\text{M}$  ATP/CTP/GTP, 10  $\mu\text{M}$  UTP, および 1  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] UTP) を加えて、伸長反応を開始した。その 2, 4, 8, 16 分後に反応液を 5  $\mu\text{l}$  ずつ分取し、反応を停止させた。転写産物をフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈澱にて回収し、40 cm 長の 8% 尿素変性 PAGE で解析した。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 組換え転写因子の調製

冒頭でも述べたとおり、HeLa 核抽出液をホスホセルロースカラムにかけると、DSIF は P.3 に、ほとんどの基本転写因子と pol II は P1.0 画分に溶出された (図 1.8)。そこで P1.0 を更に分画し、転写反応の再構成を試みた。

再構成の過程で、3つの基本転写因子 TFIIIB, TFIIIE, TFIIIF は組換えタンパク質で置き換えることができた。これらの調製法を図 3.3 に示す。TFIIIB は His 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、ニッケルカラムで精製した。TFIIIE は2つのサブユニット  $\alpha$  と  $\beta$  からなるが、これらは別個に大腸菌で発現させ、数本のカラムを通すことにより精製した。TFIIIF も RAP74 と RAP30 という2つのサブユニットからなるが、これらはバキュロウイルスを用いた発現系で昆虫細胞にて共発現させ、カラムを2本通すことにより精製した。それぞれの因子の最終標品を CBB (Comassie brilliant blue) 染色し、精製度を確認した。

一方、DSIF は2種類の標品を用いた (図 3.4)。一つはクルードで、P.1 と P.3 を等量混合し、硫酸アンモニウム沈澱して濃縮したものである。もう一つは、p160 と p14 を His 融合タンパク質として別個に大腸菌で発現・精製し、等モル比で混合したものである。p160 はニッケルカラムで精製した時点で分解産物が多かったため、プレパラティブな SDS-PAGE によって分子量に基づいて分画し、全長のサイズのものを再生して用いた。

#### 3.3.2 DRB の効果を示す in vitro 転写再構成系の確立

P1.0 を DEAE Sepharose、Phenyl Superose と2本のカラムにかけたところ、基本転写因子と pol II は図 3.5A のような分布を示した。この時点で、TFIID, TFIIH, pol II を含む Phenyl の素通り画分 ( $\phi$ FT) と、3つの組換え基本転写因子 rTFIIIB, rTFIIIE, rTFIIIF とにより転写反応を再構成することができた。元々の P1.0 を用いた転写系およびこの再構成系に2種類の DSIF 標品を加えて DRB 感受性を比較した (図 3.5B)。すると P1.0 の系では、これまでの結果と一致して、どちらの DSIF 標品も DRB 感受性を誘導した (レーン 1-6)。一方、再構成系においてはクルードな DSIF は DRB 感



受性を誘導したが、精製 DSIF は DRB 感受性を誘導することができなかった (レーン 7-10)。この結果、クルードな DSIF 標品中に、DSIF 以外に DRB 依存的転写阻害に関わる因子が含まれていることが示唆された。

先の結果をまとめると図 3.6 のようになる。転写系と DSIF の 4 通りの組み合わせの中で、共に精製した標品を使ったときのみ DRB 感受性が損なわれた。このことから、P.1 あるいは P.3 に DSIF 以外の DRB 感受性誘導因子が含まれていること、そしてまた、この因子は P1.0 にも存在しており、再構成系では除かれていること、の 2 点が予想された。

この仮説を確かめるため、次の実験を行なった。再構成系の転写反応に rDSIF を加え、さらに濃縮していない P.1 あるいは P.3 を加えてみた (図 3.7)。すると P.3 の量に依存して、顕著に DRB 感受性が誘導された (レーン 11-18)。もちろん P.3 にも DSIF は含まれているが、rDSIF を除くと DRB 感受性が失われた (レーン 3-10) ことから、P.3 画分の効果は DSIF 以外の別の因子が担っていると推定される。P.1 にはこのような活性は認められず (データ示さず)、この因子は P.3 に存在していると思われる。この後の解析結果から、この DRB 感受性誘導因子を NELF (negative elongation factor) と名付けた。

### 3.3.3 新規転写伸長因子 NELF の精製

先ほどの再構成系に rDSIF を加えた反応をアッセイ系として、NELF の精製を行なった。P.3 を次に DEAE Sepharose カラムにかけ、0.225 M, 0.3 M, 1.0 M の KCl で段階溶出した。イムノプロットで調べたところ DSIF は 0.3 M に溶出されたが、NELF 活性は 0.225 M の画分に回収された (図 3.8A)。すなわち、この段階で NELF と DSIF を完全に分離することができた。アッセイ系に 0.225 M 溶出画分 (D.225) を加えていくと、その量に依存して DRB 感受性が誘導され、同時に短い転写産物の蓄積が観察された (図 3.8B)。rDSIF を反応系から除くと DRB 感受性が損なわれることから、この DSIF と NELF の両方の因子がこれらの現象に必須であることが分かった。

これ以降の転写反応には、アデノウイルス E4 プロモーターに加え、転写の解析に

良く用いられるアデノウイルス主要後期遺伝子 (major late gene; ML) プロモーターを使用した。2本のバンドのうち、下の転写産物 (270 塩基) がそれに相当する。これら2つのプロモーターは基本的に同様の振る舞いを示すが、MLプロモーターの方がDRBの阻害効果を受けにくい傾向がある (図 3.12 など)。しかしこれは両者の根本的な性質の違いによるものではなく、単に転写産物の長さの違いによるものだと考えられる。転写産物の長いほうがDRB感受性が高く、またDSIF, NELF, P-TEFbに対する応答性も高いという結果が得られている (データ示さず)。

NELF精製の流れを図 3.9A に示す。DEAE Sepharose の段階でDSIFと分離することができ、更に5本の異なるカラムを通した。しかし精製の過程で、回収されるDRB感受性が徐々に低下することに気が付いた。様々な検討を重ねた結果、P-TEFbが反応系に不足していたことが判明した。イムノブロッティングで調べたところ P-TEFb はアッセイ系にはほとんど含まれておらず、クルードな P.3 由来の NELF 画分から補われていた可能性が高い (データ示さず)。部分精製した P-TEFb 画分を反応に補うと DRB 感受性が回復し、最終的に NELF を精製することができた。図 3.9B は精製の進んだ mono S 画分の調べたものだが、DRB 感受性は P-TEFb 存在下でのみ、20 から 26 番目辺りの画分に検出され、ここに NELF 活性の含まれていることがわかる。mono S 画分のタンパク質を銀染色にて調べたところ、NELF 活性に対応して溶出される5つのバンドが確認できた。一方、一定量の精製 NELF 存在下で、部分精製した P-TEFb の周辺の画分を加えると、イムノブロッティングで確認できる P-TEFb と挙動を共にして、DRB 感受性が誘導された (図 3.9C)。よって、P-TEFb 画分の効果は、確かに P-TEFb 自身が担っているものと考えられる。以上の結果、最終的に DSIF, NELF, P-TEFb という3つの因子に依存して DRB 感受性が誘導される転写再構成系が確立できた。

mono S の NELF 画分をゲルろ過カラムにかけたところ、NELF の候補である5つのバンドは挙動を共にし、分子量約 300 kDa の位置に溶出された (図 3.10)。これらのポリペプチドの SDS-PAGE 上での分子量は 66, 62, 59, 58, 46 kDa である。銀染色で見る限り、5つのバンドはほぼ同程度に染色されたことから、NELF は 1:1:1:1:1 のヘテロペンタマーではないかと予想される。いずれにしてもこの結果、NELF の候

補である5つのポリペプチドは複合体を形成していることが示唆された。これらのバンドを分子量の順に A から E と呼ぶことにする。このようなサブユニット構成を示す因子は知られておらず、NELF は新規の因子だと考えられる。

### 3.3.4 NELF と DSIF による協調的な伸長抑制

次に、NELF と P-TEFb の関係について調べた (図 3.11)。ここでは DSIF を一定量加えてある。P-TEFb 非存在下で NELF を加えると、DRB とは無関係に著しく転写を抑制した (レーン 1-6)。ここに P-TEFb 画分を加えると、この抑制は解除された (レーン 7-12)。回復した転写は DRB によって再び抑制されたことから、P-TEFb 画分の効果は P-TEFb 自身が担っていることが分かる。以上の結果、P-TEFb が何らかの方法で NELF の転写抑制を打ち消すことが判明した。

次に、NELF と DSIF の関係について調べた。ここでは P-TEFb も DRB も反応に加えていない。NELF と DSIF を組み合わせて加えたところ、それぞれ単独ではほとんど影響がなかったのに対し、両者を加えると初めて図 3.11 で見られたような転写抑制が観察され、同時に短い転写産物の蓄積も観察された (図 3.12A)。このことから NELF と DSIF は協調的に働いて転写を抑制するものと考えられる。そこで改めてオリゴ dC テンプレートを用い、これらの因子が pol II の伸長反応に直接作用するかどうか検討した (図 3.12B)。DSIF 単独では先ほど示したように全く影響なかった (レーン 5-8)。NELF 単独では僅かな抑制効果が再現性よく観察された (レーン 9-12)。しかし、両者を共存させると pol II の伸長反応が著しく抑制され、転写産物がほとんど観察されなくなってしまった (レーン 13-16)。以上の結果、DSIF と NELF は pol II に直接作用して伸長反応を抑制することが分かった。

DRB はほとんど全てのクラス II 遺伝子に作用することから、DSIF と NELF の抑制作用もやはり普遍的だと予想される。これまでに同定された基本伸長因子はいずれも pol II の伸長を促進する因子である。DSIF と NELF は pol II の伸長を普遍的に抑制する、新しいカテゴリーの基本伸長因子だと考えられる。

### 3.3.5 pol II CTD のリン酸化による制御

P-TEFbによるリン酸化の標的は pol II の CTD ではないかと示唆されている。もしそれが事実であれば、CTD のリン酸化状態によって NELF と DSIF の抑制効果に違いのある可能性がある。pol II には、リン酸化型の pol IIo、非リン酸化型の pol IIa、そして CTD を欠損した pol IIb の 3 種類のタイプが存在する。先の可能性を検討するため、これら 3 種類の pol II をそれぞれ調製した。pol IIa と pol IIo は、Kim と Dahmus (1988) および Lu ら (1991) の方法により、HeLa 細胞の核ペレットより分離・精製した。ちなみに、これまでに用いてきた pol II は、大部分が非リン酸化型の pol IIa である。pol IIb は pol IIa をキモトリプシンにて限定分解することにより調製した (Buratowski と Sharp 1990)。

これら 3 種類の pol II の転写伸長活性を、DSIF と NELF の存在下または非存在下で調べた (図 3.14)。まず DSIF と NELF の非存在下において、どのタイプの pol II も同様の伸長活性を示した。この結果、CTD の有無、あるいはリン酸化状態は pol II の伸長反応に直接影響しないことが分かった。ここに DSIF と NELF を加えたところ、pol IIa と pol IIb は著しく抑制されたのに対し、pol IIo はまったく抑制効果を受けなかった。従って、CTD のリン酸化は DSIF と NELF による抑制を打ち消す働きを持つことが示唆された。CTD リン酸化の機能的意味についてはこれまでほとんど分かっていなかった。ここで得られた結果から、その作用の一つに、負の伸長因子の作用を取り去る働きがあると考えられる。一方、pol IIb が pol IIa と同様に抑制されたことから、CTD は DSIF と NELF による抑制の局面には必要ないことが分かった。従って、DSIF と NELF が CTD を介して pol II と結合しているというようなことはないと考えられる。

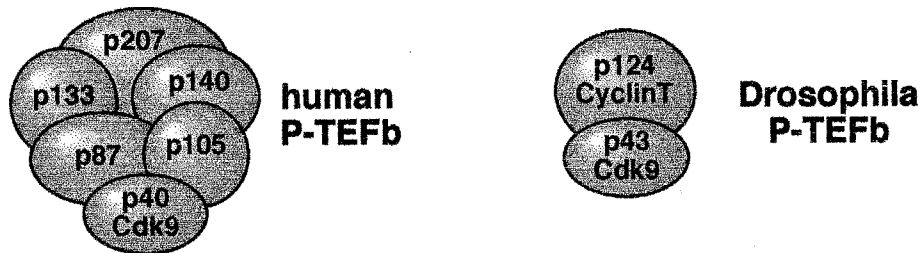
これまでの結果から、DSIF, NELF, P-TEFb の関係、および DRB 依存的転写阻害について図 3.15 のようなモデルがたてられる。DSIF と NELF は協調的に pol II の伸長反応を抑制する。P-TEFb の働きがないと転写は途中で止まってしまいが、通常は P-TEFb が CTD をリン酸化することでこの抑制を打ち消し、転写は最後まで続く。DRB はこの P-TEFb の作用をブロックすることで、伸長反応を阻害する。

### 3.4 まとめ

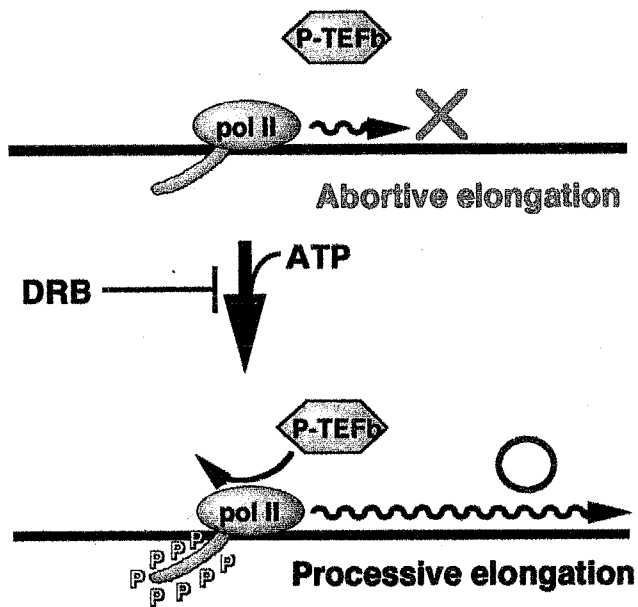
本章をまとめる。

- (1) DRB 感受性を示す転写再構成系を確立した。
- (2) DRB 依存的な転写阻害に関与する新規伸長抑制因子 NELF を同定した。
- (3) NELF は5つのサブユニットからなると思われる。
- (4) NELF は DSIF と協調して、直接 pol II の伸長反応を抑制する。
- (5) この抑制は P-TEFb による CTD のリン酸化で打ち消される。
- (6) 以上の結果、CTD を介した正の因子 (P-TEFb) と負の因子 (DSIF と NELF) による伸長反応制御の仕組みが明らかとなってきた。

- identified as a factor that releases paused polymerase
- CyclinT-Cdk9 complex whose kinase activity is sensitive to DRB
- strongly phosphorylates the pol II CTD
- responsible for transcription elongation stimulated by HIV-encoded activator Tat



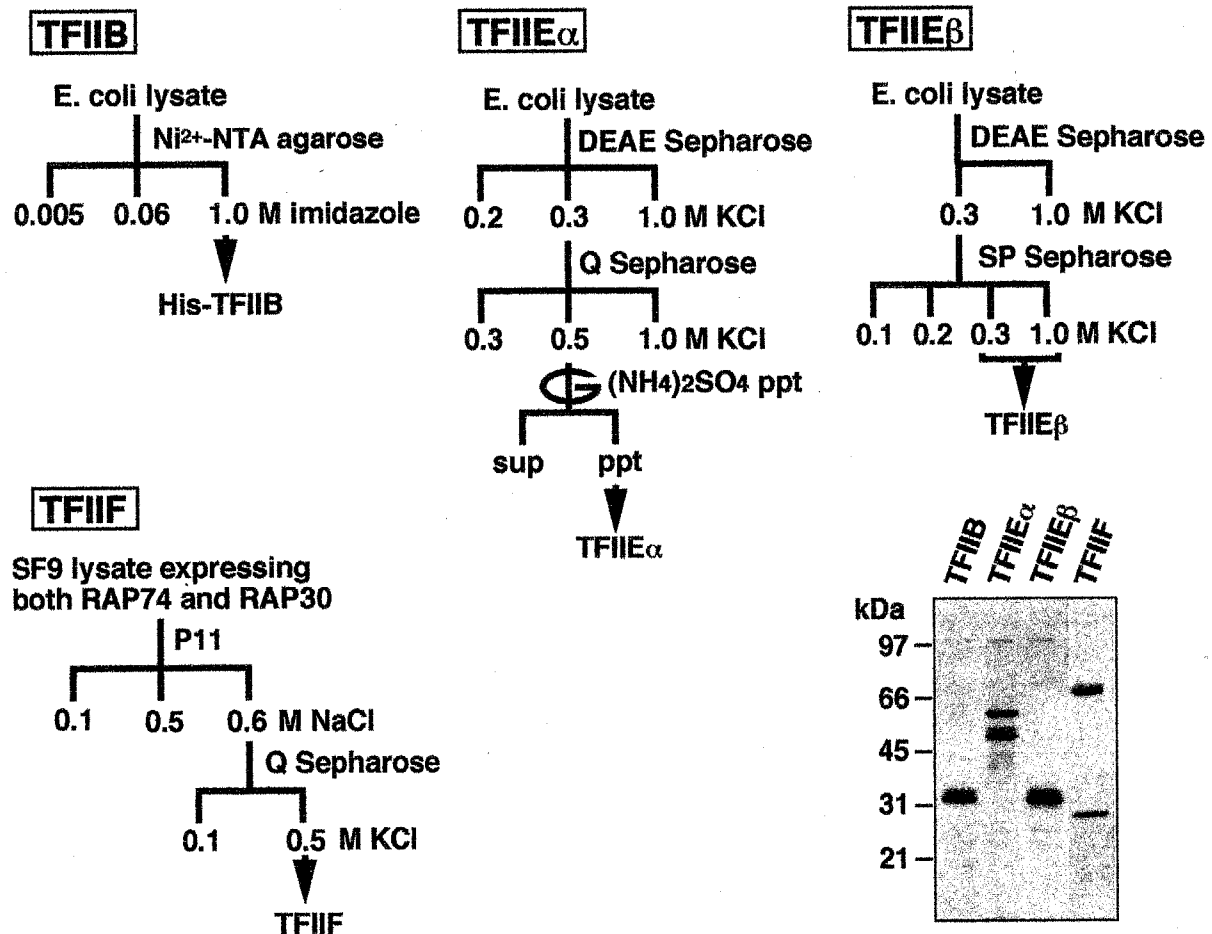
**Figure 3.1 Properties of P-TEFb (positive transcription elongation factor b).**



**Questions**

- Is the functional target of P-TEFb really the pol II CTD?
- If so, how might CTD phosphorylation influence elongation?

