

グローバル転写因子 TLP の作用機序の解明

2015年8月

千葉大学大学院理学研究科

地球生命圏科学専攻 生物学コース

鈴木 秀文

(千葉大学審査学位論文)

グローバル転写因子 TLP の作用機序の解明

2015年8月

千葉大学大学院理学研究科

地球生命圏科学専攻 生物学コース

鈴木 秀文

目次

要旨	1
序論	2
材料と方法	4
結果	9
TLP ノックダウンによる遺伝子発現の変動	
TLP による p21 遺伝子の転写活性化	
TLP と TFIIA による協調的な p21 上流プロモーターの活性化	
TLP 依存的な TFIIA のプロモーター結合	
TLP による TATA box プロモーター活性の抑制	
TLP による TFIIA プロセシングの阻害	
プロセス型 TFIIA による TATA box プロモーターの活性化	
TLP ノックダウンによるクロマチン結合 TBP 量の増加	
TLP による細胞増殖抑制	
考察	17
TLP によるグローバルな遺伝子発現制御	
TLP-TFIIA の p53 依存的な転写活性化機能	
TLP は TFIIA プロセシングの阻害因子として機能する	
TFIIA $\alpha \beta$ のプロセシングによる TFIIA の転写活性化機能の獲得	
TLP による TFIIA 前駆体のプロセシング制御の意義	
謝辞	21
参考文献	21
図の説明	25
図 1~15	30

要旨

TATA-binding protein (TBP) と TFIIA との相互作用は、RNA ポリメラーゼ II に駆動される遺伝子発現制御における重要な相互作用の 1 つである。TBP の類似因子である TBP-like protein (TLP) は TBP と約 40%の相同性を示すタンパク質であり、TBP 同様に TFIIA との相互作用を示す。TLP-TFIIA の相互作用は TBP-TFIIA 相互作用よりも強く安定であることが広く知られているが、その生物学的意義には不明な点が多く残されている。本研究では TLP-TFIIA 相互作用に焦点を当て、遺伝子発現が TLP-TFIIA 複合体によってどのような機構で制御されるのかを明らかにする事を目的として解析を行った。その結果、TLP-TFIIA 複合体は、TATA box プロモーターと TATA-less プロモーターに対して異なる作用を示すことが明らかになった。まず TLP によって調節を受けるプロモーターとして p21 遺伝子の上流 TATA-less プロモーターを解析したところ、TLP-TFIIA 複合体は p21 プロモーターを活性化していることが示された。TLP は TFIIA の p21 TATA-less プロモーターへの結合を促進し、TFIIA と協調的にプロモーターを活性化していた。また、p21 TATA-less プロモーターは p53 依存的なプロモーターであり、TLP と TFIIA による活性化は p53 依存的であることが明らかにされた。以上のことから、TLP-TFIIA 複合体が p53 の共役因子様に作用していることが明らかにされ、TLP-TFIIA 複合体の TATA-less プロモーターにおける新しい作用機構が示された。一方で、TATA box プロモーターに対しては TLP-TFIIA 相互作用は抑制作用を示すことが明らかになった。TLP が TFIIA タンパク質に与える影響を詳しく調べたところ、TLP は Taspase1 による TFIIA のプロセッシングを阻害していることが明らかとなった。さらに TFIIA のプロセッシングが TATA box プロモーターの活性化に必要とされていたことから、TLP が TFIIA のプロセッシングを阻害する事で TATA box プロモーターの活性化を抑制するというモデルを提唱した。本研究成果によって、TLP は TATA-less プロモーターと TATA box プロモーターそれぞれに対して TFIIA を介した特異的な作用を発揮し、それによってグローバルな転写制御因子としての機能を果たしている可能性が考えられた。

序論

遺伝子プロモーター領域への転写開始前複合体 (PIC : pre-Initiation complex) の形成は、遺伝子発現を制御する最も重要な調節段階の 1 つである。TATA box は近位プロモーター領域に存在する調節配列であり、ヒトゲノム遺伝子のおよそ 20% の遺伝子プロモーターに見られる [1]。TATA box には TATA-binding protein (TBP) をはじめとした基本転写因子 (TFIIA、TFIIB、TFIIE、TFIIF、TFIIH) が結合し、転写開始点近傍に PIC が構成されることで転写が開始される [2-5]。TBP の TATA box への安定な結合には TFIIA の働きが必要である [6-8]。TFIIA は TBP、TFIIB と共に PIC のコアを形成する基本転写因子であり、TBP-TATA box の親和性を上昇させることによって TATA box プロモーターの活性化に寄与している。一方、TATA box を持たないプロモーターでは TATA box プロモーターとは異なった機構で転写が開始されていると考えられている。TFIIA は TATA-less プロモーターに対しても作用して転写活性化を担っていることが報告されている。このように、TFIIA は TBP-TATA box 結合を安定化する基本転写因子としての機能に加えて、転写コアクチベーターとしての機能も有している [9-11]。以上の事実は、TFIIA が様々な機構でプロモーター活性を制御していることを示唆しているが、その詳細な分子機構には未だ不明な点が多い。

TFIIA は α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットから構成される複合体である [8]。TFIIA α および TFIIA β は 1 つの遺伝子 (TFIIA-L) にコードされており、この遺伝子は出芽酵母の TOA1 に相当する。酵母 TOA1 とは異なり、哺乳類の TFIIA-L から生じる TFIIA 前駆体 (TFIIA $\alpha\beta$) は、Taspase1 によって QVDG アミノ酸配列におけるプロセッシングを受けることで、TFIIA α と TFIIA β の成熟サブユニットを生じる [12]。これらのサブユニットは TFIIA γ と会合することでホロ TFIIA ($\alpha/\beta + \gamma$) を形成する。プロセスされた α 、 β と γ から成るこのホロ TFIIA 複合体は、転写において活性型 TFIIA の分子形態であるとこれまで考えられてきた。マウスの精子形成過程においては、発生に伴って Taspase1 によって TFIIA 前駆体がプロセッシングされることで転写活性化機能を獲得し、精子形成特異的遺伝子の発現を上昇させる [13]。また、ヒト培養細胞である HeLa 細胞内では、ほとんどの TFIIA がプロセスされた状態で存在している事からも、プロセス型 TFIIA が機能活性型であることが示唆されている。ただし一方では、TFIIA 前駆体が転写活性化に働いているという報告もある [12, 14, 15]。TFIIA を欠損した *Xenopus* 胚は発生の停止や奇形を生じるが、プロセスを受けない TFIIA 前駆体を導入する事によってそれらの変異が回復することがわかっている [12]。また、P19 胚性腫瘍細胞においては、TFIIA 前駆体は TFIIA γ

と TBP とともに TAC (TBP-TFIIA containing) 複合体と呼ばれる安定な複合体を形成し、*in vitro* で転写活性化能を示すことが報告されている [14, 15]。これらの報告は、TFIIA 前駆体およびプロセス型 TFIIA はそれぞれ発生時期特異的な機能をもつことを示唆している。以上の状況から、TFIIA のプロセシングの調節機構を明らかにすることは、TFIIA による転写調節機構の解明に重要であると考えられる。

TBP-like protein (TLP) は、TFIIA 結合因子の 1 つとして同定された因子であり、現在知られているタンパク質の中では最も強い TFIIA 結合能を示す [16, 17]。TLP は TRF2 という名称でも知られている、TBP ファミリーに属するタンパク質の 1 つである [18-21]。TLP は TBP と異なり TATA box への結合能が欠損している一方で、TBP の TFIIA および TFIIB 結合アミノ酸は TLP において保存されており、実際に TLP は TFIIA と TFIIB に結合できる。TLP はショウジョウバエの TCT モチーフをもつプロモーターや DPE (downstream core promoter element) 依存的なプロモーター、さらにはヒストン遺伝子クラスターのプロモーターなど、複数の TATA-less プロモーターを活性化しているという報告がなされている [21-23]。一方で、これまでの *in vitro* 系での転写実験から、TLP は TATA box をもつプロモーターを抑制する機能をもっていることもわかっている。このように、TLP は TATA box プロモーターおよび TATA-less プロモーターの両方のプロモーター活性に影響を与えるようである。TLP の TFIIA への結合力は TBP と TFIIA 間の結合力よりもはるかに強く、TLP と TFIIA は解離しにくい安定な複合体を形成することがわかっており [17]、この TLP-TFIIA 相互作用が細胞内において遺伝子発現の制御に関与していることは想像に難くない。事実、当研究室のこれまでの多くの研究結果から、TLP による転写制御には TFIIA との結合性が重要であることが示唆されてきた。しかしながら、細胞内における TLP の挙動に関してはまだ不明な点が多く、TLP が TFIIA 結合性を介してどのような機構でプロモーター活性を調節しているのか、そしてどれだけの遺伝子が TLP によって制御されているのかといった重要な事柄はまだ明らかにされていなかった。

TLP 機能の本質に迫るこれらの問題を解決するために、TLP の最大の特徴である TFIIA 結合性に着目して遺伝子発現制御解析を行った。本研究では、TLP-TFIIA 相互作用が TATA-less プロモーターおよび TATA box プロモーターを調節する機構を解析することで、TLP が遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果 TLP-TFIIA 複合体は TATA-less プロモーターに対しては転写活性化複合体として機能するが、TATA box プロモーターに対しては TLP-TFIIA 相互作用が TFIIA 前駆体のプロセシングを阻害することで抑制的な効果を発揮していることが明らかになった。以上の結

果から、TLP が TATA-less プロモーターと TATA box プロモーターの双方に特異的な調節機能をもち、TLP は遺伝子発現を包括的に制御するグローバル転写因子であることが示唆された。

材料と方法

細胞培養、薬剤処理、トランスフェクション

解析にはヒトの培養細胞である HeLa 細胞、野生型 HCT116 細胞 あるいは p53 欠損 HCT116 細胞を用いた。HeLa 細胞と HCT116 細胞は DMEM- Low glucose、DMEM-High glucose (和光純薬) 培地を用いて 5% CO₂、37°C で培養した。シクロヘキシミド (CHX)、MG132、エトポシド (和光純薬) はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶かし、細胞培養中の培地に加えた。培養細胞へのプラスミドあるいは siRNA のトランスフェクションには Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いた。TLP および TFIIA のノックダウンに用いた siRNA の配列は以下の通りである。

TLP sense = 5'-UAACAGGGCCCAAUGUAAA

TLP antisense = 5'-UUUACAUUGGGCCCUGUUA

TFIIA α β sense = 5'-GAUGGGCAGGUGGAAGAAG

TFIIA α β antisense = 5'-CUUCUCCACCUGCCCAUC

プラスミド

哺乳類発現プラスミド

FH-TLP、FH-N37E、FH-R52E、FH-R55E、そして FH-MyoD の発現プラスミドについては、文献に記載の通りである [17, 24]。FH-TFIIA-L (α β)、FH-TFIIA-S (γ)、pCIneo-FH-TBP はそれぞれヒト TFIIA-L、TFIIA-S、TBP の ORF の N 末端に FLAG/オリゴヒスチジンタグ (FH タグ) が付加され、pCIneo 哺乳類発現ベクターに挿入されている。TFIIA-L の DGAA 変異体は、pCIneo-FH-TFIIA-L を元に、PCR による変異導入法によって作製された。DGAA 変異体は、TFIIA-L の 274 番目のアスパラギンと 275 番目のグリシンがアラニンに置換された変異体である。

