

転写開始複合体形成におけるRNAポリメラーゼサブユニットRPB5の役割と転写制御

著者	村上 清史
著者別表示	Murakami Seishi
雑誌名	平成8(1996)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1995-1996
ページ	7p.
発行年	1997-03
URL	http://doi.org/10.24517/00050059



KAKEN

1996

10

転写開始複合体形成における RNA ポリメラーゼ サブユニット RPB5 の役割と転写制御

研究課題番号 07458178

平成7-8年度科学研究費補助金（基盤研究B2）

研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 村上清史

（金沢大学がん研究所教授）

1. はじめに

真核生物の転写はプロモータの多様性に対応して、転写活性化因子、基本開始複合体構成因子及びRNAポリメラーゼ(RNAP)のサブユニット構成の多様性が存在している。転写制御の研究は、エンハンサー結合蛋白の機能と構造の検討が進められ、次いで開始の転写基本因子とエンハンサー結合蛋白の相互作用と転写過程への役割が明かとなった。最近、転写開始複合体形成と転写効率に関与するcofactor及びmediatorの存在が明らかになると共に、RNAPの機能複合体が巨大なHolo enzymeとして存在することが示された。しかしRNAPが10種類を越えるサブユニット構成からなる巨大分子であるため、RNAPサブユニットの機能分担と転写関連因子との相互作用はRPB1のcarboxy terminal domain(CTD)の機能解析などに限られている。

我々は、従来からヒト肝細胞がん発症に寄与するB型肝炎ウイルス(HBV) X蛋白の構造と機能を解析してきた。X遺伝子は上流のエンハンサー-1を介した自己制御系を構成し、X蛋白はウイルス遺伝子及び宿主の増殖・炎症関連の遺伝子をトランス活性化し、細胞の増殖化傾向をもたらし、がん化への寄与が報告されている。しかし、HBV X蛋白は極めて多様なDNAシス配列を介して転写のトランス活性化をもたらすことが報告され、トランス活性化機構を転写活性化因子に帰することは困難であった。

我々は、X蛋白に結合する宿主蛋白の探索からX蛋白の機能を解析する方法を探り、RNAP I, II, IIIに共通するサブユニットであるRPB5をX結合蛋白として単離した。本研究は、両者の相互作用による転写開始機能の修飾を分子機構として解明するために、RPB5の機能標的を探索し、X蛋白の役割を検討し、RPB5の構造と機能の解析を行った。

2. 研究組織

研究代表者 村上 清史 (金沢大学がん研究所教授)
分担研究者 野村 孝弘 (金沢大学がん研究所助手)

3. 研究経費

平成7年度：4,600千円
平成8年度：2,400千円
計：7,000千円



8000-55-05-1

金沢大学附属図書館

4。研究発表：

A)原著論文

1. Cheong, JH., Yi, MK., Lin, Y., Murakami, S. (1995)
Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation.
EMBO J., 14:143-150 .
- 2.. Morohashi H., Miyawaki, T., Nomura, H., Kuno, K., Murakami, S., Matsushima, K., Mukaida, N. (1995)
Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells.
J. Leukocyte Biol., 57:180-187.
3. Nakamoto, Y., Kaneko, S., Ohno, H., Honda, M., Unoura, M., Murakami, S., Kobayashi, K. (1996)
B-cell epitopes in hypervariable region 1 of hepatitis C virus obtained from patients with chronic persistent hepatitis. J. Med. Virol., 50:35-41.
4. Murakami, S. , Lin, Y., Cheong, JH., Dorjsuren, D., Iida, K., Nomura, T. (1996)
Human hepatitis B virus X protein is a transcriptional regulator that interacts with TFIIB and RNA polymerase.
in Recent progress in liver cancer and hepatitis. p202-203. edited by XY. Tan.
5. Lin, Y., Nomura, T., Cheong, JH., Dorjsuren, D., Iida, K., Murakami, S. (1997)
Delineation of interaction sites of Hepatitis B virus X protein and tumor suppressor p53.
in Viral Hepatitis and Liver Disease, ed. by Rizzeto et al. in press.
6. Lin, Y., Nomura, T., Cheong, JH., Dorjsuren, D., Iida, K., Murakami, S. (1997)
Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor TFIIB and the RNA polymerase subunit RPB5.
J. Biol. Chem., in press.
7. Yi, MK., Nakamoto, Y., Kaneko, S., Yamashita, T., Murakami, S. (1997)
Delineation of regions important for heteromeric association of hepatitis C virus E1 and E2.
Virol., in press
8. Ohno, H. , Kaneko, S., Kobayashi, K., Murakami S. (1997).
Human hepatitis B virus enhancer 1 is responsive to human interleukin-6.
J. Med. Virol. in press.