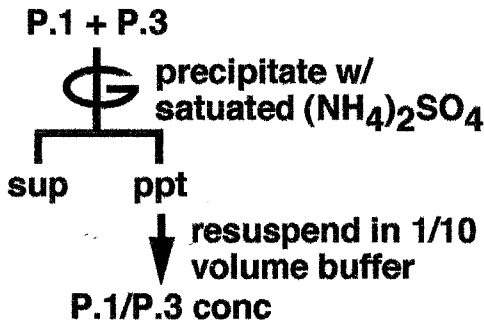
Figure 3.2 P-TEFb, CTD and elongation. See text for the detail.



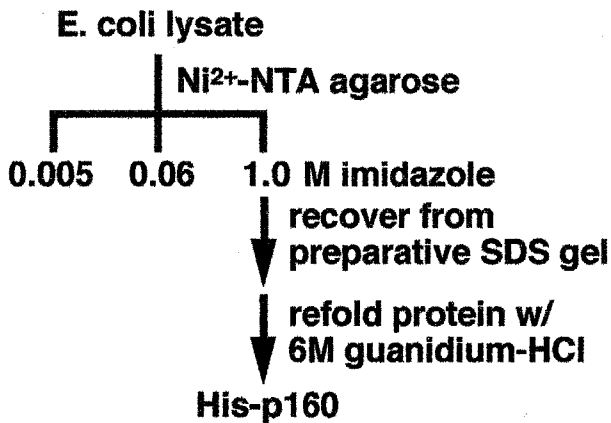
**Figure 3.3 Preparation of recombinant GTFs.** Preparation procedures for rGTFs are schematically summarized. Also shown are the final preparations of rGTFs stained with Commassie brilliant blue.



**P.1/P.3 conc**



**p160**



**p14**

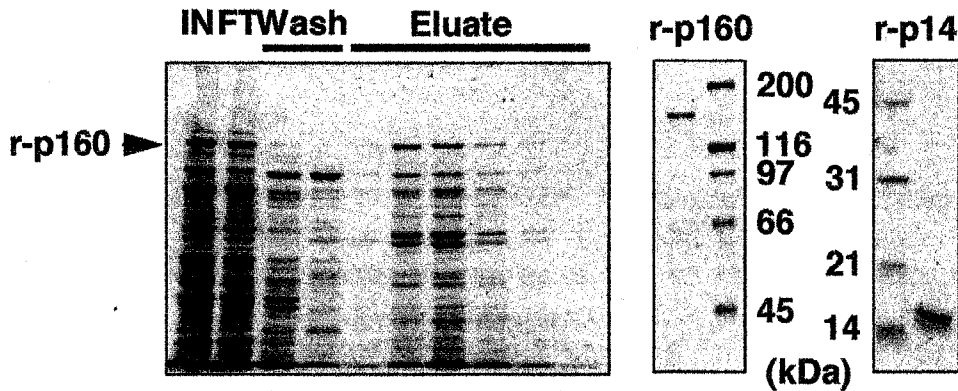
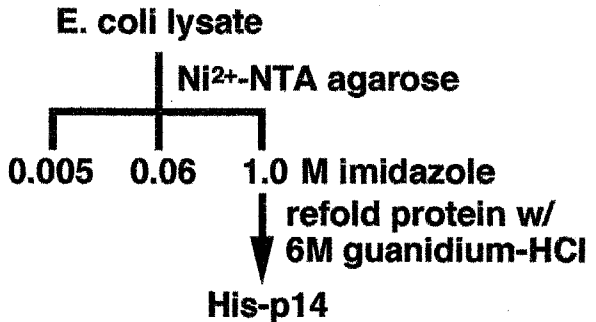
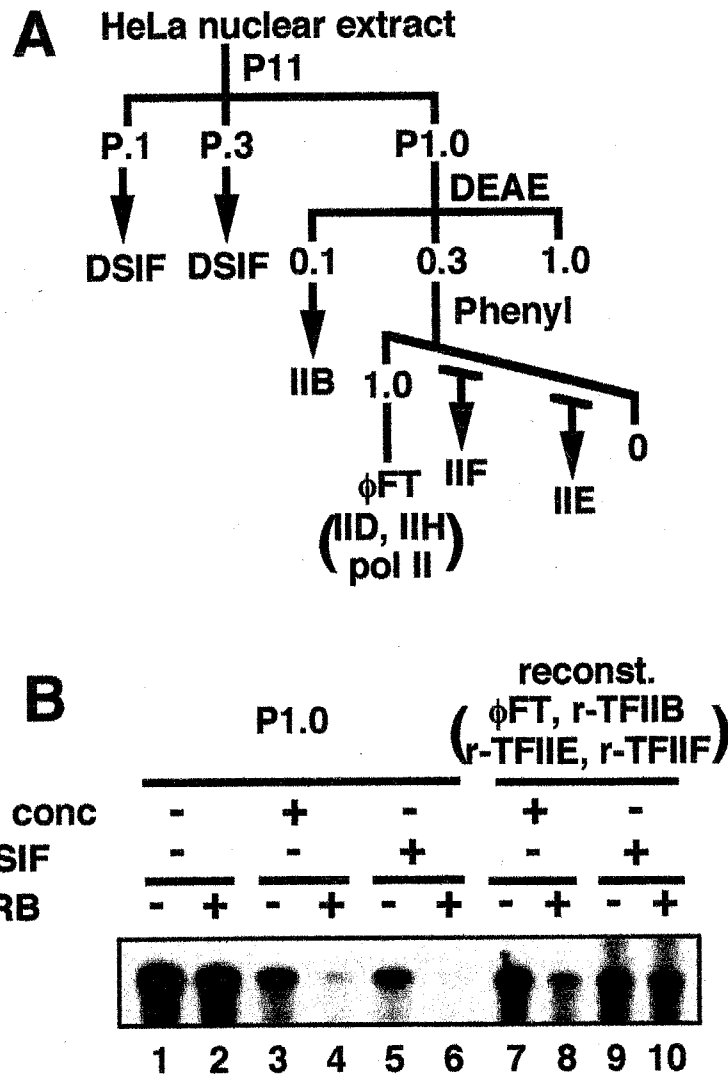


Figure 3.4 Preparation of DSIF. p160 and p14 were expressed in *E. coli* as His-fusion proteins and purified with Ni<sup>2+</sup> affinity column. The r-p160 eluate was contaminated with many degradation products (left), and therefore further purified from preparative SDS-PAGE. The final preparations were shown to the right.



**Figure 3.5 Reconstitution of DRB-sensitive transcription.** (A) Diagram for reconstitution of DRB-sensitive transcription. HeLa nuclear extract was first applied to a phosphocellulose (P11) column, yielding three fractions P.1, P.3 and P1.0. P1.0 was sufficient for transcription in vitro and further fractionated on DEAE Sepharose and Phenyl Superose columns as described in Materials and Methods. (B) Examination of DRB-sensitivity. Using the P1.0 transcription system, both crude (P.1/P.3 conc) and purified (r-DSIF) preparations of DSIF induced DRB-sensitivity (lanes 1-6). Using a reconstitution system employing the Phenyl Superose flow through fraction ( $\phi$ FT), r-TFIIB, r-TFIIIE and r-TFIIF, however, r-DSIF could not induce DRB-sensitivity (lanes 7-10).

**DSIF**

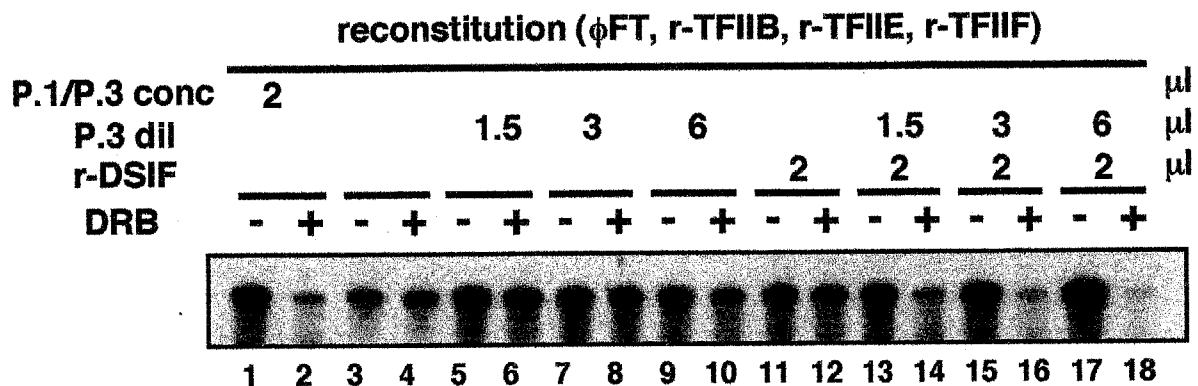
crude ← → pure

transcription system ↑ crude ↓ pure		<b>P.1/P.3 conc</b>	<b>rDSIF</b>
	<b>P1.0</b>	yes	yes
	<b>reconstitution</b>	yes	no

**HYPOTHESIS**

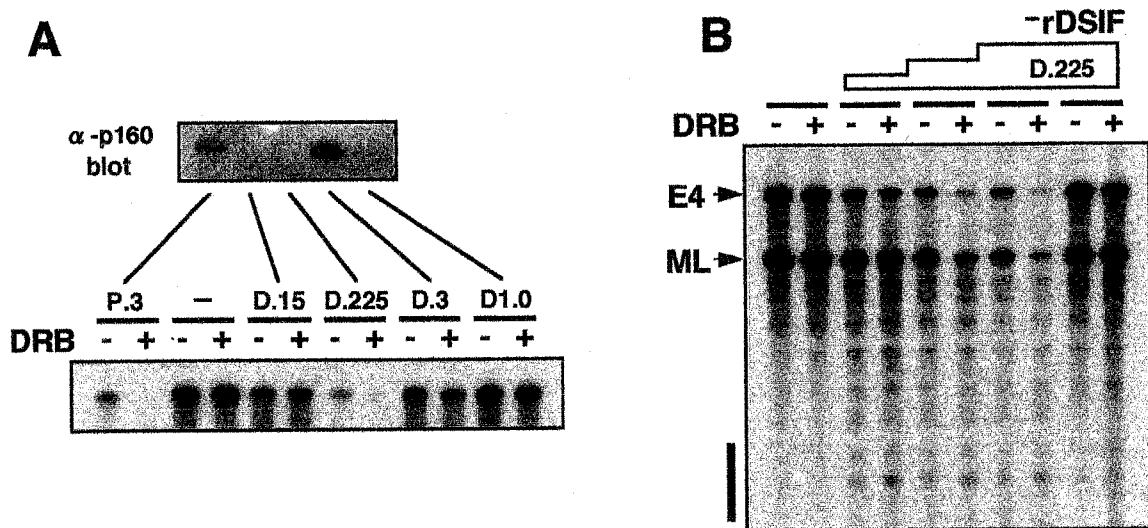
- A factor required for DRB-sensitive transcription in addition to DSIF is present in either P.1 and P.3.
- The factor is also present in P1.0, but is depleted from the reconstitution system.

**Figure 3.6 Interpretation of the result shown in Figure 3.5.**

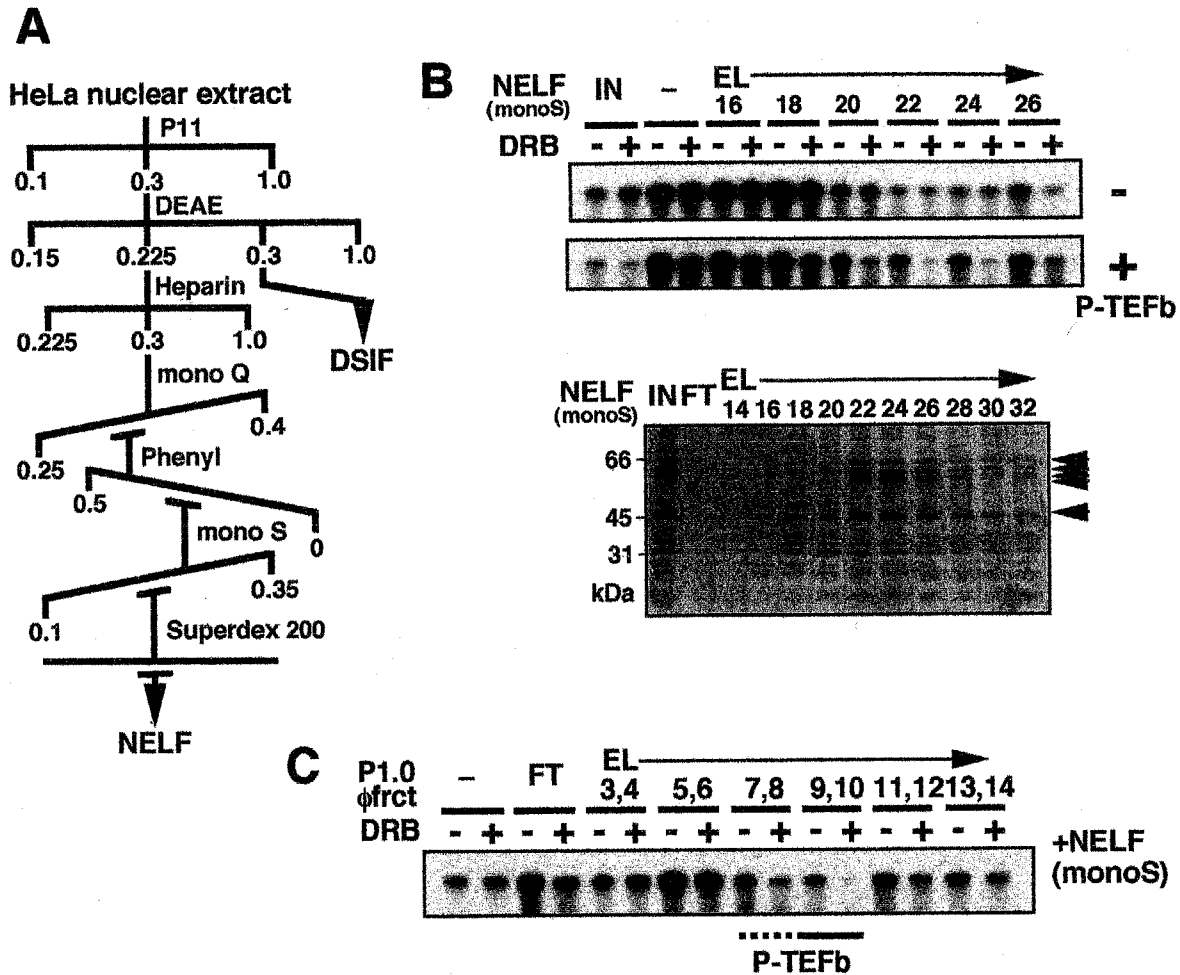


✓ NELF is required for DRB-sensitive transcription in addition to DSIF.