大腸菌発現プラスミド

TBP、Taspase1、TFIIA-L、TFIIA-S の ORF を pET-3a ベクター (Novagen) にサブクローニングした。TBP、Taspase1 には FH タグが、TFIIA-S にはオリゴヒスチジンタグ (His) がそれぞれの N 末端に付加されている。TLP 発現プラスミド (pET-FH-TLP) は文献に記載の通りである [17]。

レポータープラスミド

レポータープラスミドのベクターには、pGL4.10 (Promega) を用いた。ヒト p21 プロモーターの-2266 から-1875 の領域を PCR 法によってヒトゲノム DNA の p21 遺伝子領域から単離し、pGL4.10 ベクターに挿入した。p21 遺伝子の転写開始点(+1) は、下流プロモーターから生じる転写産物 p21 variant-1 の転写開始点を指す。p21-168/GL4、p21-65/GL4、p21-5/GL4 も同様に PCR 法に基づく方法によってそれぞれのプロモーター領域を単離し、pGL4.10 ベクターに組み込むことによって作製した。GAPDHWT/GL4 は HeLa 細胞から抽出したゲノム DNA を基に、PCR 法によって作製した。GAPDHmutTATA/GL4 は GAPDHWT/GL4 の TATA box 配列を変異させたプロモーターコンストラクトである。

PCR

全細胞 RNA を RNeasy Mini キット (QIAGEN) を用いて定法通り抽出し、RT-PCR は Prime Script II (TaKaRa) を用いて定法通り行った [25]。得られた逆転写反応物を鋳型として PCR を行い、増幅産物は 2%アガロースゲルで泳動して検出した。PCR 反応は Paq 5000 DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を用いて定法通り行った。定量 PCR は、Thunderbird qPCR Mix (ToYoBo) と 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。PCR および定量 PCR において、それぞれの遺伝子の転写産物の検出に用いたプライマーセットは以下の通りである。

total p21 forward = 5'-GACACCACTGGAGGGTGACT

total p21 reverse = 5'-CCCTAGGCTGTGCTCACTTC

p21 alt-a forward = 5'-GGTGGCTATTTTGTCCCTTGG

p21 alt-a reverse = 5'-ACAGGTCCACATGGTCTTCC

p21 variant-1 forward = 5'-CTGCCGAAGTCAGTTCCTTG

p21 variant-1 reverse = p21 alt-a reverse と同一

β -actin forward = 5'-ACTGGGACGACATGGAGAAAA

β -actin reverse = 5'-GATAGCACAGCCTGGATAGCAA

GAPDH forward = 5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA

GAPDH reverse = 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC

c-Myc forward = 5'-CATCAGCACAACACTACGCAGC

c-Myc reverse = 5'-GCTGGTGCATTTTTCGGTTGT

α -tubulin forward = 5'-CTGGCTTCACCTCACTCCTG

α -tubulin reverse = 5'-GAAGGCACAGTCTGAGTGCT

BRCA1 forward = 5'-GGTGGTACATGCACAGTTGC
BRCA1 reverse = 5'-ACTCTGGGGCTCTGTCTTCA
TLP forward = 5'-GGAAGATTGCTTTGGAAGGAGC
TLP reverse = 5'-CCTGAGGACCAAATTGTAGCTG
INK4a forward = 5'-GAATAGTTACGGTCGGAGGC
INK4a reverse = 5'-GTACCGTGCGACATCGCGAT
LMNA forward = 5'-TCGCATCACCGAGTCTGAAG
LMNA reverse = 5'-ACTGAGTCAAGGGTCTTGCG
TBP forward = 5'-CTGGCCCATAGTGATCTTTGC
TBP reverse = 5'-TCAATTCCTTGGGTTATCTTCACA
TFIIA-S forward = 5'-TTTGGGAAACAGTCTTCAGGA
TFIIA-S reverse = 5'-CCATCACAGGCTACAATTTTCA
14-3-3 σ forward = 5'-AGAGCGAAACCTGCTCTCAG
14-3-3 σ reverse = 5'-CTCCTTGATGAGGTGGCTGT
GADD45 forward = 5'-ACGAGGACGACGACAGAGAT
GADD45 reverse = 5'-GCAGGATCCTTCCATTGAGA

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

24 穴プレートに細胞をまき、24 時間後にプラスミドを導入した。ノックダウン条件下での解析では、siRNA をレポータープラスミドとエフェクタープラスミド導入の 36 時間前に導入した。プラスミドのトランスフェクション後 12 時間から 24 時間後に細胞を Passive Lysis Buffer (Promega) で溶解し、Dual Luciferase System (Promega) によってルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションされたプラスミド DNA 量は pRL-TK を用いて補正した。Single Luciferase Assay の場合、ルシフェラーゼ活性は、BCA 法によって測定した細胞溶解液のタンパク質濃度を用いて補正した。

免疫沈降

細胞抽出液の調製は文献に従って行った [17]。調製した 300 μ g の細胞抽出液に特異的抗体を加えて反応させ、Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) で目的タンパク質を免疫沈降させた。細胞抽出液中の FH タグ融合タンパク質は抗 Flag M2 アフィニティゲル (Sigma-Aldrich) を用いて免疫沈降させた。ウサギ IgG と IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) はコントロール

ールとして使用した。免疫沈降されたタンパク質はビーズから溶出し、ウエスタンブロットニングで解析した。

ウエスタンブロットニング

12.5%の SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) を用いて定法通り分離後、タンパク質を Immobilon-P PVDF メンブレン (Millipore) に転写させ、特異抗体と反応させた。1 次抗体に用いた抗体を以下に示す。p53 抗体 (Santa Cruz)、GAPDH 抗体 (Santa Cruz)、p21 (CDKN1A) 抗体 (Santa Cruz)、 β -actin 抗体 (Ambion)、抗 FLAG M5 抗体、 α -tubulin 抗体 (Santa Cruz) はいずれも商品となっているものを使用した。TLP 抗体、TFIIA α β 抗体、TFIIA γ 抗体はそれぞれの抗原を基にウサギに免疫したものを精製した、本研究室で調製された抗体である。2 次抗体には、抗マウス IgG-HRP あるいは抗ウサギ IgG-HRP を用いた。検出には ImmnoStar Zeta (和光純薬) を用いた。

クロマチン免疫沈降 (ChIP)

クロマチン免疫沈降法は Saramäki らのプロトコルを基に、一部を改変して行った [26]。細胞を 10 cm シャーレで培養した後、1%ホルムアルデヒドで固定した。細胞抽出液は超音波処理し、クロマチンを細断化した。内在性タンパク質と外因性 FH-タンパク質は、特異抗体と Protein G-Sepharose 4 Fast Flow による方法と抗 Flag M2 アフィニティゲルを用いた方法でそれぞれ免疫沈降した。タンパク質と共に沈降した DNA はフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿によって精製し、特異的プライマーを用いて PCR で増幅することで解析した。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

β -actin forward = 5'-TCCTCAATCTCGCTCTCGCT

β -actin reverse = 5'-GCCGCTGGGTTTTATAGGGC

GAPDH forward = 5'-CTCAAGACCTTGGGCTGGG

GAPDH reverse = 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGA

Myc-u forward = 5'-GGCGTGGGGGAAAAGAAAAA

Myc-u reverse = 5'-CGTCCAGACCCTCGCATTAT

Myc-d forward = 5'-GAGGCTTGGCGGGAAAAAGA

Myc-d reverse = CTCTGCCTCTCGCTGGAAT

IIA-S forward = 5'-CTTCCCTGACAAGGCTTGAGT

IIA-S reverse = 5'-CAGAACTGAGCTGACGACCC

TBP forward = 5'-CTCAAGAGCTTCGCCCCTC

TBP reverse = 5'-AATGTCACTTCCGCCAGTT

組換えタンパク質の精製

FH-TBP、FH-Taspase1、TFIIA α β 、His-TFIIA γ は大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換させ、組換えタンパク質の発現は isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) で誘導した。細胞を溶解バッファー (500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1% Triton X-100, 10% glycerol, protease inhibitor mix [PI mix]) に溶解し、細胞溶解液中の組換えタンパク質は抗 Flag M2 アフィニティーゲルまたは Ni-NTA アガロース (QIAGEN) を用いて精製した。TFIIA α β はタグを付加されていないが、TFIIA α β ペプチドの中央部付近に存在するオリゴヒスチジン部位が Ni-NTA ビーズに認識されて結合する。組換えタンパク質の結合したビーズは溶解バッファーで3回洗浄し、M2 アガロースビーズまたは Ni-NTA ビーズに結合した組換えタンパク質は、FLAG ペプチドまたはイミダゾールで溶出した。精製したタンパク質の濃度は CBB 染色によって決定した。

TFIIA α と TFIIA β サブユニットの調製のため、1 μ g の精製 TFIIA α β 前駆体を M2 アガロースビーズに結合させた精製 FH-Taspase1 とプロセッシングバッファー (20 mM HEPES-KOH [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 10% glycerol) 中で 37°C で 1 時間反応させた。遠心によって M2 アガロースビーズに結合している FH-Taspase1 を除去し、プロセス型の TFIIA α サブユニットと TFIIA β サブユニットを得た。TFIIA が Taspase1 によってプロセッシングされていることは、SDS-PAGE と銀染色法によって確認した。

ゲルシフトアッセイ (EMSA)

EMSA は精製タンパク質を用いて行った。プローブはヒト GAPDH プロモーターから作製した。GAPDH プロモーターの TATA box 配列をもつ 2 本鎖 DNA を (sense: CGGTTTCTATAAATTGAGCC) を、T4 PNK (TaKaRa)、 γ -³²P-ATP と 37°C で 1 時間反応させ、DNA を放射標識した。反応物は Sephadex G-25 (GE Healthcare Bioscience) を用いたゲルろ過で分画精製し、EMSA には 80,000 cpm の標識 DNA を使用した。EMSA 反応バッファー (20 mM HEPES-KOH [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 10% glycerol) 中で 50 ng の TBP を 40 ng の TFIIA γ 、40 ng の TFIIA α β を混ぜ、37°C で 30 分間反応させることで、TFIIA-TBP 複合体を形成させた。その後、反応液に標識した 2 本鎖 DNA を加えて

37°Cで30分間反応させることで、タンパク質-DNA複合体を形成させた。タンパク質-DNA複合体を4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィで検出した。コンペティションアッセイでは、未標識の2本鎖DNAを反応液に加えた。EMSAで検出されたタンパク質の解析のためには、EMSA反応に精製タンパク質と共に0.5 μ gの抗体を加えた。

細胞増殖速度解析

野生型もしくはp53欠損型のHCT116細胞(8 \times 10⁴個)を6穴プレートにまき、各時間で細胞数を測定した。測定は3つ組で行ったうえ、その平均値を計算した。