B) 口頭発表

a) 国際会議

9. S. Murakami, Y. Lin and JH. Cheong, D. Dorjsuren, K. Iida, T. Nomura. (1995)
Is human hepatitis B virus X protein (HBx) a transcriptional mediator communicating between TFIIB and RNA polymerase ?
Molecular Biology of Hepatitis B Viruses at UCSD. La Jolla, July 23-27 1995.

10. Y. Lin, JH. Cheong, D. Dorjsuren, T. Nomura, K. Iida, S. Murakami. (1995)
Human hepatitis B virus X protein (HBx) interacts with basal transcription factor TFIIIB, and may modulate transcription process.
Molecular Biology of Hepatitis B Viruses at UCSD. La Jolla, July 23-27 1995.
 11. S. Murakami, Y. Lin, JH. Cheong, D. Dorjsuren, K. Iida, T. Nomura. (1996)
Human hepatitis B virus X protein is a transcriptional regulator that interacts with TFIIIB and RNA polymerase.
Shanghai International Symposium on liver cancer and Hepatitis. Shanghai.
March 5-7
 12. Y. Lin, T. Nomura, JH. Cheong, S. Murakami. (1996)
The interacting sites of hepatitis B virus X protein and tumor suppressor p53.
Shanghai International Symposium on liver cancer and Hepatitis. Shanghai.
March 5-7
 - 13 Y. Lin, T. Nomura, JH. Cheong, S. Murakami. (1996)
Delineation of the interacting sites of hepatitis B virus X protein and tumor suppressor p53.
IX Triennial International Symposium on viral hepatitis and liver diseases. Rome,
April 21-25.
 14. S. Murakami, Y. Lin, T. Ohta, D. Dorjsuren, T. Nomura. (1996)
Hepatitis B virus X protein as a transcriptional modulator.
Molecular Biology of Hepatitis B Viruses at Cold Spring Harbor Lab., Sept. 18-22.
 15. MK. Yi, S. Kaneko, DY. Yu, S. Murakami. (1997)
Hepatitis C virus envelope proteins bind human lactoferrin.
Kyoto International Symposium on Hepatitis C virus and Flaviviruses. Kyoto.
March 6-10.
 16. T. Yamashita, Y. Shirota, WP. Qin, S. Kaneko, K. Kobayashi, S. Murakami. (1997)
RNA-dependent RNA polymerase activity of purified bacterial recombinant hepatitis C virus (HCV) NS5B and its binding activity to HCV.
Kyoto International Symposium on Hepatitis C virus and Flaviviruses. Kyoto.
March 6-10, 1997.
- b)国内学会口頭発表
17. 村上清史、リン ヨン、チョン ジェフン(1995)
ヒトB型肝炎ウイルスX蛋白と転写装置との結合とトランス活性化
第54回日本がん学会総会ワークショップ、京都、10月
 18. Y. LIN, D. Dorjsuren, JH. Cheong, T. Nomura, K. Iida, S. Murakami. (1995)
Human hepatitis B virus X protein (HBx) interacts with basal transcription factors and may modulate transcription process.
第54回日本がん学会総会ワークショップ、京都、10月
 19. 村上清史、Lin Yong, Cheong JaeHun, Dorjsuren Dorjbal, 飯田克平、野村孝弘(1995)
ヒトB型肝炎ウイルスX蛋白と転写装置との結合とトランス活性化
第18回日本分子生物学会年会、名古屋12月6日-9日
 20. 村上清史、リンヨン、ドルブーレンドルジバル、野村孝弘(1996)
ヒトB型肝炎ウイルスX蛋白の転写促進の分子機構
第55回日本がん学会総会ワークショップ、10月、横浜