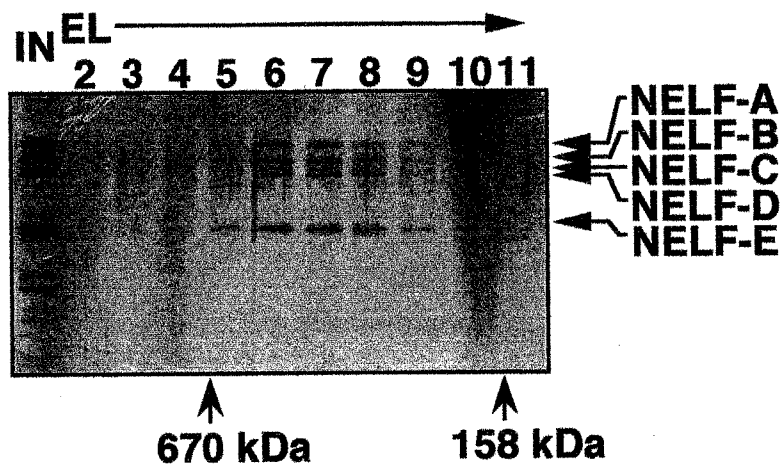
**Figure 3.7 Identification of NELF (negative elongation factor).** Using the reconstitution system employing  $\phi$ FT, r-TFIIB, r-TFII E and r-TFII F, effect of crude and purified DSIF preparations was compared. r-DSIF alone could not induce DRB-sensitivity to this system (lanes 11 and 12). However, further addition of P.3 (P.3 dil) restored DRB-sensitivity (lanes 13-18), suggesting the presence of another DRB sensitivity-inducing activity in P.3. This activity was termed NELF.



**Figure 3.8** Separation of NELF from DSIF on a DEAE Sepharose column. (A) P.3 fraction was subjected to a DEAE Sepharose column and step-eluted with 0.225, 0.3 and 1.0 M KCl. The presence of DSIF p160 was examined by immunoblotting (top). NELF activity was examined using the reconstitution system plus rDSIF (bottom). (B) Increasing amounts of DEAE 0.225 M fraction (D.225) were added. D.225 induced DRB-sensitivity and the production of short transcripts in a dose-dependent manner and DSIF-dependent manner.

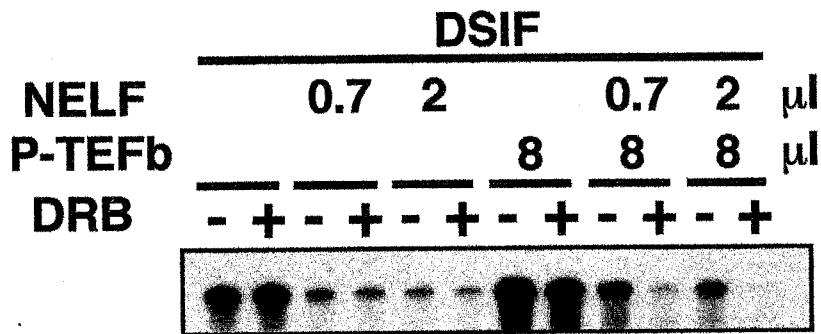


**Figure 3.9 Purification of NELF.** (A) Scheme for NELF purification. NELF was purified from P.3 using a system employing  $\phi$ FT, r-TFIIB, r-TFIIIE, r-TFIIF and r-DSIF. The P-TEFb fraction derived from P1.0 was additionally included in the reactions at the later steps of purification. (B) NELF activity on the mono S column. mono S fractions (2  $\mu$ l) were assayed for NELF activity in the presence or absence of the P-TEFb fraction. NELF activity was found at fractions # 20-26 in the presence of P-TEFb. The mono S fractions (2  $\mu$ l) were also resolved by 7.5% SDS-PAGE and stained with silver. Five different bands of 66, 61, 59, 58 and 46 kDa (indicated by arrows) appeared to be co-fractionated with the activity. IN, input; EL, eluate. (C) Fractions around P-TEFb were assayed in the presence of constant amount of NELF (mono S). The presence of P-TEFb was monitored by immunoblotting with  $\alpha$ -PITALRE antibody.



✓ NELF likely consists of five different subunits with a molecular mass of ~300 kDa.

**Figure 3.10** Gel filtration analysis of NELF. 50  $\mu$ l purified NELF (mono S) was applied to a Superdex 200 gel filtration column. 8  $\mu$ l aliquots of the eluate fractions were analyzed by 7.5% SDS-PAGE and silver-staining. The five polypeptides were co-eluted at an apparent molecular mass of ~300 kDa and termed NELF-A to -E in the order of their molecular weights. Positions of the native molecular weight marker were indicated at the bottom.

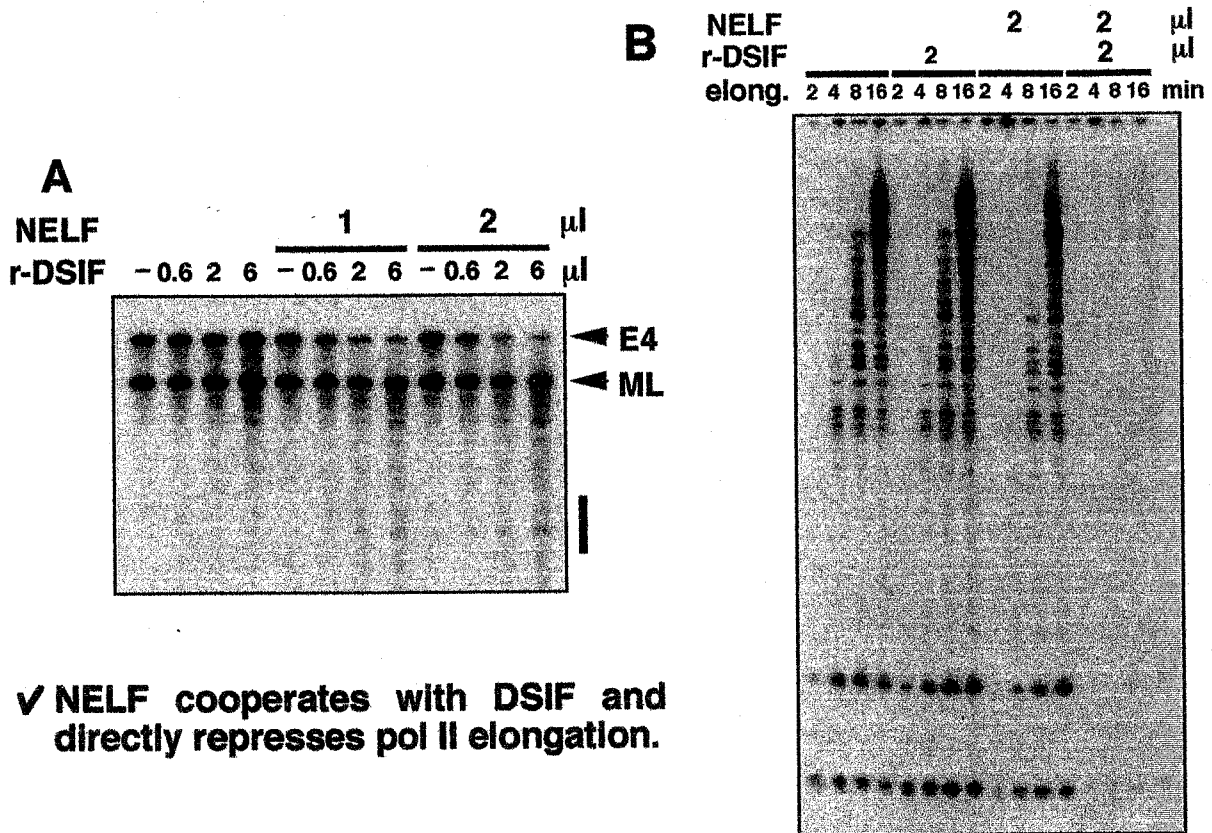


✓ NELF potently represses transcription in the absence of P-TEFb.

✓ P-TEFb reverses its repression.

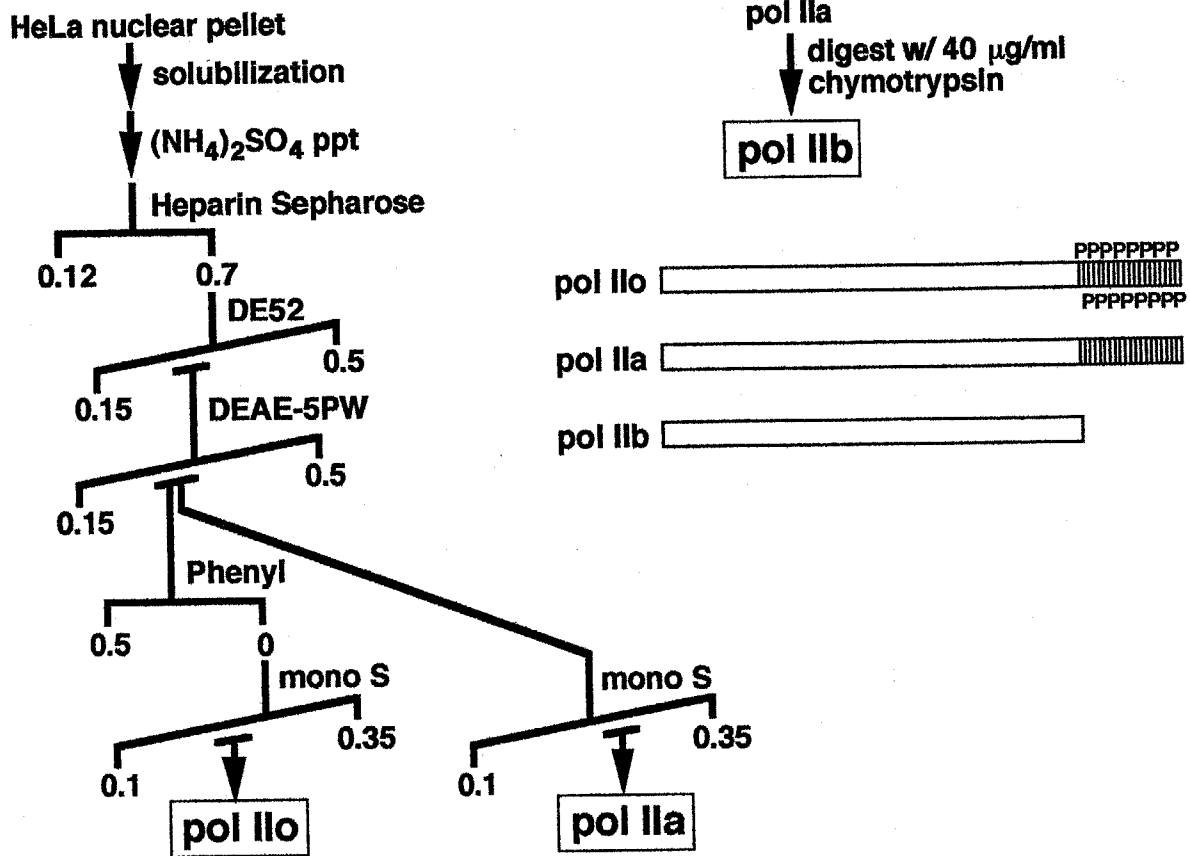
Figure 3.11 Regulation of NELF activity by P-TEFb. Effect of purified NELF (mono S) was examined in the presence or absence of P-TEFb as in Figure 3.10. Without P-TEFb, NELF potently repressed transcription, while in the presence of P-TEFb, the repression was partly relieved in a DRB-sensitive manner.



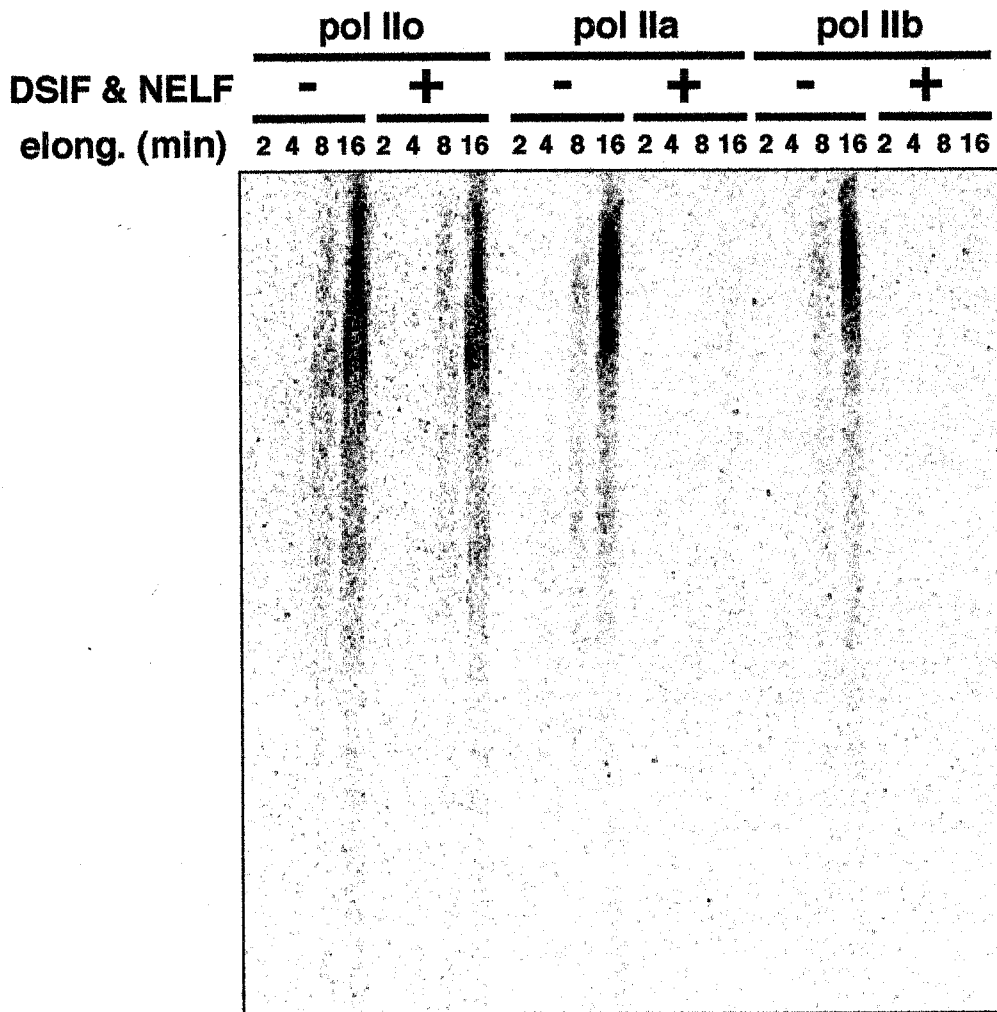


✓ NELF cooperates with DSIF and directly represses pol II elongation.