クロマチン結合画分の調製

クロマチン結合画分の調製は、Xieらの方法を用いた[27]。細胞をNETN100バッファー(100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5])で溶解し、上清をクロマチン非結合画分とした。クロマチンペレットをNETN100バッファーで2度洗浄し、その後ペレットをNETN420バッファー(420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5])に溶解し、その上清をクロマチン結合画分として回収した。

統計処理

本研究のデータは3回以上の独立した実験から得られたデータの平均値に標準偏差を示した。定量的データの有意差は、R(ver.3.0.3)を用いてBonferroniの方法で算出した。本研究ではp<0.05を有意水準とした。それぞれの図における有意差は、以下の通りにアスタリスクで示した。*; p<0.05、**; p<0.01、***; p<0.001

結果

TLPノックダウンによる遺伝子発現の変動

TLPはNF1、TAp63を含む一部のTATA-lessプロモーターに結合し、それらの遺伝子発現を活性化する一方で、TATA boxプロモーターには結合せずプロモーター活性化能も示さない[28-30]。試験管内での解析結果から、TLPはTATA boxプロモーターを抑制する働きがあることも報告されているが、細胞内でTLPがどのような転写制御を行っているのか、その全体像は未だ完全には明らかにはされていない。細胞内におけるTLPの転写制御能を検討するために、まずTLPのノックダウン実験を行

い、細胞内の遺伝子の発現レベルを解析した (図 1)。定量 PCR で複数の遺伝子の発現量を測定したところ、TLP をノックダウンした細胞において遺伝子発現レベルの変動が見られた。定量 PCR によって解析した遺伝子のうち、TLP ノックダウンによって遺伝子発現が上昇した遺伝子には、 β -actin、GAPDH、c-Myc、 α -tubulin そして BRCA1 などが見つかった。さらに、TLP ノックダウンによって発現が低下した遺伝子には、GADD45 や p21 遺伝子が見つかった。一方で、遺伝子発現レベルが変動しなかった遺伝子も多数見つかったが、それらは INK4a、LMNA、TBP、TFIIA-S、14-3-3 σ であった。TLP ノックダウン細胞におけるこれらの遺伝子発現解析の結果から、TLP が幅広い遺伝子の発現調節に関与していることが示唆された。

TLP はプロモーターの種類に特異的な転写を行う性質が報告されていることから、これらの遺伝子のプロモーターを調べたところ、TLP ノックダウンによって発現が上昇した遺伝子 (β -actin、GAPDH、c-Myc、 α -tubulin、BRCA1) は TATA box プロモーターに駆動される遺伝子 (TATA box 遺伝子) であることがわかった。また、発現が低下した GADD45 と p21 遺伝子は、ともに TATA-less プロモーターを有していることも明らかになった (TATA-less 遺伝子)。p21 遺伝子は上流と下流の 2 つのプロモーターをもち、上流側プロモーターは主に転写因子 p53 に制御される TATA-less プロモーターである [31]。TLP をノックダウンした細胞では、p53 が標的とする複数の遺伝子の発現レベルが低下していた。GADD45 と p21 遺伝子はともに p53 の標的遺伝子である。以上の結果から、p53 による遺伝子発現調節に TLP が関係していることが示唆された。

TLP による p21 遺伝子の転写活性化

TLP による p53 を介したプロモーター制御機構を明らかにするため、ヒト p21 遺伝子の上流 TATA-less プロモーターをモデルとした解析を行った。前述のように、ヒト p21 遺伝子は上流・下流のそれぞれ 2 つのプロモーターをもち、下流プロモーターには TATA box 配列が存在するが、上流プロモーターは TATA-less プロモーターである (図 2A)。上流 TATA-less プロモーターからは、p21 遺伝子の転写産物バリエーションの 1 つである p21 alt-a が転写される。この転写産物は、下流プロモーターから転写される p21 variant-1 と同一のタンパク質をコードしていることが知られている [31]。まず、TLP をノックダウンした細胞における mRNA レベルを調べたところ、TLP ノックダウンによって p21 alt-a の発現量が低下するとともに、p21 遺伝子の他の転写産物量も低下していることがわかった (図 2B)。また、TLP を過剰発現させると p21 alt-a の発現量が増加した (図 2)。これに対して、p53 を欠損した細胞で

は、TLP の過剰発現とノックダウンによる p21 alt-a の発現量の変動は微弱であった (図 2C、未発表の観察)。以上の結果から、TLP は p53 依存的に p21 上流プロモーターを活性化することが示唆された。

TLP と TFIIA による協調的な p21 上流プロモーターの活性化

次に、TLP の TFIIA 結合性が p21 遺伝子の転写に与える影響を検討した。解析には、複数の TLP 変異体 (R55E、R52E、N37E) を用いた。R55E は正常な TFIIA 結合性をもつが、R52E と N37E は TFIIA との結合性を欠失した変異体である。これらの TLP 変異体を細胞に過剰発現させたところ、p21 alt-a の発現は R55E 過剰発現では野生型 TLP の場合と同程度の上昇を示したものの、R52E と N37E では p21 alt-a の上昇はほとんど見られなかった (図 3A)。以上の結果から、TFIIA との結合性が TLP の転写活性化能に必要であることが示唆された。p21 上流プロモーターの活性化における TFIIA の関与を明らかにするために、TFIIA ノックダウンした細胞での p21 alt-a の発現量の変化を測定した (図 3B)。その結果、TFIIA のノックダウンによって p21 の mRNA 量が減少するという現象が見いだされた。

TLP-TFIIA が p21 遺伝子上流プロモーターに与える影響を解析するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。まず、TLP 変異体の p21 上流プロモーター活性化能を測定した。野生型 TLP と R55E は p21 遺伝子上流プロモーターの活性を 3 倍以上上昇させたが、R52E、N37E はほとんどプロモーター活性化能を示さなかった (図 4A)。この結果は、TLP 変異体による内在性 p21 alt-a 活性化の解析結果 (図 3A) と一致する。p21 上流プロモーターは TFIIA の過剰発現によっても活性化され、TLP と TFIIA の共過剰発現は TFIIA の量依存的にプロモーターを活性化した (図 4B、4C)。さらに、TFIIA のノックダウンは p21 上流プロモーターの活性を低下させた (図 4D)。TLP が p53 依存的に p21 上流プロモーターを活性化したことから、次に、p53 欠損細胞において TFIIA が p21 上流プロモーターを活性化するかどうかを検討した。p53 欠損細胞においてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TFIIA は p53 欠損条件下では TFIIA は p21 上流プロモーターを活性化できなかった (図 5A)。p53 応答配列を欠失させたプロモーターを用いた解析においても同様の結果が得られた (図 5B)。以上の結果から、TFIIA が TLP と協調して p53 依存的に p21 上流プロモーターを活性化していることが示された。

TLP 依存的な TFIIA のプロモーター結合

TFIIA が p21 上流プロモーターに作用しているという結果から、TFIIA がこの上

流プロモーターに結合しているかどうかを ChIP アッセイで調べた。本解析では、p21 遺伝子の 3 つの領域（下流 TATA box プロモーター領域、上流 TATA-less プロモーター領域、非プロモーター領域）を用いた（図 6A）。その結果、TFIIA は下流プロモーターの TATA box 領域に強く結合していることに加えて、上流 TATA-less プロモーターにも結合していることが明らかにされた（図 6B）。上流プロモーターへの TLP の結合の有無を検討したところ、TLP も同じプロモーターに結合していた（図 6C）。一方、この上流プロモーターには TFIIA 結合性を欠失した TLP 変異体はほとんど結合能を示さず、TLP の p21 上流プロモーターへの結合には TFIIA との親和性が必要であることが示唆される（図 6C）。また、TLP を過剰発現した細胞では、TFIIA のプロモーター結合量が p21 上流プロモーター特異的に増加していることが示され（図 6D）、TLP が TFIIA を p21 上流プロモーターへリクルートする能力があることが示唆された。以上の結果より、TFIIA と TLP は相互依存的に p21 上流プロモーターに結合し、p53 依存的に p21 遺伝子の発現を活性化していることが示された。

TLP による TATA box プロモーター活性の抑制

TLP をノックダウンした細胞で多くの TATA box 遺伝子の発現が上昇したことから（図 1）、次に TLP が TATA box プロモーターを調節する機構の解析を行った。図 1 に示したように、TLP をノックダウンした細胞では TATA box 遺伝子である GAPDH と c-Myc の発現量は増加したが、ノックダウンと同時に TLP を導入させて細胞内 TLP タンパク質量を回復させると、これらの遺伝子発現が抑制され、通常時の発現レベルに近づいた（図 7A）。この結果から、TLP は細胞内で TATA box 遺伝子の抑制に働いていることが示された。TLP による TATA box 遺伝子の抑制と TFIIA との関係性を明確にするために、GAPDH と c-Myc を含む複数の TATA box 遺伝子のプロモーター領域への TFIIA 結合量を ChIP 法によって解析した。その結果、TLP をノックダウンした細胞での、TFIIA の TATA box プロモーターへの結合量の増加が見られた（図 7B）。以上の結果から、TLP は TFIIA が TATA box プロモーターへ結合することを阻止していることが示唆されるとともに、TLP が TFIIA の不活性化を介してプロモーター活性を抑制している可能性が考えられた。

TLP による TFIIA を介したプロモーター抑制が TATA box 配列に依存しているかどうかを検討するため、p21 遺伝子と GAPDH 遺伝子の TATA box プロモーターおよびそれらの変異型プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、TLP のプロモーターへの影響を見た。TLP ノックダウン条件下では、TATA box 配列をもつ p21 遺伝子プロモーターは有意に活性化されたが、TATA box 配列を欠失させた短い

プロモーターでは TLP ノックダウンによるプロモーター活性の上昇は起こらなかった (図 8A)。また同様に、GAPDH の TATA box プロモーターの活性も TLP ノックダウンにより上昇した一方で、TATA box 配列を変異させたプロモーターでは TLP ノックダウンによる上昇は確認できなくなり (図 8B)、TLP による TATA 遺伝子のプロモーター抑制には TATA box 配列が必須であることが示された。TLP ノックダウンによってプロモーターが活性化される結果に一致して、野生型 TLP は GAPDH TATA プロモーターを抑制したが(図 8C)、TFIIA 結合性を欠失した TLP 変異体(R52E、N37E) では TATA box プロモーターの抑制は起こらなかった。また、TFIIA は TATA プロモーターを活性化する働きがあるが(図 8D-a)、野生型 TLP は TFIIA による TATA box プロモーターの活性化を阻害した (図 8D-b)。これに対して、N37E 変異体は TFIIA によるプロモーター活性化に影響を与えなかった (図 8D-c)。以上の結果から、TLP は TFIIA を介して TATA box 配列依存的に遺伝子プロモーターの活性を抑制していることが明らかとなった。