- 21.リンヨン、野村孝弘、ドルゾーレンドルジバル、山下竜也、村上清史(1996)
ヒトB型肝炎ウイルスX蛋白とp53の相互作用部位
第55回日本がん学会総会ワークショップ、10月、横浜
- 22.古倉健嗣、岸本俊彦、熊谷洋一、牧野康隆、広橋節雄、村上清史、村松正実、
田村隆 明(1996)
肝臓癌細胞で発現量が上昇するB型肝炎ウイルスのX蛋白質結合性転写制御因子
HTF(Hepatocarcinogenesis-related Transcription Factor)
第55回日本がん学会総会ワークショップ、10月、横浜

C) 日本語書著及び総説

23. 村上清史(1995)
ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)X蛋白に結合するヒト宿主蛋白hRPB5の同定とXトランス活性化。
臨床病学の進歩、21:46-51
24. 中本安成、村上清史 (1995)
C型肝炎ウイルス表面抗原E2の高変異領域(HVR1)のB細胞エピトープの解析
日本臨床、53:117-122.
25. 村上清史(1995)
ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)X蛋白とRNAポリメラーゼのサブユニットhRPB5との結合とXトランス活性化
日本臨床、53:75-81.
26. 村上清史(1995)
ヒトB型肝炎ウイルス(HBV)X蛋白のトランス活性化機構
臨床科学、31:1671-1678.
27. 村上清史(1995)
HBV研究の新展開—HBV X蛋白は転写装置本体 (RNAポリメラーゼ) と結合する。
実験医学、13:76-79.
28. 村上清史(1996)
B型肝炎ウイルスX蛋白の機能と肝発がん
血液・腫瘍科 32:107-116.
29. 野村孝弘、村上清史(1996)
B型肝炎ウイルス
メデカル用語ライブラリー：肝炎・肝硬変・肝癌 p28-29 (1996)
小俣政男編 羊土社
30. 林 勇、村上清史(1996)
Far-Western法による蛋白と蛋白の相互作用の検索
血液・腫瘍科 32:107-116.

研究成果

本研究の中心となる研究成果は、原著及び印刷中の原著論文及び総説論文をもって代える。それらの研究の概要と未発表の研究成果は次の通りである。

(1) RNAポリメラーゼサブユニットRPB5は、ヒトB型肝炎ウイルス(HBV) X蛋白と相互作用をするのみならず、転写基本因子TFIIBと結合することが、*in vitro*のfar-Western法、pull down法で示され、*In vivo*に於ける相互作用はHepG2細胞のtransient expression系で確認された。TFIIBはRPB5と共にHBV X蛋白と特異的に相互作用することが*in vivo*及び*in vitro*で確認された (No.6, No.9, No.14, No.23, No.25)。

(2) この3者間の相互作用を解析した結果、それぞれが異なった結合領域を介して他の2者と結合することが示され、3者複合体形成の可能性を示唆した。*in vitro*でpull down法を用いて、GST癒合型でX蛋白結合部位を欠損したRPB5はX蛋白をレジニンに回収することはできなかったが、TFIIBの存在下でX蛋白を回収可能であった。この結果は3者の複合体形成が可能であることを示唆した。この3者が強制発現したHepG2細胞の抽出蛋白を用いた免疫沈殿法によって、3者複合体形成が示唆された (No.6, No.14)。