**Figure 3.12 Synergy between NELF and DSIF. (A) Cooperative action of DSIF and NELF on the promoter-specific transcription. Indicated amounts of r-DSIF and NELF (mono S) were added to the reconstitution system lacking P-TEFb. The two transcripts are generated from the adenovirus E4 and major late (ML) promoters. Transcripts from the ML promoter are less sensitive to DSIF and NELF. The vertical bar indicates the accumulation of short transcripts caused by DSIF and NELF. (B) Cooperative action of DSIF and NELF on the dC-tailed template. Pol II and the dC-tailed template were preincubated with indicated protein factors. NTPs were added, and elongation proceeded for indicated times.**

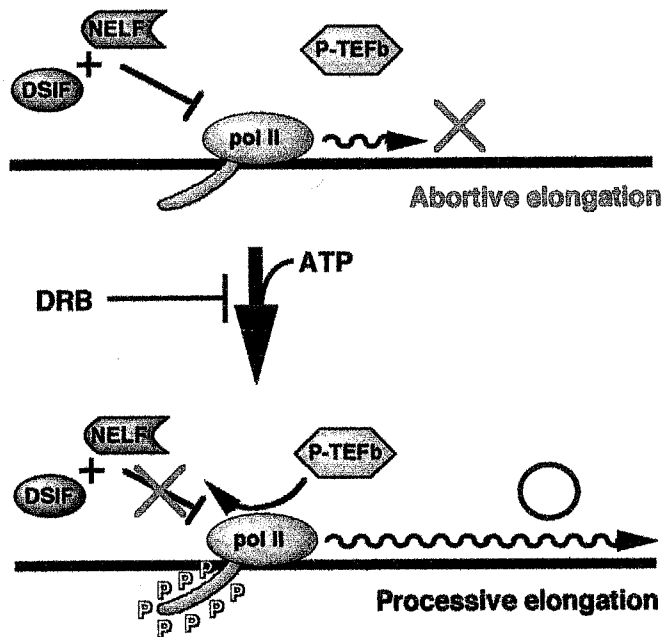


**Figure 3.13 Preparation of pol IIo, pol IIa, and pol IIb. Pol IIa and pol IIo were separated on a series of column chromatography as described. The CTD-truncated form of pol II (pol IIb) was generated by mild digestion of pol IIa with chymotrypsin.**



✓ Pol Ilo and pol Ila show differential sensitivity to DSIF and NELF

Figure 3.14 Effect of DSIF and NELF on different forms of pol II. The different forms of pol II were assayed for elongation on the dC-tailed template in the presence or absence of DSIF and NELF. Pol Ila and pol Iib, but not pol Ilo, were susceptible to DSIF and NELF.



1) DSIF and NELF are negative regulators of transcription elongation.

2) P-TEFb normally anti-represses the negative effect of DSIF and NELF by phosphorylating pol II CTD, thereby allowing transcription to occur.

3) In the presence of DRB, however, the anti-repression reaction is inhibited, and DSIF and NELF continues to repress transcription.

Figure 3.15 A model for the mechanism of action of DRB.

## 第4章 NELFの構造と機能

### 4.1 序論

第3章において、新規転写伸長因子 NELF を同定、精製した。精製 NELF を用いてその機能の一端を明らかにし、NELF は5つの候補サブユニットからなることを示した。しかし、その分子の実体は全く不明であり、その解明なくしてさらなる解析は不可能である。

本章では、第3章で得られた結果をふまえ、NELF の cDNA を単離し、そのサブユニット構造を明らかにすることを第一の目的とした。そしてそこから得られた情報に基づき、NELF が pol II の伸長抑制を引き起こす分子機構を解析することを第二の目的とした。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 NELF-E の cDNA クローニング

約 2  $\mu\text{g}$  の各サブユニットを含む NELF 画分をアセトン沈澱し、7.5% SDS-PAGE で分離した。46 kDa の NELF-E のバンドを切り出し、ゲル中で Lysyl-C エンドペプチダーゼ (Wako) により消化した。得られたペプチドを逆相 HPLC によって分離し、エドマン分解によりアミノ酸配列を決定した。得られた 2 つの配列 RSLSEQPVMDTAXAXEQA および RTQIVYSDDVYK は、ヒト RD 遺伝子から予想されるアミノ酸配列の一部と完全に一致した。

### 4.2.2 抗 RD 抗体の調製

GST-RD 融合タンパク質を調製するため、ヒト RD cDNA の ORF (Cheng ら 1993) を PCR にて増幅し、プラスミド pGEX-5X-3 に挿入した。その塩基配列は蛍光シークエンサー (ABI) により確認した。GST-RD は大腸菌 DH5 $\alpha$  株にて発現させ、glutathione Sepharose 4B カラム (Amersham Pharmacia) を用いて、指示された方法により精製した。精製した GST-RD タンパク質を完全フロインド・アジュバンドと共にラットに注射した。3 回に渡る免疫の後、記載された方法 (Harlow と Lane 1988) により抗血清を調製した。

### 4.2.3 RD のイムノディプリーション

抗 RD 抗血清あるいは免疫していない (プレイムーン) 血清 10  $\mu\text{l}$  を、20  $\mu\text{l}$  の protein G Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia) と 4°C で 1 時間混合し、抗体を担体粒子に固定化した。粒子を NETN [50 mM Tris (pH 7.9), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40] で 3 回、HGE.1 で 1 回洗浄した後、200  $\mu\text{l}$  の HeLa 核抽出液を加えて 4°C で 2 時間混合した。その上清を回収し、新たな抗体固定化粒子と混合した。この操作を繰り返し行ない、粒子に 2 回あるいは 4 回通した核抽出液を調製した。

RD の除去の程度は、抗 RD 抗体を用いたイムノプロットングにより調べた。核抽出液 2  $\mu\text{l}$  を SDS-PAGE で分離し、これを polyvinylidene difluoride フィルター

上に転写した。プロットを BLOTTO [25 mM Tris (pH 7.4), 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5% non-fat dried milk, 0.02% NaN<sub>3</sub>] 中、4°C で 1 時間から一晩マスキングした後、プロットを抗 RD 抗体 (BLOTTO で 1:200 希釈)、セイヨウワサビペルオキシダーゼを連結した抗ラット IgG 2 次抗体 (1:2,000 希釈; Dako) と連続的にインキュベーションし、ECL キット (Amersham Pharmacia) を用いて目的タンパク質を視覚化した。

#### 4.2.4 Flag-NELF の調製

Flag タグを付加した RD タンパク質 (Flag-RD) を動物細胞で発現させるため、PCR を用いて RD の N 末端側に Flag エピトープ (DYKDDDDK) を導入し、これを pCAGGS に挿入することで pCMV-Flag-RD を作製した。

標準的なリン酸カルシウム法 (Ausubel ら 1995) により、pCMV-FlagRD (10 µg) と、選択マーカーとして pSV2-neo (0.5 µg) を、 $2 \times 10^6$  個の HeLa 細胞にトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 10 倍から 1,000 倍希釈して巻き直し、400 µg/ml Geneticin (Gibco BRL) を含んだ MEM 中で 2 週間、培養した。この間、3 日ごとに培地交換した。得られた Geneticin 耐性コロニーをステンレス製シリンダーを用いて単離し、Flag-RD の発現を抗 Flag M2 単クローン抗体 (Sigma) を用いたイムノブロットティングにより調べた。Flag-RD を発現していたいくつかの細胞株 (HeLa/Flag-RD) は、100 µg/ml Geneticin を含んだ MEM 中で維持した。

クローン #15 はさらに増殖させ、5% 馬血清 (Moregate) を含んだ S-MEM を用いて、大規模なスピナー培養に適応させた。30 l (約  $2 \times 10^{10}$  細胞) の培養液から全細胞溶解液を調製した。まず細胞を 4°C、 $2,000 \times g$  で回収し、PBS で 2 回洗浄した。これ以降の操作はすべて 4°C で行なった。細胞のペレットを 250 ml の 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含んだ High Salt バッファーに懸濁し、Dounce 型ホモジナイザーを用いて破碎した。ゲノム DNA を分断するために 5 分間、超音波破碎した後、 $13,600 \times g$  で 20 分遠心し、上清を再度、同条件下で遠心した。この上清を孔径 0.45 µm のフィルターに通して、細胞溶解液を調製した。そのうちの 40 ml を、抗 Flag M2 抗体カラム (Sigma, 1 ml) に 0.4 ml/h の流速でアプライした。素通

り画分 (FT1) を回収し、カラムに再度アプライした (FT2)。カラムを 10 ml の High Salt バッファーで 2 回洗浄し (Wash 1 と 2)、さらに 5 ml の HGE.1 で 1 回洗浄した (Wash 3)。流れを止め、100  $\mu$ g の Flag peptide (Sigma) を含んだ HGE.1 1 ml をカラムに加えて、レジンを懸濁させた。5 分間放置した後、溶出液を回収した (Eluate 1)。この操作をさらに 4 回繰り返した (Eluate 2-5)。SDS-PAGE による解析の結果、Flag-RD に加えて 4 本の NELF サブユニットが共精製されることが判明した。



## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 NELF-E cDNA の単離

前述の方法で NELF を大量調製し、NELF を構成するサブユニットのひとつだと思われる NELF-E の部分アミノ酸配列を決定した。46 kDa の NELF-E を Lysyl-C エンドペプチダーゼで消化し、逆相 HPLC でペプチドを分離した。得られたペプチドをエドマン分解法にて解析し、RSLSEQPVMDTAXAXEQA, RTQIVYSDDVYK という 2 つのアミノ酸配列を得た。これらをコンピュータ検索した結果、いずれも RD という既知タンパク質の一部と完全に一致した (図 4.1)。RD は 380 アミノ酸からなるタンパク質で、その名前は、非常に特徴的なアルギニン (R) とアスパラギン酸 (D) の繰り返し配列による (Levi-Strauss ら 1988; Speiser ら 1989; Cheng ら 1993)。RD を基本として塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸が交互に約 60 アミノ酸並んだ領域が存在し、RD モチーフと呼ばれている。また、C 末端側には RRM (RNA recognition motif) と呼ばれる RNA 結合ドメイン様の配列が、N 末端側にはロイシン残基が 7 アミノ酸ごとに繰り返されたロイシンジッパー様構造が存在する。他に RD モチーフを持つタンパク質としては、スプライシングに関与する U1 70K タンパク質が知られている。U1 70K は RRM モチーフも持っていることから、RD もまたスプライシングに関与するのではないかと予想されていた。しかしその実際の機能は今日に至るまで全く不明であった。

RD が発見された 1990 年頃は RRM ファミリーの数も少なく、RD の RRM 様配列が RRM のコンセンサス配列からやや外れていたため、本当の RRM ではない可能性も指摘されていた。しかし今日のデータベースを再び検索したところ、図 4.2 に示すように、RD の RRM と相同性の高い RRM を持つ因子が数多く見つかった。このことから、RD の RRM が機能的である可能性は高いと思われる。

それ以外のサブユニットもアミノ酸配列を決定し、cDNA を単離した (データ示さず) が、RD が最初に得られたこと、そして唯一の既知タンパク質であったことから、RD を足掛かりとして NELF の解析を進めていった。

### 4.3.2 抗 RD 抗体を用いた解析

RD が本当に NELF のサブユニットの一つであるか確かめるため、RD に対する抗体を調製した。全長の RD タンパク質を大腸菌で発現、大量調製し、これをラットに繰り返し免疫して抗血清を得た。この抗体を用いて RD の存在をイムノブロッティングにより調べた (図 4.3A)。まず HeLa の核抽出液を用いると、ほぼ単一バンドの RD のシグナルが得られ、抗体の特異性が非常に高いことが分かる。次に精製した NELF 画分 (mono S) を調べると、はっきりと RD のバンドが検出された (レーン 7)。以上の結果、精製 NELF 中に RD の含まれることが確かめられた。

次に、NELF の精製途中の画分をイムノブロッティングにより調べた。すると DEAE Sepharose, heparin Sepharose, mono Q と、NELF 活性と完全に一致して RD のバンドが検出された (図 4.3B)。一方、最初のホスホセルロース画分を調べたところ、RD は P.1 には全く検出されなかったが、P.3 と P1.0 には同程度存在していた。この結果は当初の予測通りであり (図 3.6)、P1.0 の転写系を用いたときに NELF の要求性が見られなかった事実をうまく説明できる。まとめると、RD は NELF 活性と一致したカラムの挙動を示し、NELF の構成要素であることが強く示唆された。

#### 4.3.3 Flag-NELF の免疫精製

NELF の解析を進めていく上で、十分な量の NELF タンパク質を得ることは不可欠である。そのため、抗体を用いて NELF を精製しようと試みた。その方法を図 4.4 に示す。まず Flag タグを付加した RD (Flag-RD) をネオマイシン遺伝子と共に HeLa 細胞へトランスフェクションし、Flag-RD を構成的に発現する細胞株を樹立する。RD が他の因子と細胞内で複合体を形成していれば、この細胞株では内在性 RD と部分的に置き換わって、Flag タグ付きの複合体が形成されるだろう。次にこの細胞のライセートを調製し、Flag 抗体を固定化したカラムで Flag-RD を含む複合体を精製する。ここで実際には 500 mM NaCl, 0.5% NP-40 という厳しい条件で洗浄し、非特異的に、あるいは弱い相互作用で結合している因子を洗い流した。そして最後に結合画分を過剰量の Flag ペプチドを用いて溶出する。

Flag-RD を構成的に発現する 3 つの細胞株およびコントロールの細胞株よりライセートを調製し、スモールスケールで精製を行なった (図 4.5A)。溶出画分を銀染色

にて解析すると、~48 kDa の位置に Flag-RD のバンドが強い強度で確認できた。コントロールにもいくつかの非特異的なバンドが検出されたが、両者を比較すると、Flag-RD に加えて4本の特異的なバンドが共精製されたことが分かる (黒の矢印で示した)。レーン9には精製した NELF を流したが、これらを比較すると、4本の共精製されたバンドは NELF-A, -B, -C, -D と同一の分子量を示している。Flag-RD はタグの分、内在性 RD よりもやや大きい。以上の結果、RD タンパク質は細胞内でこれら4つのポリペプチドと極めて安定な複合体を形成していること、そして Flag 抗体を用いてこの複合体を無傷の状態に精製できたと考えられる。こうして得られた複合体を Flag-NELF と呼ぶことにする。次に、30 l のスピナー培養から Flag-NELF の大量調製を試みた (図 4.5B)。ほとんどのタンパク質は素通り画分に行くか、洗浄の段階でカラムより洗い流され、ペプチド溶出により純度の高い Flag-NELF が回収された。スモールスケールの精製と比べて非特異的なバンドは少なく、ほとんど5つのポリペプチドだけから構成されている。

Flag-NELF が NELF 活性を有しているかどうか、オリゴ dC テンプレートを用いて検討した (図 4.6)。Flag-NELF を量を変えて加えると、DSIF に依存して pol II の伸長反応を抑制した。以上の結果、Flag-NELF は NELF 活性を有しており、また NELF 活性には RD を含む5つのポリペプチドで十分であることが示唆された。

#### 4.3.4 NELF のイムノディプリーション

次に私は、NELF の働きをよりクルードな系で明らかにしようと考えた。その理由を簡単に説明する。図 4.7 のアルファベットが細胞内の因子で、ある現象が ABC の3つで再構成できたとする。この系から A を除くと活性が失われた、だから A は不可欠な因子だ、というのは厳密には正しくない。というのも細胞内に A を補完する因子 A が存在し、A は必須でないかもしれない。あるいは、A を制御する因子 D が存在し、細胞内で A は機能しないかもしれない。

その方法として、RD 抗体を用いて NELF を HeLa 細胞の核抽出液から除去することを試みた。HeLa 核抽出液を RD の抗体カラムに2回あるいは4回通し、RD の存在をイムノブロッティングにより調べたところ、4回通したとき、ほぼ完全に RD が

除かれることが分かった (図 4.7A)。一方、コントロールの抗体カラムでは変化なかった。RD 以外の因子も同様に調べたが、DSIF の p160、P-TEFb、pol II といずれも変化は認められず、RD のみの特異的に除去されたことが分かった。

次に、これらの核抽出液の転写活性を調べた (図 4.7B)。基本レベルの転写活性は、どの核抽出液もほとんど変化なかった。しかし DRB 感受性を調べると、RD を除去した核抽出液において DRB 感受性が著しく損なわれていることが分かった。

この核抽出液に様々な NELF 画分を戻してみた (図 4.8A)。D.225 というのは DSIF を含まないクルードな NELF 画分である。D.225、精製 NELF、Flag-NELF のいずれを加えた場合も、基本レベルの転写活性にはほとんど影響することなく、DRB 感受性が回復した。以上の結果、NELF が核抽出液中においても DRB 依存的な転写阻害に必須な役割を果たすことが確かめられた。また、これらの結果は DRB 存在下、つまり P-TEFb 活性が抑えられた条件下で、NELF が転写を抑制した、と解釈することもできる。これはこれまでに得られた結果、あるいは図 3.15 のモデルとよく一致する。

大腸菌より組換え(r)RD を発現、精製し、RD を除去した核抽出液の NELF 活性を相補するかどうか調べた。しかし過剰量の rRD を加えても、DRB 感受性は回復しなかった (図 4.8B)。このことから、RD の抗体カラムによって RD のみでなく、NELF 活性に必要な他のサブユニットも核抽出液より除去されたと考えられる。