TLP による TFIIA プロセシングの阻害

続いて、TFIIA の TATA box プロモーターへの結合が TLP によって阻害される機構を検討した。TFIIA $\alpha\beta$ は Taspase1 によるプロセシングを受けて α/β サブユニットになることが報告されており、このプロセシング過程は細胞内 TFIIA 活性を調節するための標的となり得る [12]。TLP はプロセス後の α/β サブユニットのみならず、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体にも結合することがわかっているため [17]、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセシングと TLP の関係性について検討した。まず始めに、TLP の過剰発現およびノックダウンによる TFIIA タンパク質の状態への影響について解析した。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体は細胞内で積極的に Taspase1 によるプロセシングを受けるため不安定であり、その半減期は短いことが報告されている [32]。実際に、HeLa 細胞内における TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の半減期は 30 分以下であった (図 9A)。しかしながら、TLP を過剰発現した細胞では TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のタンパク質量が著しく増加し (図 9A、レーン 5-8)、TFIIA との結合性のない N37E 変異体では野生型 TLP に見られたような TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の安定化作用は見られなかった (図 9A、レーン 13-16)。また、TLP ノックダウンによって TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の安定性は低下することがわかり (図 9B)、これらの結果は TLP が TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセシングを阻害し、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体を安定化しているためと考えられた。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の安定化は N37E 変異体の過剰発現では起こらなかったことから、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の安定化には TLP の TFIIA への結合性が必須であると考えられた。

TLP が TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシングを阻害しているかどうかを明らかにするため、外因性の過剰発現 FH-TFIIA を用いた実験を行った。FH-TFIIA を細胞に発現させて、新規に合成される FH-TFIIA タンパク質に対する TLP のプロセッシング阻害効果を解析した。外因性 FH-TFIIA は内在性 TFIIA と同様にプロセッシングを受けて、 α/β サブユニットが生成された(図 9C、レーン 2)。次に、FH-TFIIA とともに FH-TLP を細胞に共発現させ、FH-TFIIA のプロセッシング効率が変化するかどうかを調べたが、期待通り、TLP は外因性 TFIIA のプロセッシングを阻害してその前駆体の蓄積を起こすと同時にサブユニットの生成量を減少させた(図 9C、レーン 3)。その一方で、N37E は FH-TFIIA のプロセッシング効率に影響を与えなかった(図 9C、レーン 4)。同様の解析を、Taspase1 によるプロセッシングを受けない TFIIA 変異体 (DGAA) を用いて行ったところ、TLP は DGAA 変異体には顕著な安定化効果を示さなかった(図 9D、レーン 4、5)。TFIIA 前駆体レベルの変動が TLP による TFIIA $\alpha\beta$ 遺伝子の転写レベルでの制御ではないことを示すために、RT-PCR によって TFIIA $\alpha\beta$ 遺伝子の mRNA 量を測定した。その結果、TFIIA の mRNA レベルは TLP の過剰発現やノックダウンによって変動せず、TLP は TFIIA $\alpha\beta$ の転写を制御して TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量に影響を与えているのではないことが示された(図 9E)。

TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の不安定性がユビキチン・プロテアソーム系による分解に由来するものではないことを示すために、細胞を 26S プロテアソームの阻害剤である MG132 処理して、TFIIA タンパク質量を測定し、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量は MG132 処理では増加しなかったことを確認した(図 10A)。さらに、Taspase1 を細胞内に過剰発現すると、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量が減少した(図 10B)。以上の結果から、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体はユビキチン・プロテアソーム分解系の標的ではなく、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の不安定性は Taspase1 によるプロセッシングに起因することが明らかとなった。ここで、TLP が TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体に結合して Taspase1 によるプロセッシングを阻害しているかどうかを明らかにするために、精製タンパク質を用いた *in vitro* での解析を行ったが、*in vitro* においても、精製 TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体は精製 Taspase1 によってプロセッシングを受けるという結果が得られた(図 10C)。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体に TLP を加えた後に Taspase1 によるプロセッシング処理を行ったところ、Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシング効率の低下が見られた(図 10D、レーン 1-6)。一方で、TFIIA 結合領域を欠失させた変異体 TLP は、Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシングには影響を与えなかった(図 10D、レーン 7-11)。以上の結果から、TLP は TFIIA に安定に結合する事で Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシングを阻害していることが考えられた。

プロセス型 TFIIA による TATA box プロモーターの活性化

TLP は TATA box プロモーターを抑制することに加えて、TFIIA のプロセッシングを阻害するという結果から、TLP による TATA box プロモーターの抑制は TFIIA プロセッシングの阻害によるものであると予想された。しかしながら、TFIIA のプロセッシングが TATA box プロモーターの活性化にどれだけの影響を与えるかはこれまで明確にされてこなかったため、TFIIA プロセッシングが TATA box プロモーター活性化に必要なかどうかの検討を行った。

TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体と TFIIA α/β サブユニットの TATA box 結合能を EMSA によって解析するために、まず始めに、精製 TFIIA を精製 Taspase1 と反応させ、TFIIA α/β サブユニットを生成するとともに、精製 DGAA は Taspase1 によるプロセッシングを受けないことを確認した (図 11A)。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体またはプロセス型 TFIIA α/β サブユニットを用いて EMSA を行った。精製 TBP は単独では安定した TATA box 結合能を示さなかったが (図 11B、レーン 2)、TFIIA の存在により安定したタンパク質-DNA 複合体が形成された (図 11B、レーン 3)。このとき、TFIIA のプロセッシングの有無によって 2 種類の異なる移動度を示すシフトバンドが観察された。TBP、TFIIA γ と TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体あるいは DGAA 変異体の組み合わせでは移動度の大きなタンパク質-DNA 複合体が形成されたのに対し (図 11B、レーン 3、5-6)、TBP、TFIIA γ とプロセス型 TFIIA α/β サブユニットを加えると移動度のやや小さなタンパク質-DNA 複合体が形成された (図 11B、レーン 4)。TFIIA $\alpha\beta$ (あるいは α/β) または TFIIA γ のどちらかを欠いた場合は、タンパク質-DNA 複合体は形成されなかった (図 11B-b)。非標識の野生型 TATA box DNA と変異型 TATA box DNA を用いたコンペティションアッセイの結果、野生型 TATA box をコンペティターとして使用した場合にのみシフトバンドの消失が起こったことから、これらの 2 種類のシフトバンドはともに TATA box 配列特異的に形成されたタンパク質-DNA 複合体であることが示された (図 11C)。また、特異抗体を用いた EMSA 実験では、これらの移動度の異なる 2 種類のタンパク質-DNA 複合体はともに TBP 抗体に反応したため、これらの複合体に TBP が含まれていることが示された (図 11D、レーン 2、5)。一方で、プロセス型 TFIIA α/β によって生じた移動度の小さなシフトバンドは TFIIA 抗体に反応したのに対し、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の添加によって生じた移動度の大きなシフトバンドは TFIIA 抗体に反応性を示さなかった (図 11D、レーン 3、6)。以上の EMSA の結果から、プロセス型 TFIIA α/β サブユニットは TBP と TFIIA γ を介して TATA box プロモーターに結合できるが、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体は TATA box プロモーターに結

合することができないことが示唆された。

細胞内においても同様の相互作用が得られるかどうかを明らかにするため、野生型 TFIIA および DGAA 変異体の TATA box プロモーターへの結合を ChIP によって評価した。その結果、野生型 TFIIA は GAPDH 遺伝子の TATA box プロモーターへの結合が認められたが、DGAA 変異体では TATA box プロモーターへの結合は認められなかった (図 12A)。この結果から、TFIIA はプロセシングを受けることによって TATA box プロモーターへ結合できるようになることが示された。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体とプロセス型 TFIIA α/β の細胞内での機能の違いを示すために、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体とプロセス型 TFIIA α/β の TFIIA γ への親和性を検討した。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体とプロセス型 TFIIA α/β はともに TLP に対しては同程度の結合性を示したが、TFIIA γ に対してはプロセス型 TFIIA α/β の方が TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体 (DGAA) よりも強い結合性を示した (図 12B)。TFIIA γ は、TFIIA α/β が TBP とともに安定なタンパク質-DNA 複合体を形成するために必須な因子であることから、TFIIA α/β と TFIIA γ との結合性は TATA box プロモーターの活性化にとって必要であると考えられる。事実、プロセシングの有無による TATA box プロモーター活性化能を見たところ、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体 (DGAA) は TATA box プロモーター活性化能をほとんど示さなかったのに対して、プロセス型 TFIIA α/β は TATA box プロモーターを活性化した (図 12C)。以上の結果から、TFIIA $\alpha\beta$ のプロセシング過程は、TFIIA $\alpha\beta$ が TBP および TFIIA γ と協調して TATA box プロモーターへ結合して TATA box プロモーターを活性化するために必要であることが明らかにされた。以上の結果から、TLP による TFIIA $\alpha\beta$ プロセシングの阻害は、TATA box プロモーターの抑制の原因となることが示唆された。

TLP ノックダウンによるクロマチン結合 TBP 量の増加

TBP は TATA box プロモーターの活性化に必須であり、TFIIA は TBP-DNA 結合を安定化することで TBP 機能を支える [8]。TLP は TFIIA 機能を抑制することが示されたため、TLP が細胞内の TBP-DNA 結合にも影響を与えている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、まず細胞分画法によって細胞内のクロマチン結合 TBP 量を測定した。予想した通り、TLP をノックダウンすると、クロマチンに結合している TBP の量が顕著に増加した (図 13A)。ChIP によって複数の TATA box プロモーターにおける TBP 結合量を解析した結果、TLP ノックダウン細胞では TATA box 領域への TBP の結合量が増加しているという結果が得られた (図 13B)。これらの TLP ノックダウン条件における TBP の TATA box 領域への結合量の増加は TATA

box 遺伝子の発現レベルと相関しており、以上の結果から、TLP が TFIIA 機能を阻害することで TBP の拮抗因子として働いていることが示唆された。

TLP による細胞増殖抑制

TLP ノックダウン細胞における遺伝子発現解析の結果から、細胞内で TLP は多くの遺伝子発現に影響を与えていることが明らかとなった (図 1)。TLP による遺伝子発現の変化が細胞機能にどのように影響するかを検討したが、TLP の有無によって細胞増殖速度が変化していることがわかった (図 14)。TLP のノックダウンは細胞増殖を促進させた (図 14A-a)。また、TLP をノックダウンした細胞では、細胞傷害剤エトポシドによって誘導される細胞死に抵抗性を示した (図 14B)。TLP ノックダウンによる細胞増殖および細胞死への影響は、TLP のノックダウンによって p21 遺伝子や GADD45 遺伝子の発現が低下することに起因する部分が大いと思われる。しかしながら、その効果は p53 欠損細胞ではやや微弱になったものの、p53 欠損条件下においても TLP のノックダウンは細胞増殖を促進するという結果が得られた (図 14A-b)。これらの結果は、TLP が p53 依存的な経路と p53 非依存的な経路の 2 つの経路によって遺伝子発現を調節し、それによって細胞増殖が抑制されていることを示唆している。

TLP の過剰発現によって細胞増殖速度は低下するが、TFIIA 結合性の欠失した R52E、N37E 変異体では野生型 TLP と比較して細胞増殖抑制能が低下していた (図 14C)。さらに、TFIIA のノックダウンは細胞増殖を促進し、さらにエトポシドで誘導した細胞死が抑制されるという結果が得られた (図 14D)。これらの結果は、TFIIA が TLP と協調して遺伝子発現を調節することで細胞増殖に影響を与えていることを示唆している。

