

2023/08/24

無細胞発現系によるヒト TFIIE の調製

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 プロジェクト研究室

奥田 昌彦

1. 成果の概要

実施内容

真核生物において、タンパク質をコードする転写の開始は、RNA ポリメラーゼ II と6種類の基本転写因子により行われる。基本転写因子 TFIIE は他の基本転写因子 (TFIIA, TFIIIB, TFIIID, TFIIIF, TFIIH) と共に RNA ポリメラーゼ II の転写の開始を援助する。ヒト由来の TFIIE は 439 アミノ酸残基の α サブユニットと 291 アミノ酸残基の β サブユニットからなる分子量約 84,000 のヘテロダイマーである。TFIIH をリクルートし転写開始前複合体の形成を完成させ、また TFIIH のキナーゼ活性を制御し、転写開始段階だけでなく伸長段階への遷移時においても重要な役割を果たす。

TFIIE はいくつかの構造ドメインがリンカーで繋がれたビーズ様構造である。我々は NMR 法を用いて TFIIE の立体構造を研究してきた。NMR 法による立体構造決定の観点からすると、TFIIE は高分子量であり溶解度も低く研究対象の枠を超える。このような理由から、構造的に安定ないくつかのドメインの立体構造を決定し有益な知見を得てきた。しなしながら、TFIIE の立体構造をより深く理解するためにはインタクトな高分子量の TFIIE を対象にしなければならず、NMR 法の分子量問題に帰着する。しかしながら、近年の技術革新 (分光器の高磁場化、クライオプローブの利用、高分子量用測定法の開発、重水素、標識アミノ酸試料の利用等) や、クライオ電子顕微鏡解析やアルファフォールド等からの構造情報により、NMR 法による TFIIE の全体構造の解析も現実的なものとなってきている。

我々は高分子量 TFIIE 複合体の立体構造を解析に向けて、無細胞発現系を利用した安定同位体標識 TFIIE 複合体の調製を検討した。精製後、NMR 法により正しく立体構造が形成されているかを確認した。

本課題により得られた成果、当初目標と結果との比較

無細胞発現系から調製した TFIIE の $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC、及び $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC のスペクトルは、以前に大腸菌の発現系から調製して得られたスペクトルと完全に一致した。このことから、TFIIE 複合体が正常に形成されているといえる。従って、当初の目標を達成することができた。

今後の展開、課題

以下の3種類の試料が今後の研究で必要になる。

- (1) ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識アミノ酸を用いた無細胞発現系からの試料調製
- (2) 特定のアミノ酸を標識した試料の無細胞発現系からの調製
- (3) 一方のサブユニットを安定同位体標識、他方のサブユニットを非標識した複合体試料の無細胞発現系からの調製

2. 利用における感想(改善要望等を含む)

収量が要望量よりか少なかったので、収量向上を要望します。

3. 利用周辺環境に関する希望

特に問題等ありません。

4. 今後の利用予定

機会があれば利用したいです。

5. 今後期待するその他のサービス

精製サービスを期待します。

6. その他

特に無いです。

7. 利用実施時期及び期間

2008年7月 日 ~ 2008年8月 日

当初計画どおり

8. 利用研究基盤

溶液 600MHz 2018年8月13日 ~ 2018年8月14日 (2日間)

立体構造解析パイプライン