#### 4.3.5 NELF サブユニットの要求性

Flag-NELF の銀染色のパターンを良くみると、NELF の B と E のサブユニットがより強く染色されている (図 4.5B)。抗体カラムで得られた Flag-NELF 画分が均一な集団ではない可能性を考え、これをさらに mono Q カラムに通した。カラムに結合した Flag-NELF を KCl の塩濃度勾配で溶出したところ、2つのピークに分離することが分かった。(図 4.9A)。塩濃度の低い位置に溶出されるピークには NELF-B と -E (Flag-RD) のみが存在し、塩濃度の高いピークには全てのサブユニットが含まれていた。このことから、NELF-E/RD は他のサブユニットのなかで B サブユニットに最も強く、なおかつ直接結合することが示唆された。細胞内で B-E 複合体が過剰に形成さ

れているか、あるいは精製の途中でホロ複合体から A, C, D サブユニットが解離したと考えられる。

Flag-NELF の 2 つのピークの活性を、RD を除去した核抽出液を用いて検討した。図 4.9B に示したように、インプットの Flag-NELF およびホロ複合体は DRB 感受性を回復させたが、B-E 複合体はその活性を持たなかった。以上の結果、NELF-B と NELF-E だけでは NELF 活性に不十分であり、残りのサブユニットも必要であることが分かった。

ちなみに内在性の NELF を精製したときは、mono Q において塩濃度の高い方に活性が回収された。B-E 複合体が細胞内に本来存在する分子種なのか、あるいは Flag-RD を高発現させたことによる人為的産物なのかを検討するため、HeLa 核抽出液を直接 mono Q カラムに通し、同じように KCl の塩濃度勾配により溶出した。溶出画分中の RD の存在をイムノプロットングにより調べたところ、図 4.9A と同じように RD の分布は二峰性を示した。ただし、低塩濃度のピークは、高塩濃度のそれに比べて非常に小さかった (データ示さず)。以上の結果、実際の細胞内にも、量は少ないものの B-E 複合体が存在していることが示唆された。しかしそれが細胞内で意味のある役割を果たしているのかどうか、現在のところ不明である。

#### 4.3.6 NELF と他の因子との相互作用

次に、NELF の作用機構を明らかにする第一歩として、NELF と他の因子との物理的な相互作用を検討した (図 4.10)。Flag-RD を発現する細胞株とコントロールの細胞株より核抽出液を調製し (Dignam ら 1983)、先ほどのように Flag 抗体を用いて Flag-NELF の精製を行なった。ただし今回は、洗浄の条件を穏やかにし、NELF と相互作用する因子が結合画分に残るようにした。インプット、素通り画分、結合画分を RD 抗体のイムノプロットングにより調べたところ、Flag-RD はほとんど結合画分に回収された。一方、内在性 RD は Flag タグを持たないため、素通り画分に回収された。話はそれるが、Flag-RD を発現する細胞株では内在性 RD の発現量が著しく低下していることが分かった ( $\alpha$ -RD, レーン 1, 4)。このことから、細胞内に RD の発現量を一定に保つようなフィードバック機構の存在することが示唆される。またそれ

が幸いして、Flag-RD が内在性 RD と効率良く置き換わり、Flag-NELF 複合体が形成されたと考えられる。

さて、このような条件下で DSIF、pol II、P-TEFb の挙動をイムノブロッティングにより調べたところ、p160 と pol II の一部が結合画分に回収されることが分かった。一方、P-TEFb はコントロールレベルで、有意な結合を示さなかった。以上の結果、NELF は DSIF および pol II と物理的に相互作用することが明らかとなった。

これまで用いてきた pol II 抗体は、8WG16 という pol II の CTD を認識する単クローン抗体である (Thompson と Burgess 1996)。8WG16 は pol IIo と pol IIa の双方を認識し得るが、ここで用いた HeLa 核抽出液には pol IIo がほとんど含まれていないため、pol IIa のバンドのみが検出される。NELF-pol II の相互作用が CTD のリン酸化状態によって異なる可能性を検討するため、B3 という別の pol II 抗体を用いてみた。B3 はリン酸化型 CTD (pol IIo) を特異的に認識する抗体である (Mortillaro ら 1996)。その結果、8WG16 の結果とは対照的に、pol IIo は免疫沈降物中に全く検出されなかった。以上の結果、NELF は pol IIa とは結合するが、pol IIo とは結合しないことが明らかとなった。

pol II の 2 種類の抗体を用いた解析から、DSIF と pol II の相互作用もまた、CTD のリン酸化状態によって異なることが判明している (データ示さず)。よって、CTD リン酸化の機能の一つは DSIF-pol II、NELF-pol II の相互作用を制御することだと考えられる。これまでの結果をまとめると図 4.11 のようになる。DSIF と NELF は協調的に pol II (の CTD 以外の部分) と結合し、伸長反応を抑制する。P-TEFb が CTD をリン酸化すると、リン酸化型 CTD が DSIF と NELF を「蹴りだし」、伸長抑制を解除する。

#### 4.4 まとめ

本章をまとめる。

- (1) NELF-E は RD という機能不明の既知タンパク質だった。
- (2) NELF の簡便な精製法を確立した。
- (3) RD は NELF-A~D と非常に安定な複合体を形成している。
- (4) NELF 活性には E 単独、あるいは B-E だけでは不十分で、それ以外のサブユニットが必要である。
- (5) NELF は DSIF および pol IIa と結合するが、pol IIo とは結合しない。

```

MLVIPPGLSE  EEEALQKKFN  KLKKKKKALL  ALKKQSSSST  40
      *           *           *           *
TSQGGVKRSL  SEQPVMDTAT  ATEQAKQLVK  SGASAIKAE  80
TKNSGFKRSR  TLEGKLDPE  KGPVPTFQPF  QRSISADDDL  120
QESSRRPQRK  SLYESFVSSS  DRLRELGPDG  EEAEGPGAGD  160
GPPRSFDWGY  EERSGAHSSA  SPPRSRSRDR  SHERNRDRDR  200
DRERDRDRDR  DRDRERDRDR  DRDRDRDRER  DRDRERDRDR  240
      RD repeats
DREGPFRRSD  SFPERRAPRK  GNTLYVYGED  MTPLLRGAF  280
      RRM
SPFGNIIDLS  MDPPRNCAFV  TYEKMESADQ  AVAELNGTQV  320
ESVQLKVNIA  RKQPMLDAAT  GKSVWGLAV  QNSPKGCHRD  360
KRTQIVYSDD  VYKENLVDGF  380

```

Figure 4.1 Molecular cloning of NELF-E/RD. The NELF active fractions from mono S were subjected to SDS-PAGE, and the band of 46 kDa corresponding to NELF-E was subjected to microsequence analysis. Two obtained peptide sequences (underlined) match part of the human RD protein (Cheng et al, 1993; GenBank accession No. L03411). The RD motif and the putative RRM were indicated by arrows. Astarisks denote Leu residues of the putative leucine zipper structure.



```

TIA-1      5 MPK...GNLSR...AL...LQLFSQIGPCKNC...MDTAGN.
TIA-1     93 NHFHV...CDLSPQ...ATED...AAF...PFCRIS...AV...KDMATGK
TIA-1    201 SNCIV...CGG...TSG...T...QL...QIFSPFG...L...VFFD.....
TIAR      95 NHFHV...CDLSP...ATED...SAP...PFCRIS...AV...KDMATGK
TIAR     203 KNCIV...CGG...ASG...T...QL...QIFSPFG...L...VFFD.....
iPABP     97 GVGNV...KNIDKS...DNKALYDTFSAFGN...I...SC...V...CD...ENG.
iPABP    189 EFTNV...KNFGE...VD...ESL...EELFSQEGKT...S...V...RD...PNGK
bruno     722 EGCN...YHLPQ...FT...TDLASTELEPFG...V...SA...V...FEDKQTSL
a-Da66    164 AGN...S...SGN...K...V...D...F...L...K...T...E...N...D...I...G...T...I...O...N...S...Y...E...I...E...
RD        260 KGN...A...YGE...D...V...T...P...T...L...L...R...G...A...E...S...P...E...G...N...I...E...D...P...S...D...D...P...

```

```

consensus      LFVGNL      L      F      F      G      V
                IYIKGL      I      F      Y      G      I
                RNP-2

```

```

.DPYCFVEPHE...RHAAAA...AAMNGRKM...MG...E...KV...WATTPSSQK 88
SKGYGFVSEFN...WDA...NAL...QQMG...COW...GG...Q...RT...WAT...EPAP 178
.KGYSEVRENSHE...SAA...HAIVS...NGTT...EG...V...KCYW...E...TLD...MI 280
SKGYGFVSYFN...QLDA...NAL...IVHM...GCOW...GG...Q...RT...WAT...EPAP 180
.KGYSEVRENSHE...SAA...HAIVS...NGTT...EG...V...KCYW...E...SE...DMT 282
SKGYGFVHFETOE...A...DKAL...EK...MNC...ML...ND...R...K...V...G...R...E...S...K...E...R...E 180
SKG...GFV...S...EK...H...E...D...A...N...A...M...E...M...N...C...K...E...S...G...I...H...F...V...G...R...A...O...K...V...E...R...Q 273
SKC...GFV...S...F...D...N...P...S...A...Q...V...A...I...K...M...N...C...F...Q...G...T...K...R...K...V...L...K...R...P...D...S...K...P 807
.KSRGFVSPAKPE...SAD...RA...IAE...E...H...G...K...M...N...C...I...N...L...Q...V...L...A...R...R...O...P...O...I...E 241
.RNC...F...V...S...E...K...M...E...S...A...D...Q...A...V...A...E...I...N...G...T...O...E...S...V...O...K...V...N...I...A...R...R...O...M...L...D 337

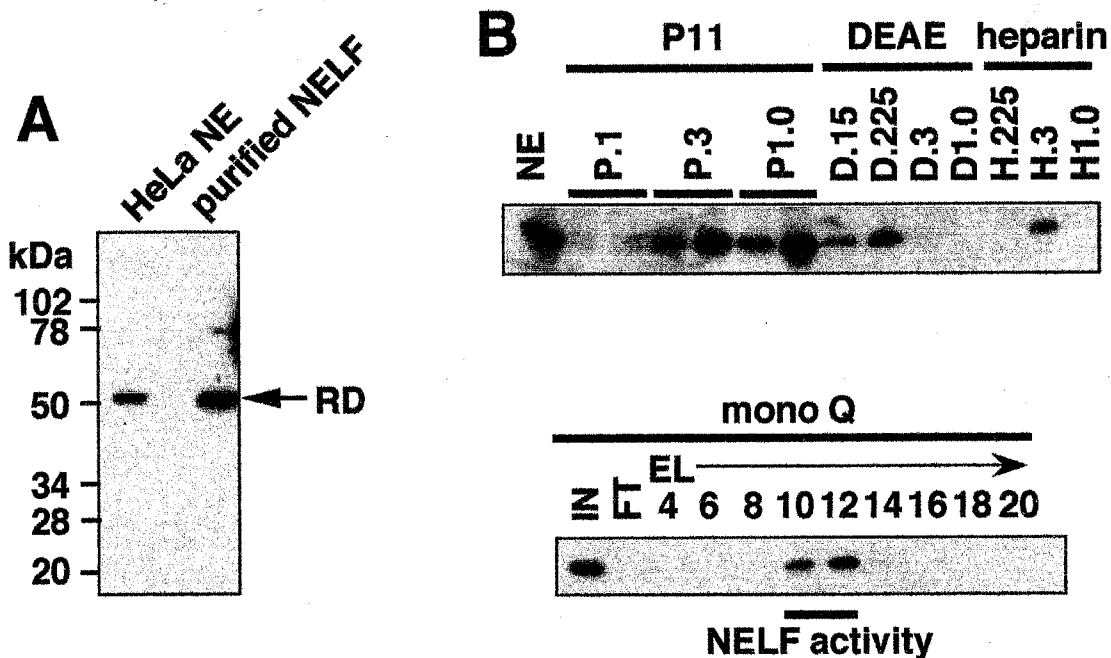
```

```

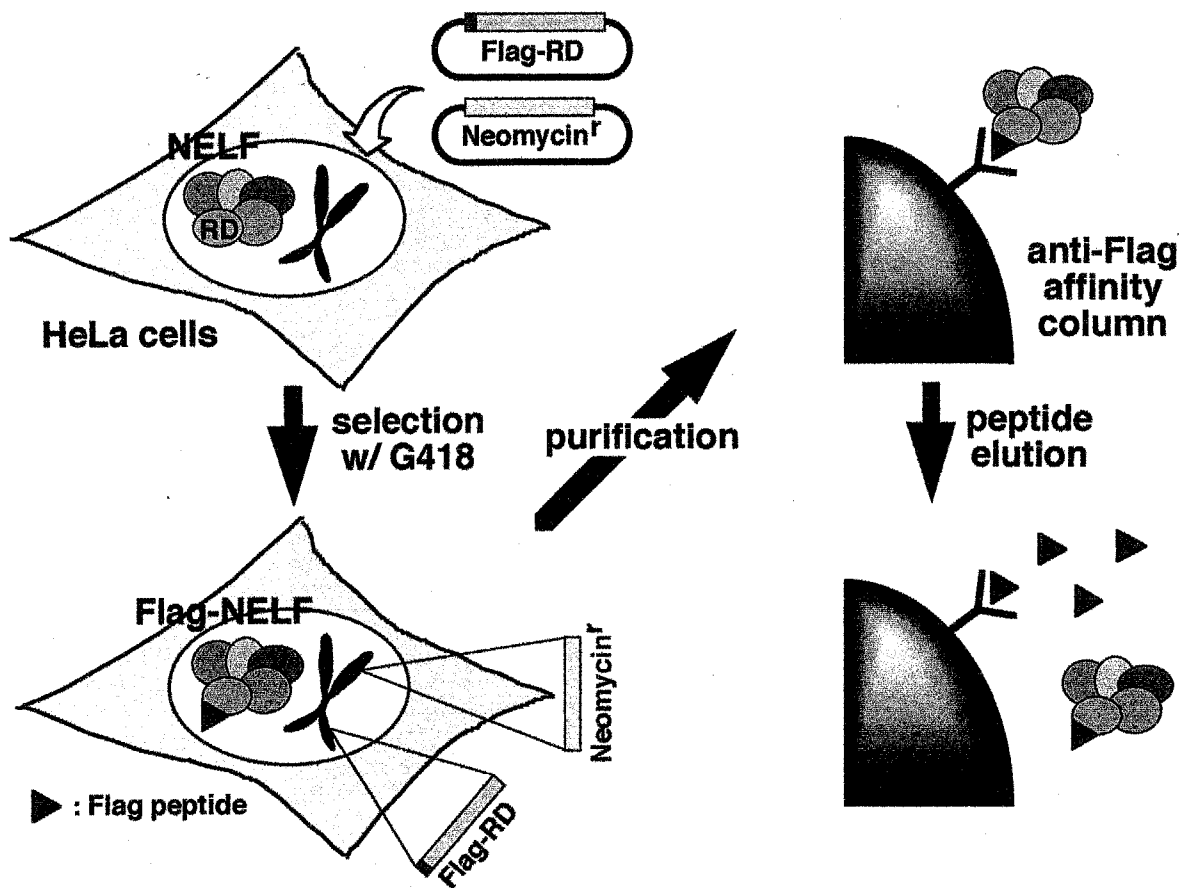
RKGGFVFIY      A      I      G      V      V
KGFGFIY      V      G      I      I
RNP-1

```

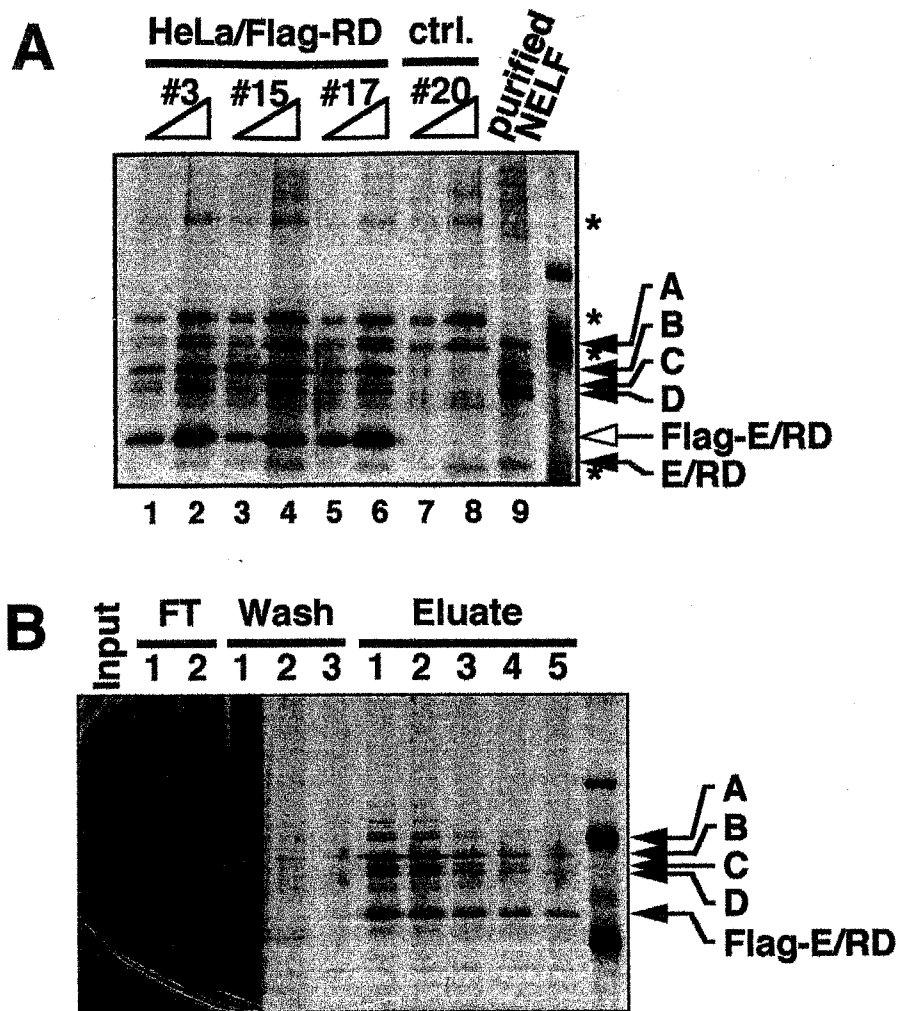
Figure 4.2 Comparison of the related RRM. Database searches were performed with the BLASTP program (Altschul et al., 1990) using the human RD protein as a query. Sequence encompassing the putative RRM was found to share homology with a set of RNA-binding proteins, including human Nucleolysin TIA-1 (P31483), human TIA-1-related protein TIAR (Q01085), human inducible poly(A)-binding protein iPABP (U33818), *Drosophila* translational repressor bruno (U738469), and *Drosophila* anonymous 66-Da (Y10016). The sequences were aligned using the program Clustal W (Thompson et al., 1994).