考察

TLP によるグローバルな遺伝子発現制御

TBP ファミリータンパク質の 1 つとして、TLP はこれまで転写調節機能が解析されてきた [20, 21]。ショウジョウバエでは TLP は TCT モチーフをもったプロモーターや DPE プロモーター、ヒストン遺伝子プロモーターなどの TATA-less プロモーターを、そしてマウスでは精子形成関連遺伝子の TATA-less プロモーターを標的として活性化することが報告されている [13, 21-23]。本研究では、ヒト細胞において TLP が p53 依存的な機構で TATA-less プロモーターを活性化していることに加えて、TLP

が TATA box プロモーターを抑制する事実とその機構を示した (図 15)。ヒトの全遺伝子の約 20%が TATA box 配列をもつという事実から、ヒト細胞において TLP がゲノムワイドに遺伝子発現を調節していることが予想される。実際に、予備実験として行った次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析の結果から、TLP のノックダウンによってヒト細胞内の 30%近くの遺伝子発現が変動することがわかった。このようなゲノムワイドな遺伝子発現変動には、TLP-TFIIA 相互作用による直接あるいは間接的な遺伝子発現制御が関与していると推測される。すなわち、TLP は細胞内の遺伝子発現を調節するグローバル転写制御因子であり、その制御機能を発揮するには TFIIA が必要であると思われる。これまでマウスの精巣における TLP 機能解析やショウジョウバエでの TLP によるプロモーター制御機構の解析は進んでいたが、ヒト細胞における TLP 機能の解析はほとんど行われてこなかったため、本研究成果はヒトにおける TLP の機能解明のための重要な知見を与えることが期待される。一方で、ショウジョウバエで報告されているような TLP のプロモーター調節機構がヒト細胞においてどれだけ保存されているかはわかっておらず、今後の更なる解析が必要となるだろう。

TLP-TFIIA の p53 依存的な転写活性化機能

TLP が他の転写調節因子依存的に遺伝子制御領域に結合する例は、ショウジョウバエの PCNA 遺伝子においてすでに報告されている [33]。この報告では、ショウジョウバエ TLP は転写調節因子 DREF を介して PCNA 遺伝子上に結合して転写を調節することが示されている。本研究においては、TLP は p21 上流 TATA-less プロモーターの p53 依存的な活性化に必要なことが明らかにされた (図 2C、図 5B)。p21 TATA-less プロモーターの活性化には TFIIA も必要であり (図 3)、TFIIA による p21 TATA-less プロモーターの活性化もまた p53 依存的である (図 5)。これらの事実に加え、TLP と TFIIA が細胞内で非常に安定に結合することから、TLP は TFIIA と p53 の転写活性化複合体成分、すなわち p53 の binary cofactor として機能しているとも考えられた。TLP がプロモーター上に結合しているという報告は複数なされているが、TLP のプロモーター結合のためのコンセンサス DNA 配列は特定されていない。おそらくその理由の 1 つは、TLP が他の DNA 結合性タンパク質を介して遺伝子制御領域にリクルートされるためであろう。TLP は p53 や DREF のような DNA 結合因子を介してプロモーター上にリクルートされ、その結果として TFIIA の TLP 標的プロモーターへの結合が誘導され、協調的に標的遺伝子の転写を活性化するものと考えられる。TLP-TFIIA 複合体によって制御される新たな標的プロモーターを発見できたこと

に加えて、p53 という強力ながん抑制性の転写因子が TLP-TFIIA 複合体の相互作用因子となることを明らかにした点において本研究は極めて重要な意義をもつと思われる。p53 は p21 や GADD45 などの細胞増殖制御や細胞死制御に関わる多くの遺伝子を支配する代表的ながん抑制因子であるが[34-36]、TLP-TFIIA 複合体が p53 を介した転写制御を行っている場合、TLP-TFIIA 複合体もまた p53 標的遺伝子の転写制御に関与し、がん抑制作用を示すことは想像に難くない。事実、TLP と TFIIA が p53 依存的に細胞増殖停止および細胞死を誘導している結果が得られており (図14)、TLP と TFIIA の相互作用ががん抑制作用をもつことが期待される。ただし、p21 TATA-less プロモーターをモデルとした本解析で明らかになった TLP-TFIIA 複合体による転写活性化機構がどれだけの p53 標的プロモーター上で見られるのかはわかっておらず、この問題を解決するためにはより網羅的な解析を行う必要がある。

TLP は TFIIA プロセシングの阻害因子として機能する

アミノ酸配列特異的なタンパク質の切断は、細胞死、細胞恒常性維持、そして細胞周期進行など、細胞機能を制御する多くの細胞過程に関わっている [37-39]。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体は Taspase1 による配列特異的な切断を受けることがすでに報告されており、このプロセシングによって TFIIA α と TFIIA β の成熟型サブユニットが生じる [12]。TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体の Taspase1 によるプロセシングは、マウスにおける精子形成と頭部形態形成に必須であるとされているが [13, 40]、Taspase1 による TFIIA 前駆体のプロセシングを調節する因子については未だ報告がなされておらず、プロセシングの進行を調節する機構は不明であった。私は本研究を通して、TLP が Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体プロセシングの阻害因子として作用することを見出し、TLP の TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体への直接の結合が TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体プロセシングの阻害に必要であることを明らかにした (図9,10)。TBP もまた TFIIA に結合するが、TBP は TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセシングを阻害しなかった。当研究室のこれまでの研究結果から、TLP は TBP よりも TFIIA に対してはるかに強い親和性 (TLP: K_D (M)= 1.52×10^{-9} 、TBP: K_D (M)= 1.04×10^{-8}) をもつことがわかっている [17]。TBP は TLP よりも TFIIA に結合しやすいが、TLP より解離しやすい。これに対して TLP は、TFIIA に結合すると非常に安定に結合状態を維持する性質をもつ [17]。すなわち、TLP 特有の TFIIA との強力で安定な結合が、Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセシング阻害に必要であると予想される。これらの事実は、TLP は単なる TBP の類似因子ではなく、TBP とは全く異なるユニークな機能をもっていることを意味している。

TFIIA $\alpha\beta$ のプロセッシングによる TFIIA の転写活性化機能の獲得

TFIIA の転写活性化機能が詳細に解析されてきた酵母では、実は TFIIA がプロセッシングを受けないため [12]、TFIIA プロセッシングの意義は完全には明らかにされていなかった。ヒト TFIIA のプロセッシングの機能的意義を明確にするため、私はプロセス型 TFIIA と TFIIA 前駆体のメカニスティックな役割について検討したが、その結果、両者は機能的に異なる性質を有することが示された。第一に、プロセス型 TFIIA サブユニットは TBP と TFIIA γ を介して TATA box DNA に結合できるが、TFIIA 前駆体は TATA box への結合性を示さないこと (図 11、12)、第二に、プロセス型 TFIIA サブユニットのみが TATA box プロモーター特異的な転写活性化能を示すという事実である (図 12)。これまでの TFIIA 機能解析研究から、TFIIA γ は TFIIA 機能に必須であると考えられてきたが [8]、今回の解析においても、プロセス型 TFIIA サブユニットの DNA 結合および TATA box プロモーターの活性化には TFIIA γ が必要であることが確認された。これらの事実から、TFIIA 前駆体の転写活性化能の欠失は TFIIA γ との親和性の低下に起因する可能性が考えられる。プロセス型 TFIIA は TFIIA γ とホロ TFIIA を形成し、TBP 依存的に TATA box に結合して転写活性化に機能するため (図 11、12)、ホロ TFIIA は TBP のコアクチベーターとして働くと考えられる。以上の事柄から、ヒト細胞において TFIIA は Taspase1 によるプロセッシングを受けることによって TATA box 活性化機能を獲得するというメカニズムが考えられた。TLP は TFIIA プロセッシングを阻害するという結果 (図 9、10) に加えて、TLP が TATA box プロモーターを抑制するという結果 (図 7、8) から、私は本研究において、TLP が TFIIA のプロセッシングを阻害することで TFIIA の転写活性化機能の獲得を阻止し、TATA box プロモーターの活性を抑制するというモデルを提唱した (図 15)。

TLP による TFIIA 前駆体のプロセッシング制御の意義

前述の通り、TATA box プロモーターの活性化にはプロセッシングされて成熟した TFIIA が必要であり、TLP はこの過程を阻害することで TATA box の活性を抑制していると考えられる。TFIIA 前駆体もまた、一部の遺伝子発現制御に関与しているようである。マウス精子形成においては、プロセス型 TFIIA が TLP の標的とする TATA-less プロモーター活性化に必要であることが報告されており、また一方で、マウスの頭部形態形成の過程では TFIIA 前駆体が必要とされるとの報告がある [13, 40]。さらに、p21 遺伝子の上流 TATA-less プロモーターは TFIIA 前駆体によって活

性化されている可能性がある（未発表の観察）。加えて、クロマチン結合画分の解析から、TFIIA 前駆体の一部はクロマチンに結合していることが示唆されている（未発表の観察）。これらの事実から、前駆体および成熟型のそれぞれの状態の TFIIA はプロモーター特異性または発生時期特異性をもって遺伝子発現調節に関わっていることが予想される。そして、TLP は TFIIA のプロセシングレベルを調節することで、TATA box プロモーターおよび TATA-less プロモーターの活性をダイナミックに変化させる転写スイッチとしての役割を果たしている可能性がある。しかしながら、TFIIA 前駆体が実際にどのような機能をもっているのか、TLP の発現量が顕著に変化して転写のスイッチが切り替わるような細胞内イベントは存在するのか、また、このような機構は発生においてどれだけ重要な役割を果たすのかなど、今後解決されるべき課題はまだ多く残されていると思われる。

謝辞

研究を行うにあたり、ご鞭撻、ご指導いただいた田村隆明教授をはじめ、本研究に関する議論を深めていただいた浦聖恵教授、およびさまざまな形で本研究を支援してくださった千葉大学理学研究科、田村研究室の皆様や諸先輩の方々に深く感謝いたします。

参考文献

1. Yang,C., Bolotin,E., Jiang,T., Sladek,F.M. and Martinez,E. (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, **389**, 52-65.
2. Thomas,M.C. and Chiang,C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 105-178.
3. Greenblatt,J. (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **66**, 1067-1070.
4. Pugh,B.F. and Tjian,R. (1992) Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J. Biol. Chem.*, **267**, 679-682.
5. Pugh,B.F. (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, **255**, 1-14.