(3) X蛋白のトランス活性化ドメイン内にRPB5結合及びTFIIB結合に寄与する領域がfar-Western法によって区別してマップされた。両者の結合領域内のX蛋白の置換変異を構築し、変異X蛋白のRPB5結合能とTFIIB結合能を検討した。その結果、TFIIB結合能が正常でRPB5結合能の低下した変異(Xm89, Xm93)、RPB5結合能が正常でTFIIB結合能の低下した変異(Xm120)が得られ、X蛋白のトランス活性化ドメイン内にRPB5及びTFIIB結合の領域が存在することが示唆された。これらの変異のトランス活性化能への効果を検討した結果、何れの変異もX蛋白のトランス活性化能が極端に低下させた。これらの結果はX蛋白のトランス活性化にはRPB5とTFIIBとの結合が何れも必要であることを示唆した (No.6, No.14)。

(4) 3者の複合体形成と3者間結合のXトランス活性化能への効果は、X蛋白が転写開始複合体形成の段階でRNAPとTFIIBの結合を安定化する可能性を示唆した。この推定を確認するために、*in vitro*転写系の精製X蛋白の添加効果を検討した。予備的結果は、非融合型X蛋白は遠位エンハンサー(Gal4結合部位)と転写活性化因子(GalVP16:Gal4のDNA結合領域とVP16の転写活性化ドメインを結合した蛋白)に依存して転写活性化を亢進させることが示された (No.17、投稿準備中)。

(5) 同様な人工的な系であるGal4x5CATレポータを用いた*in vivo*の検討を行った。その結果、X蛋白はGalVP16に依存して、レポータの転写を亢進した。しかし、Gal-HBxでは全く促進効果が観察されず、逆にsquencingと解釈される負の効果を示した (No.17、投稿準備中)。

これらの結果は、HBxは転写活性化因子存在するactivated transcription系でco-factorとしての機能を保持していることを示唆した。(3)(4)(5)の結果は、HBxがRNAP及びTFIIBとの相互作用を介して転写効率を上げる能力を持って

いる仮説と矛盾しない (No.17、投稿準備中)。

In vitro転写再構成系で示されているTFIID, TFIIA, TFIIBから構成される転写前複合体とRNAPから転写複合体形成の段階にX蛋白が機能しているのか、又はX蛋白がHolo酵素中のRNAPとTFIIBの複合体を安定しているのかについては、今後の検討に残された。

(6) 最近幾つかのグループにより示唆されたがん抑制蛋白p53とX蛋白との相互作用を我々も検討した。その結果、p53とX蛋白との結合がin vitroの各種の方法で確認された。両者の結合部位の限定から、X蛋白のトランス活性化ドメイン内にp53結合部位が限局し、TFIIB結合部位と重複した。in vivoの系で、X蛋白はp53依存トランス活性化を抑制し、Xトランス活性化もp53により干渉を受けた。しかしp53欠損の幾つかの細胞株を用いたTransient transfection系で、X蛋白によるトランス活性化が観察された。これらの結果は、p53とX蛋白の相互干渉があるが、Xトランス活性化はp53との結合能とは区別されることが示された (No.5, No.21、一部投稿準備中)。

(7) RPB5がX蛋白と相互作用し転写の効率化をもたらす結果は、X蛋白がRPB5と内在性の宿主蛋白との相互作用を排除する可能性がある。この可能性を検討するために、RPB5結合蛋白のcDNA単離をfar-Western法を用いて行い、1種のcDNA (RPB5-mediating-protein:RMP)を単離した。全長cDNAの単離を進めた結果、RMPは新規遺伝子であった (投稿準備中)。予備的結果は、RMPがX蛋白によるトランス活性化に拮抗した。この結果はRMPが抗X遺伝子として機能することを示唆した (#20、発表準備中)。RMPが新規のがん抑制遺伝子である可能性もあり、今後の系統的な解析が必要となった。