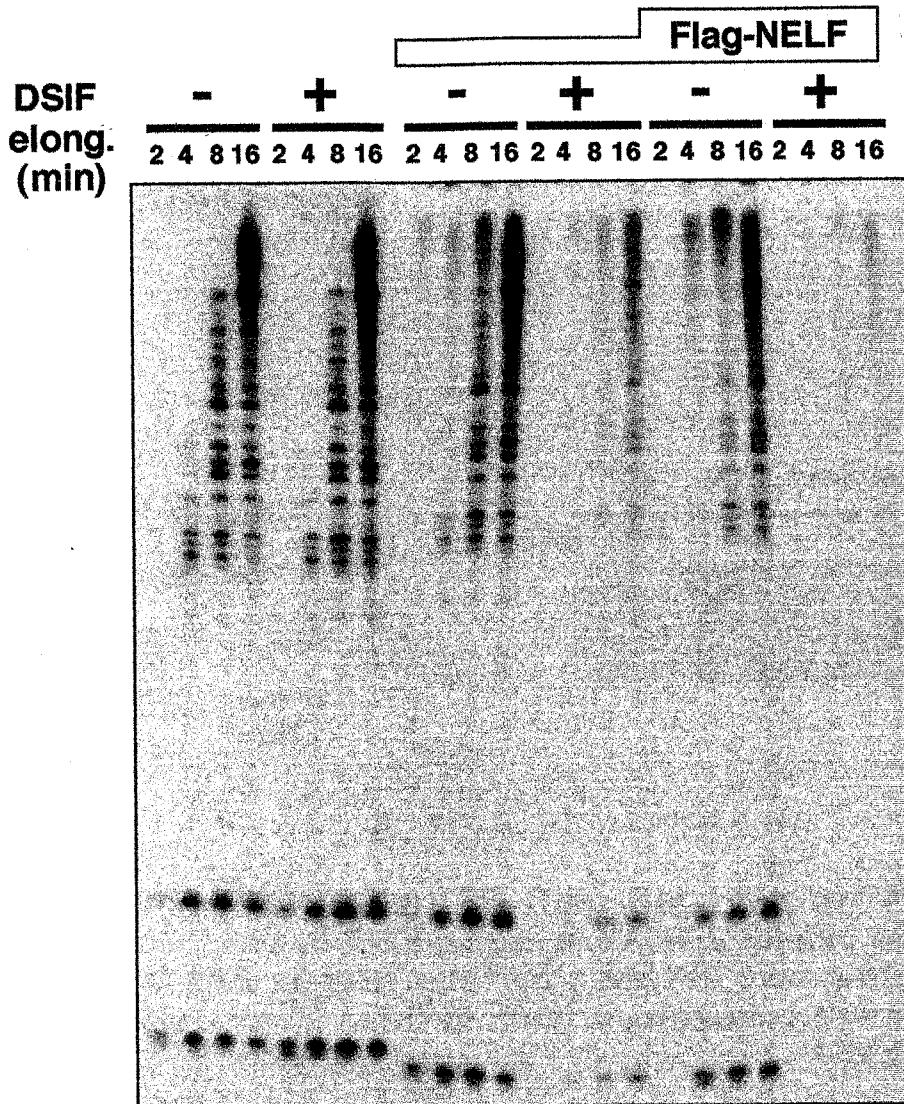
**Figure 4.3 Immunological analysis of NELF-E/RD. (A) Specificity of anti-RD antiserum. Anti-RD antiserum was raised against the full-length RD protein produced in *E. coli*. HeLa nuclear extract (2  $\mu$ l) and purified NELF (mono S, 1  $\mu$ l) were subjected to immunoblot analysis using the anti-RD antiserum. The antiserum detected an almost single band of ~46 kDa in the nuclear extract and the purified NELF fraction. (B) Co-fractionation of RD with NELF activity. Various column fractions on NELF purification were examined for the presence of RD. RD was found to be co-fractionated with NELF activity on each column step. Notably, RD was present in both P.3 and P1.0, in agreement with the prediction in Figure 3.6.**



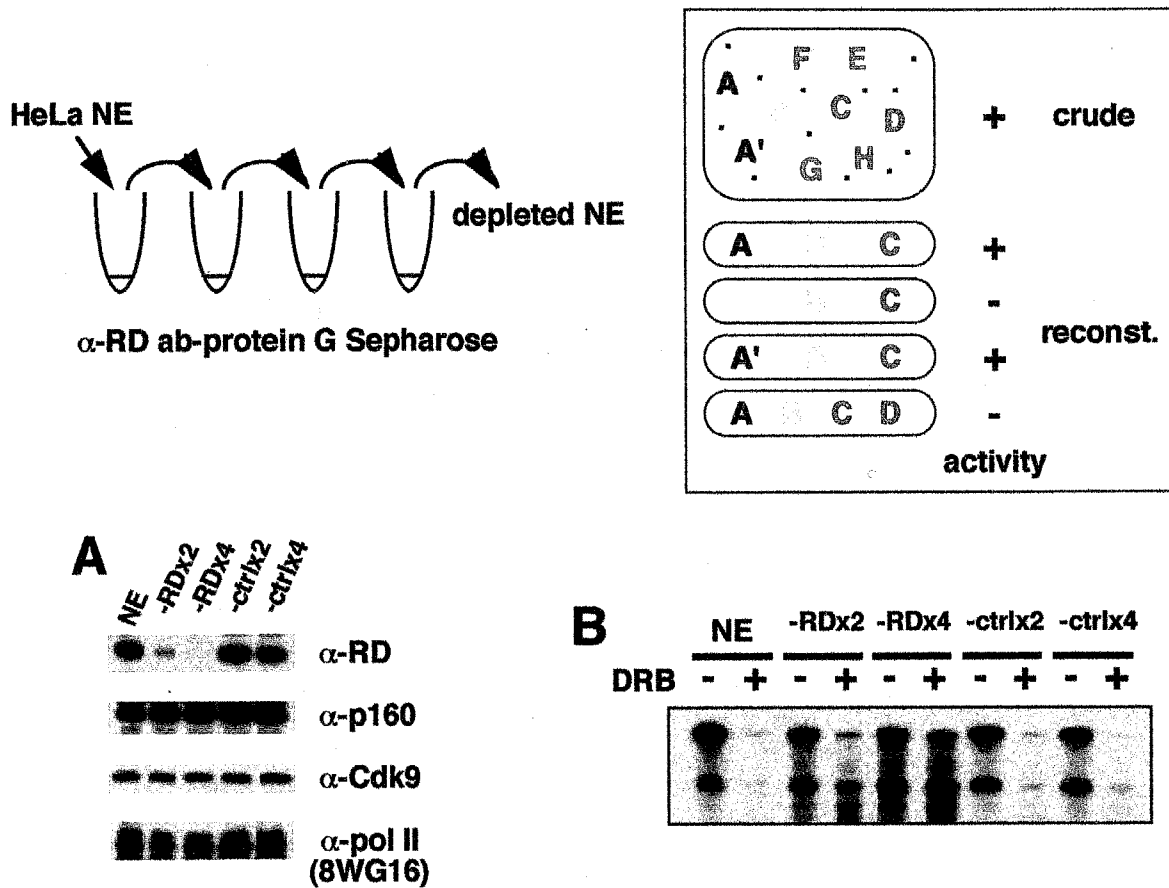
**Figure 4.4 Strategy for immunoaffinity purification of NELF complex. First, stable HeLa cell lines constitutively expressing Flag-tagged RD are established. Second, the whole cell extract is prepared and passed over an anti-Flag antibody affinity column. Third, after extensive washing, Flag-RD-containing complex is eluted with excess Flag peptide.**



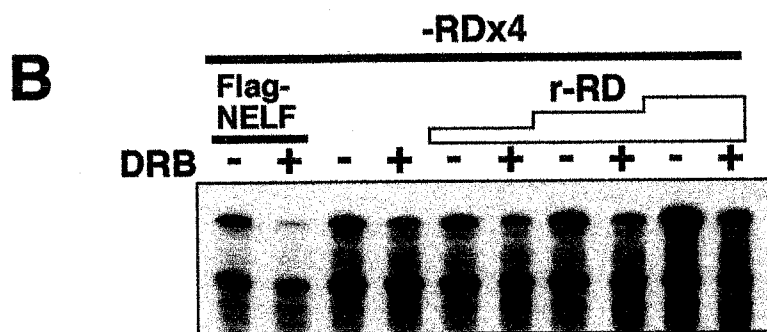
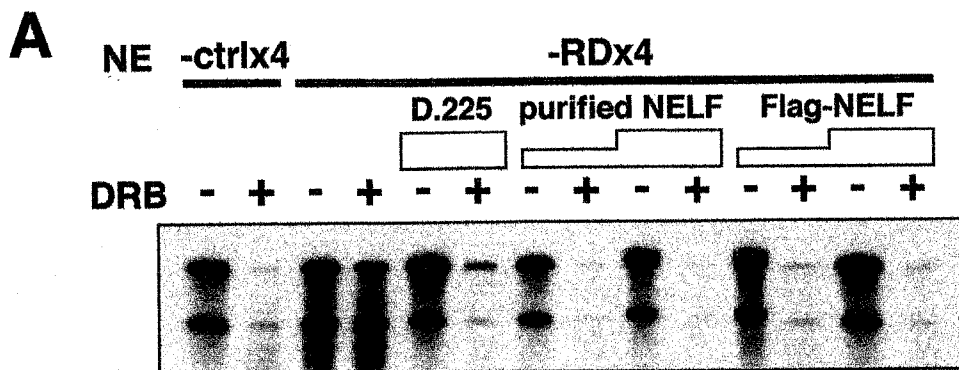
**Figure 4.5** Flag-affinity purification of NELF complex. (A) HeLa cell lines constitutively expressing Flag-RD were established. Whole cell extracts prepared from the cell lines (#3, 15 and 17) and a control cell line (#20) were subjected to immunoaffinity purification as outlined to the left. The resulting eluates (5, 20  $\mu$ l) were analyzed by SDS-PAGE and silver-staining. Lane 9 contains 2  $\mu$ l purified NELF (mono S). Filled arrowheads indicate the positions of NELF subunits. Open arrowheads indicate the position of Flag-RD. Asterisks denote the positions of nonspecific bands appeared in the eluate from the control extract. (B) Large scale purification of Flag-NELF. Whole cell extract was prepared from a 30-l spinner culture of clone #15 and subjected to affinity purification on the anti-Flag antibody column. Each step (4  $\mu$ l) of this purification was analyzed by SDS-PAGE and silver staining.



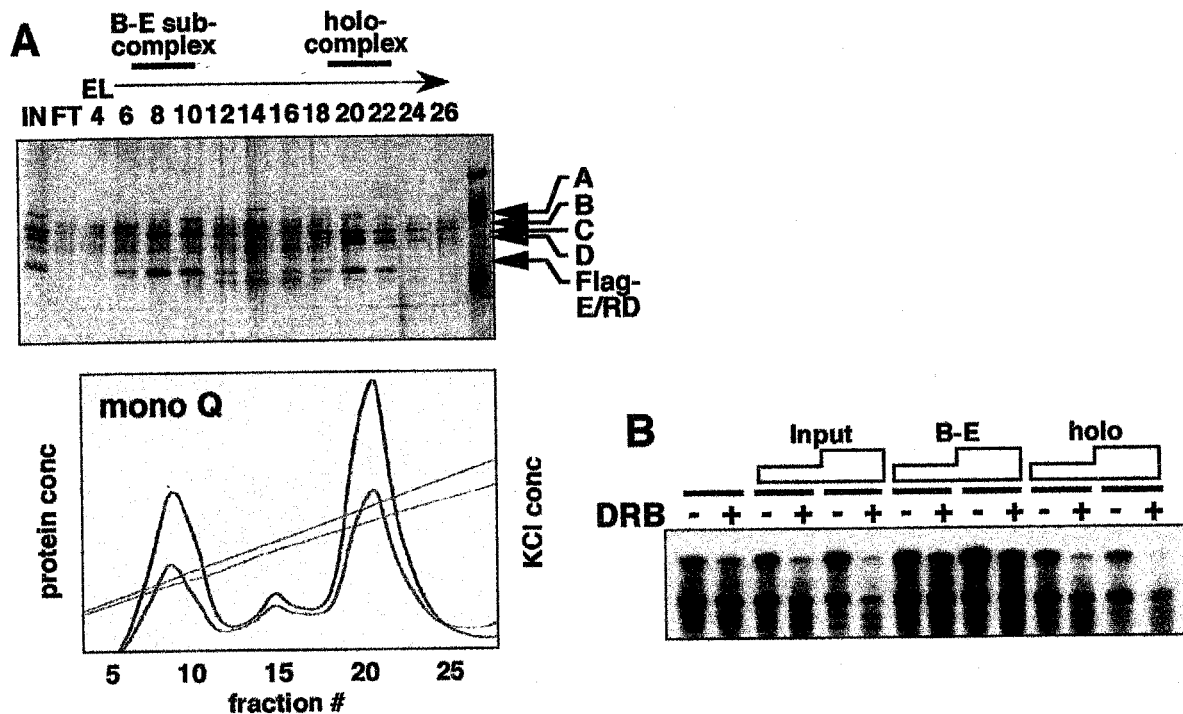
**Figure 4.6 NELF activity of Flag-NELF. DSIF (2  $\mu$ l) and Flag-NELF (Eluate 1; 4, 8  $\mu$ l) were added to the dC-template assays as indicated at the top.**



**Figure 4.7 Immunodepletion RD from HeLa nuclear extract. (A)** Immunoblot analysis of the nuclear extracts depleted of RD. HeLa nuclear extract (200  $\mu$ l) was repeatedly passed over protein G beads (20  $\mu$ l) to which either anti-RD or control antibody was coupled. The supernatants (2  $\mu$ l) were analyzed for the presence of RD, DSIF p160, the Cdk9 subunit of P-TEFb, and the pol II largest subunit by immunoblotting. Passing twice or four times over the anti-RD beads reduced or eliminated the endogenous RD protein (-RDx2, -RDx4), while the protein level of the other components remained constant. Depletion with the control antibody had no effect. **(B)** Transcriptional activity of the RD-depleted extract. These nuclear extracts (2  $\mu$ l) were assayed for transcriptional activity in the presence or absence of DRB. Depletion of RD did not significantly affect transcription in the absence of DRB. In its presence, however, RD depletion restimulated the repressed transcription. Depletion with the control antibody had no effect.