6. Jacobson,R.H. and Tjian,R. (1996) Transcription factor IIA: a structure with multiple functions. *Science*, **272**, 827-828.
7. Weideman,C.A., Netter,R.C., Benjamin,L.R., McAllister,J.J., Schriedekamp,L.A., Coleman,R.A. and Pugh,B.F. (1997) Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J. Mol. Biol.*, **271**, 61–75.
8. Høiby,T., Zhou,H., Mitsiou,D.J. and Stunnenberg,H.G. (2007) A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 429-436.
9. Yokomori,K., Zeidler,M.P., Chen,J.L., Verrijzer,C.P., Mlodzik,M. and Tjian, R. (1994) Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev.*, **8**, 2313–2323.
10. Sun,X., Ma,D., Sheldon,M., Yeung,K. and Reinberg,D. (1994) Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes Dev.*, **8**, 2336–2348.
11. Shykind,B.M., Kim,J. and Sharp,P.A. (1995) Activation of the TFIID-TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev.*, **9**, 1354-1365.
12. Zhou,H., Spicuglia,S., Hsieh,J.J., Mitsiou,D.J., Høiby,T., Veenstra,G.J., Korsmeyer,S.J. and Stunnenberg,H.G. (2006) Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2728-2735.
13. Oyama,T., Sasagawa,S., Takeda,S., Hess,R.A., Lieberman,P.M., Cheng,E.H. and Hsieh,J.J. (2013) Cleavage of TFIIA by Taspase1 activates TRF2-specified mammalian male germ cell programs. *Dev. Cell*, **27**, 188-200.
14. Mitsiou,D.J. and Stunnenberg,H.G. (2000) TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIGamma subunit. *Mol. Cell*, **6**, 527-537.
15. Mitsiou,D.J. and Stunnenberg,H.G. (2003) p300 is involved in formation of the TBP-TFIIA-containing basal transcription complex, TAC. *EMBO J.*, **22**, 4501-4511.
16. Teichmann,M., Wang,Z., Martinez,E., Tjernberg,A., Zhang,D., Vollmer,F., Chait,B.T. and Roeder,R.G. (1999) Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13720-13725.
17. Nakadai,T., Shimada,M., Shima,D., Handa,H. and Tamura,T. (2004) Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J. Biol. Chem.*, **279**, 7447-7455.

18. Ohbayashi,T., Makino,Y. and Tamura,T. (1999) Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the drosophila TBP-related factor. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 750-755.
19. Berk,A.J. (2000) TBP-like factors come into focus. *Cell*, **103**, 5-8.
20. Reina,J.H. and Hernandez,N. (2007) On a roll for new TRF targets. *Genes Dev.*, **21**, 2855-2860.
21. Zehavi,Y., Kedmi,A., Ideses,D. and Juven-Gershon,T. (2015) TRF2: TRansForming the view of general transcription factors. *Transcription*, **0**.
22. Wang,Y.L., Duttke,S.H., Chen,K., Johnston,J., Kassavetis,G.A., Zeitlinger,J. and Kadonaga,J.T. (2014) TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev.*, **28**, 1550-1555.
23. Kedmi,A., Zehavi,Y., Glick,Y., Orenstein,Y., Ideses,D., Wachtel,C., Doniger,T., Waldman,Ben-Asher,H., Muster,N., Thompson,J., Anderson,S., Avrahami,D., Yates,J.R., Shamir,R., Gerber,D. and Juven-Gershon,T. (2014) Drosophila TRF2 is a preferential core promoter regulator. *Genes Dev.*, **28**, 2163-2174.
24. Suzuki,H., Suzuki,A., Maekawa,Y., Shiraishi,S. and Tamura,T. (2012) Interplay between two myogenesis-related proteins: TBP-interacting protein 120B and MyoD. *Gene*, **504**, 213-219.
25. Jogo,M., Shiraishi,S. and Tamura,T. (2009) Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett.*, **583**, 2715–2719.
26. Saramäki,A., Banwell,C.M., Campbell,M.J. and Carlberg,C. (2006) Regulation of the human p21^{waf1/cip1} gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 543–554.
27. Xia,B., Sheng,Q., Nakanishi,K., Ohashi,A., Wu,J., Christ,N., Liu,X., Jasin,M., Couch,F.J. and Livingston,D.M. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell*, **22**, 719-729.
28. Moore,P.A., Ozer,J., Salunek,M., Jan,G., Zerby,D., Campbell,S. and Lieberman,P.M. (1999) A human TATA binding protein-related protein with altered DNA binding specificity inhibits transcription from multiple promoters and activators. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7610-7620.
29. Chong,J.A., Moran,M.M., Teichmann,M., Kaczmarek,J.S., Roeder,R. and Clapham,D.E. (2005) TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of

- transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 2632-2643.
30. Suenaga, Y., Ozaki, T., Tanaka, Y., Bu, Y., Kamijo, T., Tokuhisa, T., Nakagawara, A. and Tamura, T. (2009) TATA-binding protein (TBP)-like protein is engaged in etoposide-induced apoptosis through transcriptional activation of human TAp63 Gene. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35433-35440.
 31. Radhakrishnan, S.K., Gierut, J. and Gartel, A.L. (2006) Multiple alternate p21 transcripts are regulated by p53 in human cells. *Oncogene*, **25**, 1812-1815.
 32. Høiby, T., Mitsiou, D.J., Zhou, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Stunnenberg, H.G. (2004) Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA. *EMBO J.*, **23**, 3083-3091.
 33. Hochheimer A, Zhou S, Zheng S, Holmes MC & Tjian R (2002) TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature*, **420**, 439-445.
 34. el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
 35. Vousden, K.H. (2002) Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 47-59.
 36. Vousden, K.H., and Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 594-604.
 37. Julien, E. and Herr, W. (2003) Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J.*, **22**, 2360–2369.
 38. Takeda, S., Chen, D.Y., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Sasagawa, S., Kan, J.T., Korsmeyer, S.J., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2006) Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev.*, **20**, 2397-2409.
 39. Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Herr, W. (2011) O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*, **144**, 376-388.
 40. Takeda, S., Sasagawa, S., Oyama, T., Searleman, A.C., Westergard, T.D., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2015) Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription. *J. Clin. Invest.*, **125**, 1203-1214.

図の説明

図 1. TLP ノックダウンによる遺伝子発現変化

ヒト細胞で TLP ノックダウンが遺伝子発現に与える影響。HeLa 細胞に TLP ノックダウン siRNA (siTLP)、またはコントロール siRNA (scr) を導入し、細胞内の mRNA 量を RT-PCR によって調べた。PCR によって得られたバンド (A) および、定量 PCR によって得られた発現量の相対値 (scr を 1.0 としたときの siTLP の相対値を) (B) を示した。TLP のノックダウン効率はウエスタンブロットによって求めた。

図 2. TLP による p21 遺伝子発現の活性化

A. ヒト p21 遺伝子プロモーターの概略図。上流プロモーターと下流プロモーターのそれぞれの転写開始点を矢印で示した。上流転写開始点からは p21 alt-a、下流転写開始点からは p21 variant-1 がそれぞれ転写される。点線は、ルシフェラーゼアッセイで使用するプロモーター領域を示している。B. TLP ノックダウンによる p21 遺伝子の発現変化。TLP をノックダウンした HeLa 細胞における p21 遺伝子のそれぞれの転写産物量 (alt-a、variant-1) を測定した。コントロール (scr) を 1.0 としたときの TLP ノックダウン時 (siTLP) の発現量の相対値を (b) に示す。C. TLP 過剰発現による p21 alt-a 転写活性の上昇。野生型 (p53^{+/+}) あるいは p53 欠損型 (p53^{-/-}) の HCT116 細胞に FH-TLP (mTLP) を過剰発現させ、p21 alt-a の mRNA レベルを RT-PCR で測定した。

図 3. TFIIA による p21 遺伝子発現の活性化

A. TLP 変異体の転写活性化能の比較。野生型 HCT116 細胞に野生型 TLP あるいは変異型 TLP (R55E、R52E、N37E) を過剰発現し、p21 遺伝子転写産物の量を RT-PCR によって解析した (a)。野生型 TLP と N37E を過剰発現したときの p21 alt-a の量を定量 PCR で測定した結果を (b) に示す。B. TFIIA ノックダウンによる p21 遺伝子発現量の変化。HeLa 細胞に TFIIA $\alpha\beta$ ノックダウン siRNA (siIIA) またはコントロール siRNA (scr) を導入し、細胞内の mRNA 量を RT-PCR によって測定した。PCR によって得られたバンドシグナル (a) および、定量 PCR によって得られた発現量の相対値 (scr を 1.0 としたときの siTFIIA $\alpha\beta$ の相対値) (b) を示した。

図 4. TLP と TFIIA による p21 上流 TATA-less プロモーターの活性化

A. 野生型 TLP および変異型 TLP による p21 上流 TATA-less プロモーターの調節。HCT116 細胞に、図示されたエフェクタープラスミドと p21up/GL4 レポータープラスミドをトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって野生型 TLP と変異型 TLP のプロモーター活性化能を検討した。B, C. A と同様に、p21up/GL4 レポーターに加えて、それぞれに示されたエフェクターを HCT116 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイでプロモーター活性を測定した。D. HCT116 細胞に TFIIA $\alpha\beta$ ノックダウン siRNA と図中に示されたレポータープラスミドをトランスフェクションし、ルシフ

エラーゼレポーターアッセイによりプロモーター活性を測定した (a)。up、down、core はそれぞれ、p21up/GL4、p21down/GL4、p21-5/GL4 のレポータープラスミドを示す。(b) siRNA による TFIIA $\alpha\beta$ ノックダウン効率をウエスタンブロットで検討した。

図 5. TFIIA による p53 依存的なプロモーター活性化

A. TFIIA のプロモーター活性化能を p53 欠損細胞で検討した。図 4 と同様の実験を p53 欠損型 HCT116 細胞を用いて行った。p53 欠損型 HCT116 細胞に、それぞれの示されたエフェクターとともに p21up/GL4 (Up) または p21down/GL4 (Down) をトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりプロモーター活性を測定した。B. p53 応答領域を欠失させたプロモーターレポーターを用いて、TLP および TFIIA のプロモーター活性化能を検討した。野生型 HCT116 細胞に、変異型 p21up/GL4 とともにそれぞれのエフェクターをトランスフェクションし、プロモーター活性を測定した。

図 6. p21 プロモーターへの TFIIA、TLP の結合

A. p21 遺伝子プロモーター領域の概略図。図中に示された 3 つの領域において ChIP 解析を行った。a; コントロール DNA 領域、b; p21 上流プロモーター領域 (p53 応答配列を含む)、c; p21 下流プロモーター領域 (TATA box 配列を含む) B. クロマチン結合 TFIIA の検出。HCT116 細胞において、A に示されたそれぞれの領域に内在性 TFIIA が結合しているかどうかを ChIP 法によって検討した。C. 野生型 TLP および変異型 TLP の p21 上流プロモーターへの結合。FH-TLP、FH-R55E、FH-R52E、FH-N37E の発現プラスミドまたはコントロールベクターをそれぞれ HCT116 細胞に導入し、24 時間のエトポシド処理 (50 μ M) 後、抗 FLAG M2 アガロースによる ChIP 解析を行った。PCR によって、p21 上流プロモーター領域をよびコントロール DNA 領域への TLP の結合量を評価した。PCR のバンドシグナルは左のパネルに示す。また、FH-TLP によって得られたバンドシグナルを 1.0 としたときのそれぞれのシグナル強度の相対値を右のパネルに示す。vec; タンパク質を発現しないコントロールベクターを示す。D. TLP 過剰発現によるプロモーター結合 TFIIA 量の変化。FH-TLP、FH-N37E を過剰発現させ、24 時間のエトポシド処理を行った HCT116 細胞を用いて、ChIP を行った。それぞれのプロモーター領域に結合している TFIIA 量を、PCR によって評価した。

図 7. 内在性 TATA box 遺伝子の TLP による負の調節

A. 過剰発現 TLP による内在性遺伝子の発現制御。HeLa 細胞に siRNA とともに TLP 発現プラスミドをトランスフェクションし、48 時間後に RT-PCR を行い、定量 PCR によって内在性遺伝子 (GAPDH、c-myc、TFIIA-S) の mRNA 量を測定した。TLP の mRNA レベルは PCR によって測定した。B. クロマチン結合 TFIIA 量の解析。HeLa 細胞で TLP をノックダウンし、TFIIA $\alpha\beta$ 抗体を用いた ChIP 法によって TFIIA のクロマチン結合を解析した。ChIP シグナルは定量 PCR によって定量した。IgG と IIA はそれぞれ IgG または TFIIA $\alpha\beta$ 抗体による免疫沈降物を示す。Myc-u と Myc-d は、c-Myc 遺伝子の上流プロモーターと下流プロモーターをそれぞれ示す。p21FUR は、p21 遺伝子転写開始点から -7018 から -6833 に位

置するコントロール DNA 領域を示す。

図 8. TLP 依存的な TATA プロモーターの抑制

A. p21 遺伝子の TATA box プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ。HeLa 細胞に図に示されたレポータープラスミドと siRNA をトランスフェクションし、プロモーター活性を測定した。(a) p21-168/GL4、p21-65/GL4、p21-5/GL4 に組み込まれた p21 遺伝子プロモーター領域の概略図。TATA box の位置は矢尻端で示している。内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼ活性に対する相対的ルシフェラーゼ活性値 (b) とその比率 (c) を示した。B. ヒト GAPDH TATA box プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ。A と同様にして、TLP ノックダウン細胞における GAPDH プロモーター活性を調べ、内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼ活性に対する相対値 (b) とその比率 (c) を示した。C. TLP および変異型 TLP (R55E、R52E、N37E) を GAPDH プロモーターをもつレポーターとともに HeLa 細胞にトランスフェクションしてルシフェラーゼアッセイを行い、相対的ルシフェラーゼ活性を測定した。D. TLP と TFIIA の共発現の TATA box プロモーター活性への影響。TFIIA を TLP (b) または N37E (c) とともに HCT116 細胞に共発現させ、p21-168/GL4 レポーターを用いて p21 TATA box プロモーターの活性を調べた。コントロールの空ベクターを細胞にトランスフェクションした場合のプロモーター活性を 1.0 として、ルシフェラーゼ活性の比率を示した。

図 9. TLP の TFIIA $\alpha\beta$ プロセッシング阻害作用

TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質をウエスタンブロットで検出した。A. 細胞内 TFIIA $\alpha\beta$ に対する過剰発現 TLP の影響。TLP または N37E を過剰発現させた HCT116 細胞をそれぞれの時間 CHX 処理し、処理後の TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質の量を調べた。B. TLP ノックダウンの TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質への影響。TLP をノックダウンした HeLa 細胞を A と同様に CHX 処理し、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量を調べた。C. TLP の TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシングへの影響。HeLa 細胞に FH-TLP または FH-N37E を FH-TFIIA $\alpha\beta$ とともに発現させ、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量および TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシングで生じた TFIIA α サブユニットの量を調べた。D. 非切断型 TFIIA 変異体 DGAA に対する TLP の影響。C と同様に、HeLa 細胞に FH-TLP と FH-TFIIA $\alpha\beta$ または FH-DGAA を発現させ、TFIIA 前駆体量を調べた。C および B において、細胞に発現させた FH-MyoD は泳動タンパク質量の内部標準として用いた。E. RT-PCR による TFIIA $\alpha\beta$ mRNA の検出。FH-TLP を発現させた HCT116 細胞において RT-PCR を行い、細胞内 TFIIA $\alpha\beta$ mRNA 量を測定した。

図 10. TLP による Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体プロセッシングの阻害

A. TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質の MG132 処理による影響。HCT116 細胞を MG132 と CHX でそれぞれの時間処理し、ウエスタンブロットによって TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質を検出した。B. 過剰発現した Taspase1 の TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体への作用。FH-Taspase1 を HCT116 細胞に過剰発現させ、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体量の変化を検出した。C. *in vitro* 条件での Taspase1 による

TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体のプロセッシング。5 ng の精製 TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質を 20 ng の精製 FH-Taspase1 と混ぜ、37°C で 1.5 時間反応させた。その後、ウエスタンブロットによって TFIIA タンパク質を検出した。D. *in vitro* での Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体プロセッシングへの TLP の影響。12 ng の精製 TFIIA $\alpha\beta$ と 6 ng の精製 His-TFIIA γ を、50 ng から 200 ng の量の間で精製 FH-TLP と混ぜて 37°C で 1 時間反応させた後、50 ng の精製 FH-Taspase1 を加えてさらに 1.5 時間反応させた。反応後の TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質をウエスタンブロットで検出した。

図 11. EMSA による TFIIA-TATA box DNA 複合体の解析

A. 精製 TFIIA $\alpha\beta$ および精製 DGAA の *in vitro* 条件でのプロセッシング。20 ng の精製 TFIIA $\alpha\beta$ と精製 DGAA を 70 ng の精製 FH-Taspase1 と混ぜて 37°C で 1 時間反応させた。プロセッシングの有無はウエスタンブロットで検出した。B-D. EMSA による TFIIA/TBP の GAPDH TATA box プロモーターへの結合解析。精製した TFIIA $\alpha\beta$ 、His-TFIIA γ 、そして FH-TBP を使用して EMSA を行った。B. 図中に示された組み合わせの精製タンパク質を EMSA 反応に用いた。Processing + ; Taspase1 によるプロセッシング処理を経て得られた TFIIA タンパク質 (α/β) を示す (B-b および C で使用される α/β と同一である)。C. 非標識 DNA を使用したコンペティションアッセイ。野生型 GAPDH TATA box プロモーター DNA あるいは変異型の非標識 DNA を EMSA 反応液に加えた。野生型および変異型のコンペティター DNA 配列はそれぞれ以下の通りである。野生型 ; 5'-CGGTTTCTATAAATTGAGCC、変異型 ; 5'-CGGTTTCCAGTAACTGAGCC。D. 特異抗体を使用した EMSA。TBP および TFIIA $\alpha\beta$ に対する特異抗体あるいはコントロール IgG を EMSA 反応液に加えて実験を行った。 $\alpha\beta$ および α/β はそれぞれ、TFIIA $\alpha\beta$ 前駆体とプロセス型 TFIIA α/β サブユニットを示す。

図 12. 成熟型 TFIIA の *in vivo* における働き

A. TFIIA $\alpha\beta$ のクロマチン結合。野生型 FH-TFIIA $\alpha\beta$ (WT) または FH-DGAA (DGAA) を HeLa 細胞に発現させた。(a) TFIIA $\alpha\beta$ タンパク質のプロセッシング状態をウエスタンブロットによって検討した。(b) ChIP によって FH-TFIIA $\alpha\beta$ と FH-DGAA のクロマチン結合を調べた。GAPDH TATA box プロモーター (GAPDH pro) における ChIP シグナルは定量 PCR で評価した。p21FUR はコントロールとして解析した。B. 成熟型 TFIIA $\alpha\beta$ のタンパク質間相互作用の解析。FH-TFIIA $\alpha\beta$ または FH-DGAA を HeLa 細胞に発現させ、FH 融合タンパク質を M2 アガロースビーズを用いて免疫沈降した。共免疫沈降した TLP と TFIIA γ をウエスタンブロットで検出した。C. 成熟型 TFIIA による TATA box プロモーターの活性化。FH-TFIIA $\alpha\beta$ または FH-DGAA の発現プラスミドを図中に示されたレポーターとともに細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイによってルシフェラーゼ活性を測定した。

図 13. TLP による TBP のクロマチン結合の負の調節

A. クロマチン非結合画分 (Ch-free) とクロマチン結合画分 (Ch-bound) における TBP の分布。TLP ノックダウン細胞からクロマチン非結合画分とクロマチン結合画分を調製し、TBP タンパク質をウエスタンブロットで検出した。Alpha-tubulin とヒストン H4 はそれぞれクロマチン非結合画分とクロマチン結合画分の内部標準タンパク質として検出した。B. TBP のプロモーター結合解析。TLP ノックダウン細胞において TBP 抗体を用いて ChIP を行い、図中に示された DNA 領域における TBP 結合を解析した。IgG と TBP はそれぞれ IgG または TFIIA $\alpha\beta$ 抗体による免疫沈降物を示す。p21FUR は、p21 遺伝子転写開始点から -7018 から -6833 に位置するコントロール DNA 領域を示す。