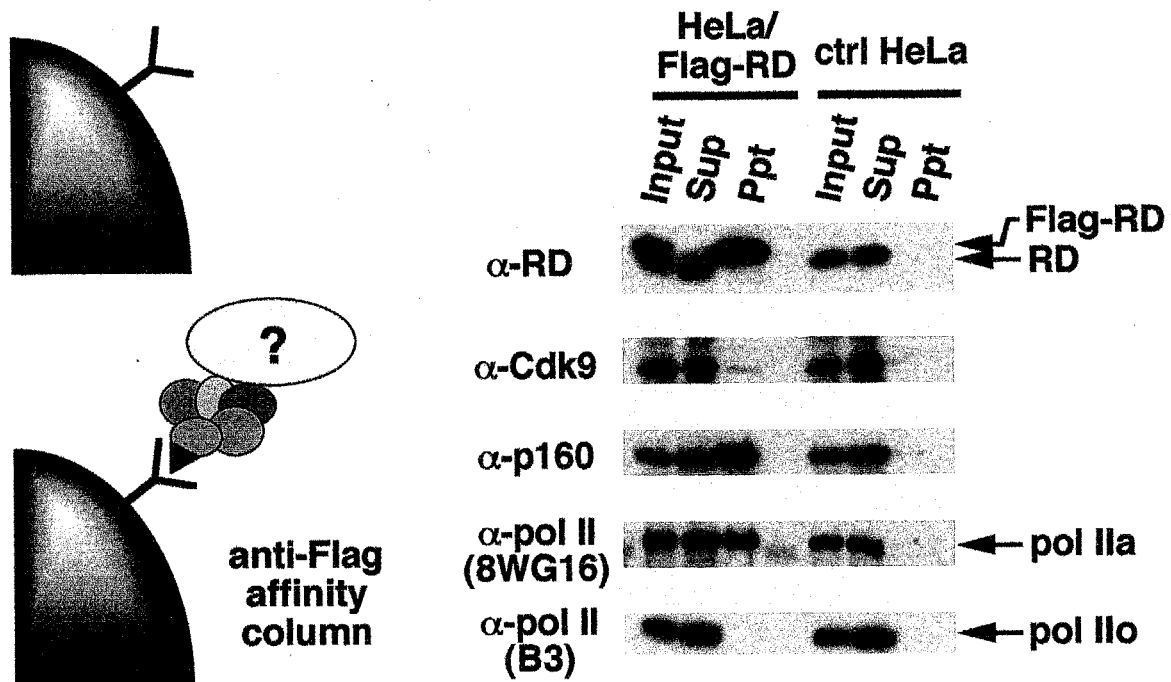


**Figure 4.8** Addition of various NELF preparations to RD-depleted extract. (A) D.225 is the 0.225 M KCl step of DEAE Sepharose. D.225 (6  $\mu$ l), purified NELF (mono S; 1, 2  $\mu$ l) and Flag-NELF (4, 8  $\mu$ l) were added back to the RD-depleted extract (-RDx4). In all cases, the addition of NELF repressed transcription in the presence of DRB, and restored DRB-sensitivity. (B) rRD expressed and purified from *E. coli* was added. Even excess (200 ng) amount of r-RD had no effect, suggesting that other NELF components were co-depleted, which are required for its function.



**Figure 4.9** NELF activity of Flag-NELF subcomplex. (A) Flag-NELF eluted from the anti-Flag column was loaded onto a mono Q column and eluted with a linear gradient of KCl. Silver staining (top) and the chromatograph (bottom) revealed the separation of Flag-NELF into two peaks. The low salt peak contained NELF-B and -E, while the high salt peak contained all the putative NELF subunits. Blue and brown lines denote the protein concentration, while red and pink lines denote the KCl concentration. (B) The low and high salt peaks were added to the RD-depleted nuclear extract and assayed for their NELF activity. The input Flag-NELF and the high salt peak complemented the defect in DRB-sensitivity, whereas the low salt peak did not.





**Figure 4.10** NELF interacts with DSIF and pol II. Nuclear extracts were prepared from HeLa/Flag-RD and control HeLa cells by the method of Dignam et al. The extracts (200  $\mu$ l) were immunoprecipitated with anti-Flag antibody, washed, and eluted with Flag peptide. Each fractions were analyzed by immunoblotting with indicated antibodies. Input and FT lanes represent 4% of the total amount.

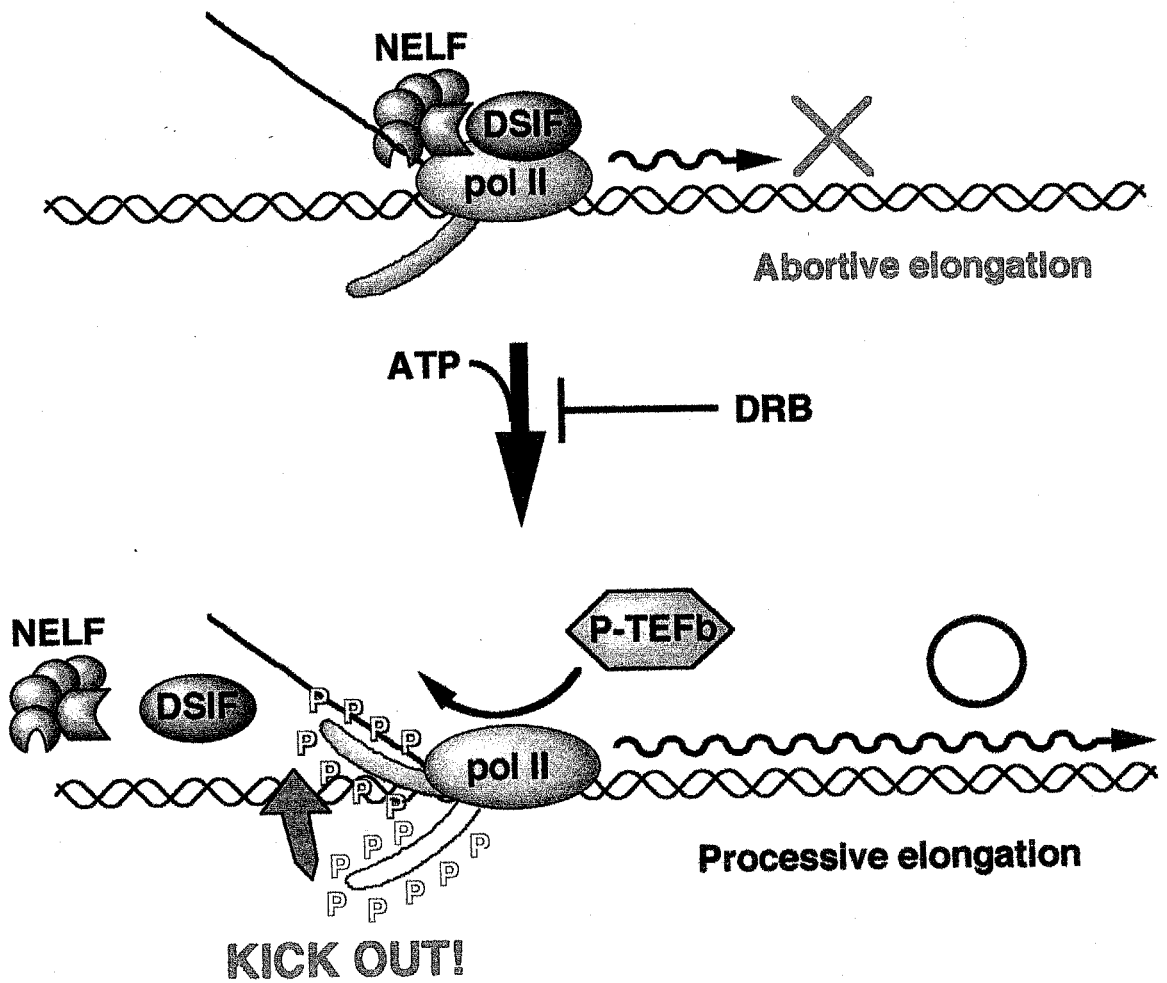


Figure 4.11 A model for NELF action.

## 第5章 総括

### 5.1 緒言

本研究成果の特に重要だと思われる点を3つ列挙する。

- (1) p160 のドメイン解析の結果、p160 のドミナントネガティブ変異体を同定した。DSIF の細胞内機能をさらに解析していく上で、この変異体は有用なツールとなり得るだろう。
- (2) DSIF と NELF は転写伸長反応を負に制御する、新しいカテゴリーの基本伸長因子である。薬剤 DRB の転写抑制作用はこれらの因子の働きによって説明できる。
- (3) CTD リン酸化の機能の一つを明らかにした。CTD を介して正および負の伸長因子が伸長制御のネットワークを形成している。

## 5.2 新規転写伸長因子 DSIF

### 5.2.1 p160 の構造

本研究で明らかとなった p160 のドメイン構造を図 2.11 に示した。p14 および pol II と結合する p160 の領域は、それぞれ酸性領域と NusG 相同領域との間にマッピングされた。p160 と p14 の相互作用は非常に安定であり、1 M NaCl および 0.5% NP-40 存在下でも解離しなかった。p160 の p14 結合ドメインを約 100 アミノ酸に絞り込むことができたが、この領域をコンピュータ検索したところ、タンパク質-タンパク質相互作用などに関わるモチーフを見い出すことはできなかった。この領域は比較的疎水的であり、疎水結合が DSIF サブユニット間の結合に関与していると思われる。p14 結合ドメインを欠損した p160 も pol II に結合したことから、p160-pol II の結合に p14 は必要ないと思われる。

*in vitro* における DSIF 活性に、p160 の C 末端側繰り返し配列は不必要だった。しかし酵母における解析によれば、C 末端側を欠損した SPT5 は Spt5 の表現型を相補することができない (Swanson ら 1991)。従って、この繰り返し領域は *in vivo* において、何らかの調節的役割を果たしている可能性が考えられる。興味深いことに、この領域は Ser, Thr そして Tyr 残基に非常に富んでおり、MAPK (mitogen activated protein kinase) や CDK など、様々なキナーゼの標的配列を含んでいる。特に、p160 は M 期において高度にリン酸化されることから、この領域が細胞内で Cdc2 によってリン酸化され、何らかの制御を受けている可能性が考えられる。

一方、p160 N 末端側の酸性領域および NusG 相同領域は DSIF 活性に不可欠であることが分かった。しかし本研究において、これらの機能的役割を明らかにすることはできなかった。p160 のような酸性アミノ酸に富んだ領域は、一部の転写因子の転写活性化ドメインや、いくつかのクロマチンリモデリング因子に見つかっている。後者の場合には、この酸性領域が、塩基性に富んだヒストンタンパク質と相互作用することにより、クロマチン構造を変換すると考えられている (Tsukiyama と Wu 1997)。後述するように、DSIF と染色体構造の関連が示唆されており、p160 の酸性領域がこのような役割を果たしている可能性も考えられる。

### 5.2.2 DSIF の細胞内機能

DSIF は、酵母ホモログの遺伝学的な解析から、染色体構造の維持にも関与していることが強く示唆されている (Basrai ら 1996; Bortvin と Winston 1996; Malagon ら 1996)。p160 はドット状の核内局在を示すことから、DSIF の一部がこのような特殊化した機能を担っている可能性が考えられる。染色体は細胞周期の間期では図 5.1 のようにほどけているが、分裂期では凝集している。また、遺伝子の転写は間期では活発に起こるが、分裂期では抑制されている。p160 は分裂期において高度にリン酸化されることから、DSIF 活性が細胞周期によって制御されており、DSIF が染色体構造や転写のダイナミックな制御に関与している可能性が考えられる。本研究において、p160 のドメイン解析を通じて p160 のドミナントネガティブ変異体を同定した。今後、DSIF の *in vivo* における役割をさらに解析していく上で、この変異体は非常に有用なツールとなり得るだろう。

## 5.3 新規転写伸長因子 NELF

### 5.3.1 モデル

本研究で得られた結果より、DRB の作用機構について図 4.11 のようなモデルが考えられる。DSIF と NELF は pol II に直接結合し、協調的にその伸長反応を抑制する。しかし通常は P-TEFb が pol II の CTD をリン酸化し、DSIF と NELF を pol II から遊離させることで、抑制効果を打ち消す。DSIF も pol II と直接、相互作用するが、その結合もまた CTD のリン酸化に感受性であることが分かっている (データ示さず)。DRB は P-TEFb の「抗抑制」反応を阻害し、DSIF と NELF の抑制効果を維持することで、伸長反応を阻害する。

pol IIb が pol IIa と同様に、DSIF と NELF によって抑制されたことから、CTD は DSIF と NELF による抑制の局面には不必要である。従って、DSIF と NELF は CTD 以外の部分を介して pol II に結合すると思われる。CTD のリン酸化はどのように DSIF と NELF の解離を引き起こすのだろうか。CTD のリン酸化は pol II の構造変換を引き起こし、pol II の結合ドメインをマスクしてしまうかも知れない。あるいは、リン酸化型 CTD は DSIF/NELF と pol II の相互作用をイオンの的に阻害するのもかも知れない。また、NELF は RD サブユニットを介して転写産物に結合し、この 3 者の複合体を安定化している可能性が考えられる。

### 5.3.2 負の伸長因子

DRB はクラス II 遺伝子の転写を普遍的に抑制する。よって DSIF と NELF による転写抑制もやはり普遍的だと考えられる。これまでに同定された基本伸長因子はいずれも pol II の伸長を促進する活性を持っており、DSIF と NELF は pol II の伸長を抑制する新しいタイプの基本伸長因子だと考えられる。ホメオスタシスなどの生命現象で見られるように、正と負の両方の因子が存在することで初めて、緻密な制御が成し遂げられると思われる。

DSIF と NELF はどのように伸長反応を抑制するのだろうか。最近の研究から、pol II 伸長複合体はなめらかに DNA 上を滑っていくのではなく、シャクトリ虫のように不連続に動くことが提案されている (Uptain ら 1997)。DSIF と NELF は pol II に

結合し、この動的な動きを固めてしまうのかも知れない。

DSIF の酵母ホモログ SPT4, SPT5 は、前述のようにヒストン H2A (SPT13)、H2B (SPT14) とともに SPT サブファミリーを形成し、類似の機能を果たしていると推定される (Winston 1992; Winston と Carlson 1992)。ヌクレオソーム構造が pol II の伸長反応を阻害することが最近報告されており (Brown ら 1996; Orphanides ら 1998)、ヒストンもまた DSIF や NELF のような負の伸長因子ということが出来るかも知れない。一方、ヌクレオソーム構造をとった鋳型から pol II の伸長反応を促進する因子も報告されている (Orphanides ら 1998)。以上のように、クロマチン構造と転写伸長反応は密接な関係にあることが明らかとなってきた。

### 5.3.3 CTD リン酸化の機能的役割

CTD は pol II だけに存在する非常に特異なドメインで、これまで多くの研究者の興味を集めてきた。CTD は転写反応の様々な局面、あるいは mRNA のプロセシングに関与していることが示唆されてきた。中でも、CTD は転写開始から伸長反応にかけて高度にリン酸化されるため、そのリン酸化は伸長反応に何らかの役割を果たしていると考えられてきた (O'Brien ら 1994)。しかしながら、CTD のリン酸化、あるいは CTD そのそのが不要であるといった報告もいくつかあり (Zehring ら 1988; Serizawa ら 1993; Makela ら 1995)、その機能は現在の転写研究に残された大きな謎の一つとなっている。

本研究において、私は初めて CTD のリン酸化が伸長反応を促進する仕組みの一つを明らかにした。CTD リン酸化は負の伸長因子を pol II から解離させる働きを持っている。これまでに、少なくとも 2 つの因子が CTD のリン酸化状態に応答して pol II と相互作用することが知られている。転写メディエーター (transcriptional mediator) は pol IIa と結合し、転写の開始段階で調節的な役割を果たしている (Kim ら 1994)。5'-キャッピング酵素は pol IIo と結合し、伸長複合体にリクルートされる (Cho ら 1997; McCracken ら 1997)。以上のように、CTD のリン酸化は分子スイッチとして働き、様々な因子の pol II との結合を調節していると考えられる。しかしながら、次の点は強調しておかなければならない。転写メディエーターや 5'-キャッピ

グ酵素は CTD に直接結合するが、DSIF と NELF は CTD 以外の部分の pol II と結合し、なおかつ CTD のリン酸によってその結合が制御されている。

重要な、そして未解決の問題点が残されている。P-TEFb, TFIIF, Srb (suppressor of RNA polymerase b) 10-Srb11, DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), Abl といった多くのキナーゼが CTD を *in vivo* あるいは *in vitro* でリン酸化することが報告されている (Dahmus 1996)。これらの異なったキナーゼによるリン酸化は同じ結果をもたらすのだろうか？ 一つの可能な答えは、これらのキナーゼは時間的、空間的に制御され、それぞれのキナーゼが転写サイクルの特定の時期のみに作用するというものである。あるいは、これらのキナーゼがリン酸化する CTD のアミノ酸残基が異なっており、それらが転写に異なる効果を持つのかも知れない。P-TEFb やその他のキナーゼで CTD をリン酸化したとき、DSIF と NELF の伸長抑制活性がどのように変化するのか、検討する必要があるだろう。

#### 5.3.4 NELF の構造

NELF は、RD と 4 つのポリペプチド NELF-A~D から構成される。RD 単独あるいは RD と NELF-B のみでは NELF 活性を持たない。RD 以外の NELF サブユニットの解析により、NELF の機能がより詳細に理解できると期待される。

RD は最初、ヒトおよびマウスの主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス III 領域に存在する新規遺伝子として見つかった (Levi-Strauss ら 1988)。RD は RRM 様の配列と Arg-Asp 残基の繰り返し配列 (RD モチーフ) を有している。これら 2 つのモチーフはスプライシング因子 U1 70K タンパク質にも見い出されるため、RD もまたスプライシングに関与するのではないかと示唆されていた。しかしながら私は次の理由からこのモデルに反対である。まず、RD は NELF 複合体としてのみ存在しており (図 4.5)、NELF は mRNA スプライシングに関与する伸長型の pol II とは結合しない (Mortillaro ら 1996; Corden と Patturajan 1998)。

NELF が RNA 結合活性を有しているのか、そしてそれが活性に重要であるのか、といった点は大変興味深い。HIV にコードされ Tat タンパク質は、RNA 結合活性を



持った転写活性化因子としてよく研究されている (Jones と Peterlin 1994)。Tat は HIV の LTR プロモーター下流に存在する TAR という RNA エlement に結合し、伸長反応を促進する。これまで、pol II の伸長反応を特異的に妨げるようなシスElement がいくつか同定され、pausing 部位、terminator 配列などと呼ばれている (Uptain ら 1997)。NELF がこのような配列を認識し、特定の部位での伸長反応の抑制に関わっているのかどうか、検討していく必要がある。

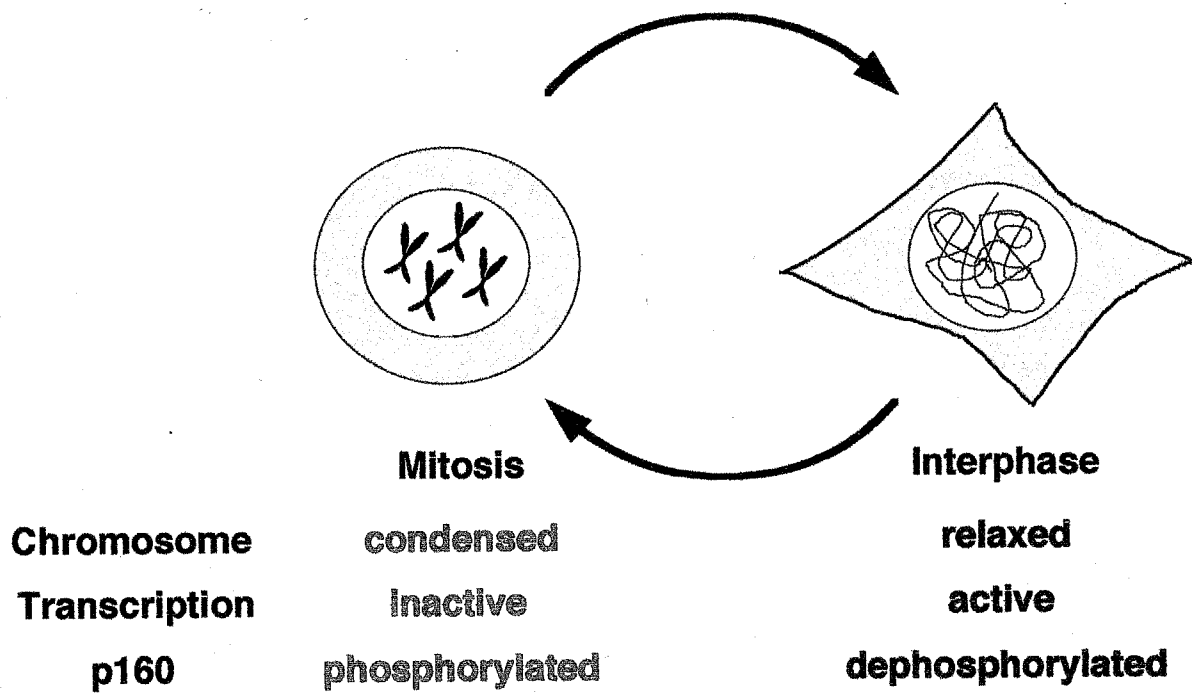
#### 5.4 医学・工学的展望

DRB はクラス II 遺伝子の転写を普遍的に抑制する。よって DSIF と NELF による転写抑制もやはり普遍的だと考えられる。これまでに同定された基本伸長因子はいずれも pol II の伸長を促進する活性を持っており、DSIF と NELF は pol II の伸長を抑制する新しいタイプの基本伸長因子である。正と負の両方の伸長因子が存在することで、緻密な伸長反応の制御が達成されていると思われる。

転写反応は様々な高次の生命現象と密接に関わっている。個体の初期発生、形態形成、ホメオスタシスの維持、細胞周期、遺伝病、記憶、老化、ウイルス増殖、癌発生などとの関わりが深い。DSIF および NELF の発現量、あるいは活性を制御することにより、伸長反応段階という、これまでにない作用点で転写反応を制御することが可能である。例えば、癌発生には c-MYC などの癌遺伝子の異常な高発現が関与している場合が多い。c-Myc の発現には転写伸長段階の制御が重要であるとの報告もある (Roberts と Bentley 1992; Krumm ら 1995)。よって、DSIF および NELF の発現量、あるいは活性を制御することにより c-Myc の異常な高発現を抑制することが可能かもしれない。また、HIV を初めとするウイルスの増殖抑制にも応用可能であろう。DSIF、P-TEFb が HIV Tat の作用に関与することが報告されている (Zhu ら 1997; Mancebo ら 1997; Wu-Baer ら 1998; データ示さず)。NELF については、その関与を直接示さなかったが、NELF が DSIF と機能的、物理的に相互作用することを考えれば、その可能性は非常に高い。

これまで、遺伝子の発現制御を標的とした薬剤の多くは、遺伝子のプロモーター、すなわち転写の開始前、あるいは開始反応に働きかけるものだった。また、遺伝子治療において、導入遺伝子の発現を制御する方法としても、プロモーターの種類が主な検討の対象であった。しかし、最近明かとなってきたように、開始反応は転写のごく始まりに過ぎず、その後、数千、数万塩基と転写産物を合成する伸長反応が存在する。pol II の RNA 合成速度と遺伝子のサイズから考えて、細胞内の多くの遺伝子の転写伸長には、数十分ないしは数時間の時間が必要である。そして、もし全長の mRNA が転写されなければ、機能的なタンパク質は合成されない。以上のように、伸長反応は極めて重要な制御段階となり得るし、開始反応だけを標的しても不十分で

ある可能性が高い。本研究において、NELF が DSIF と協調して、pol II の伸長反応を直接抑制することを明らかにした。pol II の伸長反応を促進する因子は既にいくつか知られているので、これにより、pol II の伸長反応を制御する正と負の両方をスイッチを手にしたことになる。



**Figure 5.1** A possible role of DSIF in cell cycle-dependent regulation of chromatin structure and transcription. See text for the detail.

## 参考文献

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Aso, T., Lane, W.S., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1995) Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* 269, 1439-1443.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Siedman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1995) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Basrai, M.A., Kingsbury, J., Koshland, D., Spencer, F. and Hieter, P. (1996) Faithful chromosome transmission requires Spt4p, a putative regulator of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2838-2847.
- Bortvin, A. and Winston, F. (1996) Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* 272, 1473-1476.
- Brown, S.A., Imbalzano, A.N. and Kingston, R.E. (1996) Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev.* 10, 1479-1490.
- Buratowski, S. and Sharp, P.A. (1990) Transcriptional initiation complexes and upstream activation with RNA polymerase II lacking the C-terminal domain of the largest subunit. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5562-5564.
- Cheng, J., Macon, K.J. and Volanakis, J.E. (1993) cDNA cloning and characterization of the protein encoded by RD, a gene located in the class III region of the human major histocompatibility complex. *Biochem. J.* 294 (Pt 2), 589-593.
- Chiang, P.W., Fogel, E., Jackson, C.L., Lieuallen, K., Lennon, G., Qu, X., Wang, S.Q. and Kurnit, D.M. (1996) Isolation, sequencing, and mapping of the human homologue of the yeast transcription factor SPT5. *Genomics* 38, 421-424.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R. and Buratowski, S. (1997) mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11, 3319-3326.

Chodosh, L.A., Fire, A., Samuels, M. and Sharp, P.A. (1989) 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *J. Biol. Chem.* 264, 2250-2257.

Chritchfield, J.W., Coligan, J.E., Folks, T.M. and Butera, S.T. (1997). Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6110-6115.

Corden, J.L. and Patturajan, M. (1998) A CTD function linking transcription to splicing. *Trends Biochem. Sci.* 22, 413-416.

Dahmus, M.E. (1996) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 271, 19009-19012.

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489.

Frhoman, M.A., Dush, M.K. and Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002.

Greenblatt, J., Nodwell, J.R. and Mason, S.W. (1993) Transcriptional antitermination. *Nature* 364, 401-406.

Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibody: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hartzog, G.A., Basrai, M.A., Ricupero-Hovasse, S.L., Hieter, P. and Winston, F. (1996) Identification and analysis of a functional human homolog of the *SPT4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2848-2856.

Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H. and Winston, F. (1998) Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 12, 357-369.

Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988) A general method of in vitro preparation and

specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367.

Jones, K.A. and Peterlin, B.M. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 717-743.

Kim, W.-Y. and Dahmus, M.E. (1988) Purification of RNA polymerase II from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 263, 18880-18885.

Kim, Y.J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M.H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.

Kitajima, S., Chibazakura, T., Yonaha, M. and Yasukochi, Y. (1994) Regulation of the human general transcription initiation factor TFIIF by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 29970-29977.

Krumm, A., Hickey, L.B. and Groudine, M. (1995) Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.* 9, 559-572.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

Levi-Strauss, N., Carroll, M.C., Steinmetz, M. and Meo, T. (1988) A previously undetected MHC gene with an unusual periodic structure. *Science* 240, 201-204.

Lu, H., Flores, O., Weinmann, R. and Reinberg, D. (1991) The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10004-10008.

Makela, T.P., Parvin, J.D., Kim, J., Huber, L.J., Sharp, P.A. and Weinberg, R.A. (1995) A kinase-deficient transcription factor TFIIF is functional in basal and activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5174-5178.

Malagon, F. and Aguilera, A. Differential intrachromosomal hyper-recombination phenotype of *spt4* and *spt6* mutants of *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 30, 101-106.

- Mancebo, H.S.Y., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D. and Flores, O. (1997) P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev.* 11, 2633-2644.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. (1996) Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27176-27183.
- Marshall, N.F. and Price, D.H. (1992) Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2078-2090.
- Marshall, N.F. and Price, D.H. (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* 270, 12335-12338.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S. and Bentley, D.L. (1997) 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 11, 3306-3318.
- Mogridge, J., Mah, T.F. and Greenblatt, J. (1995) A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the  $\lambda$  N protein. *Genes Dev.* 9, 2831-2845.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A. and Berezney, R. (1996) A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8253-8257.
- Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A. and Lis, J.T. (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. *Nature* 370, 75-77.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10, 2657-83.



Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C.H., Luse, D.S. and Reinberg, D. (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* 92, 105-116.

Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T. and Price, D.H. (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* 12, 755-762.

Roberts, S. and Bentley, D.L. (1992) Distinct modes of transcription read through or terminate at the c-myc attenuator. *EMBO J.* 11, 1085-1093.

Sehgal, P.B., Darnell, J.E. and Tamm, I. (1976) The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9, 473-480.

Serizawa, H., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (1993) Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* 363, 371-374.

Shilatifard, A. (1998) Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J.* 12, 1437-1446.

Speiser, P.W. and White, P.C. (1989) Structure of the human RD gene: a highly conserved gene in the class III region of the major histocompatibility complex. *DNA* 8, 745-751.

Stachora, A.A., R.E. Shafer, M. Pohlmeier, G. Maier and H. Postingl. (1997) Human Supt5h protein, a putative modulator of chromatin structure, is reversibly phosphorylated in mitosis. *FEBS Letters* 409, 74-78.

Swanson, M.S., Malone, E.A. and Winston, F. (1991) SPT5, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3009-3019.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Thompson, N.E. and Burgess, R.R. (1996) Immunoaffinity purification of RNA polymerase II and transcription factors using polyol-responsive monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* 274, 513-526.

Tsukiyama, T. and Wu, C. (1997) Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 182-191.

Ueno, A., Baek, K., Jeon, C. and Agarwal, K. (1992) Netropsin specifically enhances RNA polymerase II termination at terminator sites in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3676-3680.

Uptain, S.M., Kane, C.M. and Chamberlin, M.J. (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 117-172.

Usuda, Y., Kubota, A., Berk, A.J. and Handa, H. (1991) Affinity purification of transcription factor IIA from HeLa cell nuclear extracts. *EMBO J.* 10, 2305-2310.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., Buratowski, S. and Handa, H. (1998a) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* 12, 343-356.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. and Handa, H. (1998b) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *EMBO J.* 17, 7395-7403.

Wada, T., Watanabe, H., Usuda, Y. and Handa, H. (1991) Different biological activities of the hetero- and homodimers formed by the 47- and 43-kilodalton proteins of transcription factor ATF/E4TF3. *J. Virol.* 65, 557-564.

Watanabe, H., Wada, T. and Handa, H. (1990) Transcription factor E4TF1 contains two subunits with different functions. *EMBO J.* 9, 841-847.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. and Jones, K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-462.

Winston, F. (1992) Analysis of SPT genes: A genetic approach toward analysis of TFIID, histones, and other transcription factors of yeast. In *Transcriptional regulation* (eds S.L. McKnight and K.R. Yamamoto), pp. 1271-1293. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, N.Y.

Winston, F. and Carlson, M (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.* 8, 387-391.

Woychik, N.A. and Young, R.A. (1994) Exploring RNA polymerase II structure and function. in *Transcription: mechanism and regulation* (eds R.C. Conaway and J.W. Conaway), pp. 227-242. Ravan Press, Ltd., New York, N.Y.

Wu-Baer, F., Lane, W.S. and Gaynor, R.B. (1998) Role of the human homolog of the yeast transcription factor SPT5 in HIV-1 Tat-activation. *J. Mol. Biol.* 277, 179-197.

Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H. (1998) Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB. *Genes Cells* 3, 9-15.

Zandomeni, R., Mittleman, B., Bunick, D., Ackerman, S., and Weinmann, R. (1982) Mechanism of action of dichloro- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole: effect on in vitro transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3167-3170.

Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S. and Greenleaf, A.L. (1988) The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3698-3702.

Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B. and Price, D.H. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev.* 11, 2622-2632.

## 謝辞

本研究に際し、御指導賜りました東京工業大学半田宏教授に篤くお礼申し上げます。同じく御指導頂きました東京工業大学永田恭介助教授に心から感謝致します。有益な御指導、御助言を賜りました東京工業大学和田忠士助手ならびに渡辺肇助手に深く感謝致します。アミノ酸配列の決定、抗体作製など様々な面で御協力頂きました協和発酵工業株式会社東京研究所の杉本整治博士、矢野敬一博士ならびに古谷安希子博士に深く感謝致します。貴重な実験試料を共有して下さった東京工業大学高木俊行氏、渡辺大佑氏ならびに長谷川純氏に心より感謝致します。様々な実験試料を御分与頂いた、あるいは有益な討論をして下さった、その他の数え切れない多くの研究者の方々に感謝致します。