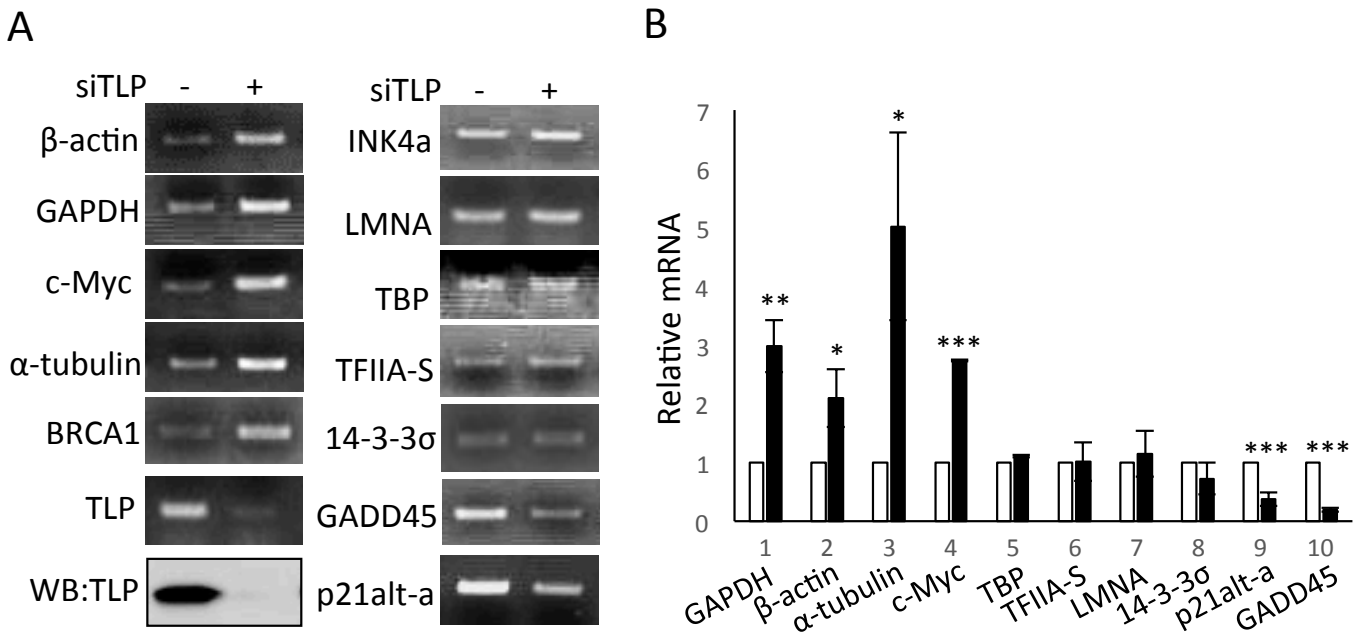
図 14. TLP と TFIIA による細胞増殖の抑制

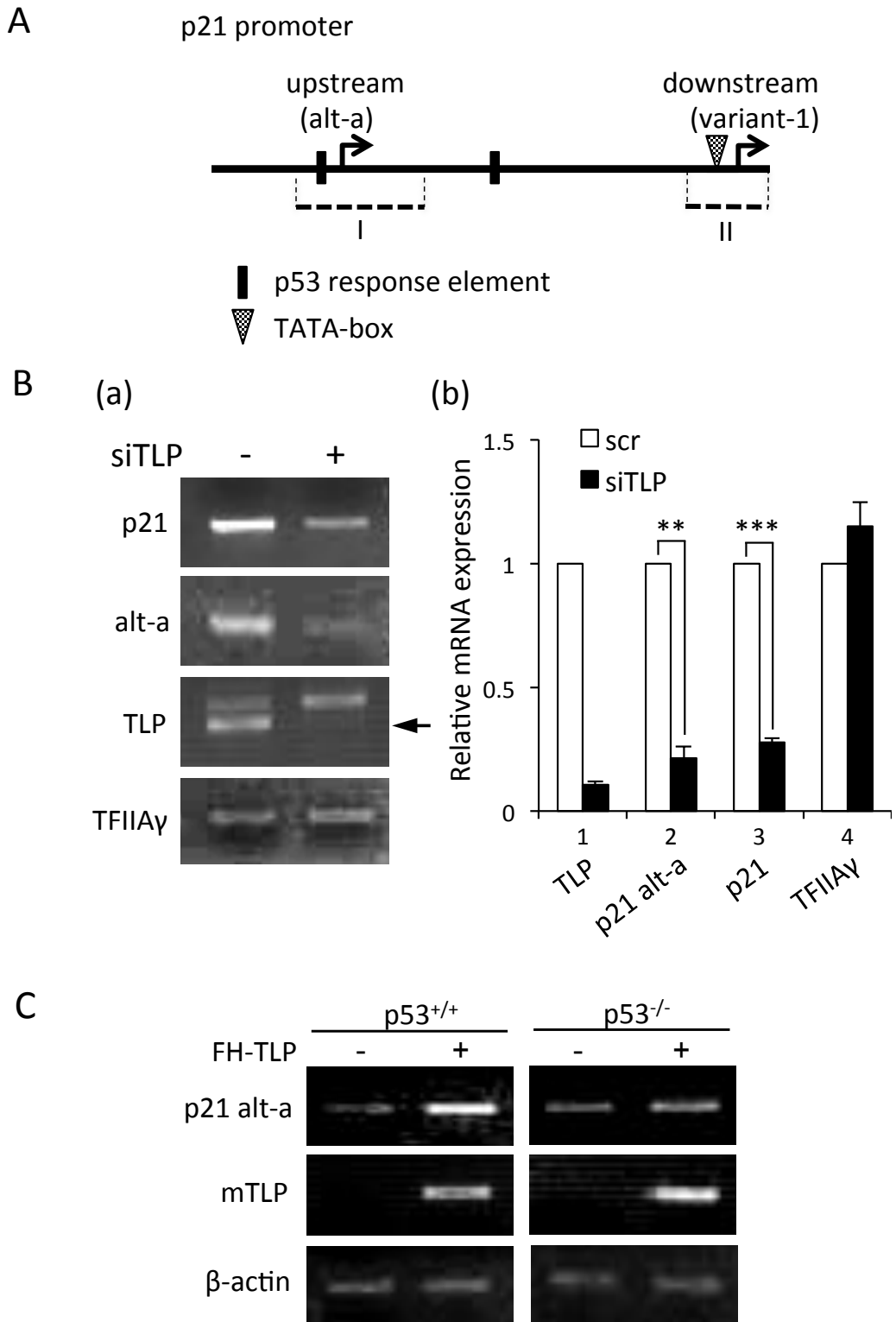
A. TLP ノックダウン細胞の細胞増殖速度。野生型 (p53^{+/+}) (a) あるいは p53 欠損型 (p53^{-/-}) (b) の HCT116 細胞に TLP ノックダウン siRNA (siTLP) またはコントロール siRNA (scr) を導入した後、細胞を 6 穴プレートに移してそれぞれの時間培養し、細胞数を数えた。B. エトポシド含有培地における TLP ノックダウン細胞の細胞増殖速度。TLP ノックダウン siRNA (siTLP) をトランスフェクションした細胞をエトポシド (ETO) を含む培地中でそれぞれの時間培養し、細胞数を数えた。C. TLP 過剰発現細胞の細胞増殖速度。TLP またはその変異体 (R55E、R52E、N37E) を過剰発現させた後、6 穴プレートにおいてそれぞれの時間培養し、細胞数を数えた。D. TFIIA ノックダウン細胞の細胞増殖速度。(a) 野生型 HCT116 細胞に TFIIA ノックダウン siRNA (siIIA) またはコントロール siRNA (scr) を導入し、A および B と同様の実験を行った。

図 15. TLP-TFIIA 相互作用によるプロモーター調節メカニズムの仮説

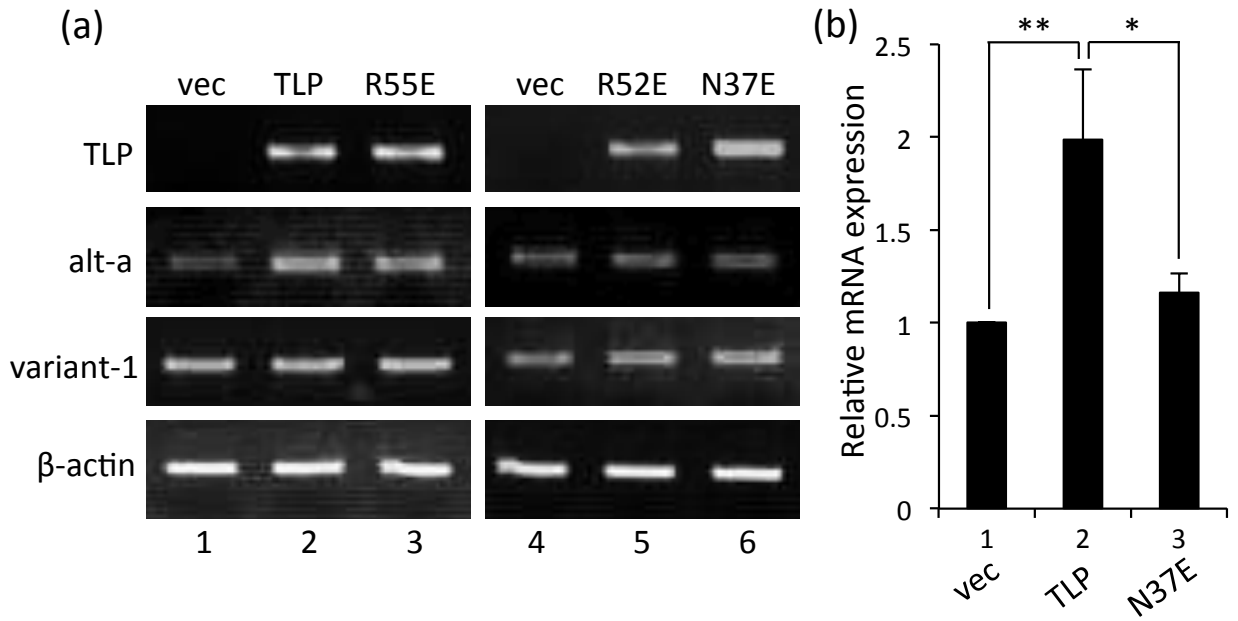
TLP は Taspase1 による TFIIA $\alpha\beta$ のプロセッシングを阻害し、TATA box 遺伝子の活性化を抑制する。TLP はまた、成熟型 TFIIA あるいは TFIIA 前駆体と結合し、TLP が標的とするプロモーターの活性化に作用する。結局、TLP は TFIIA のプロモーターへの結合を調節することによって、転写をグローバルに制御していると考えられる。

图1

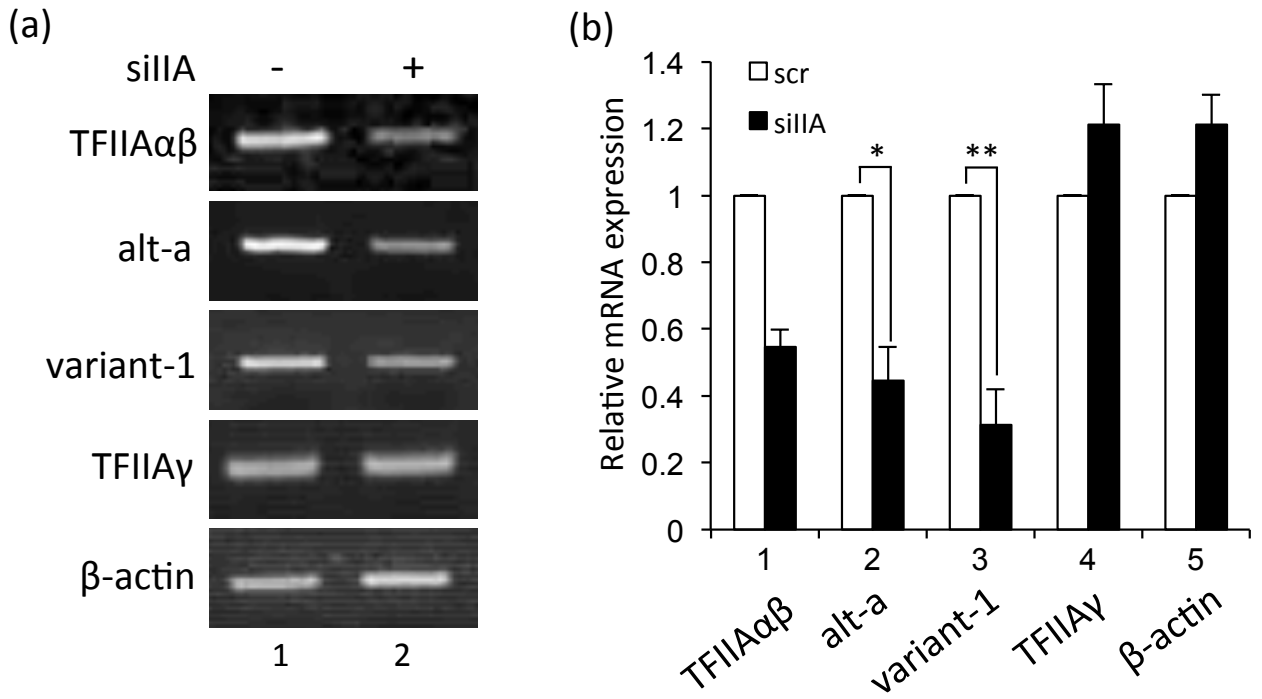


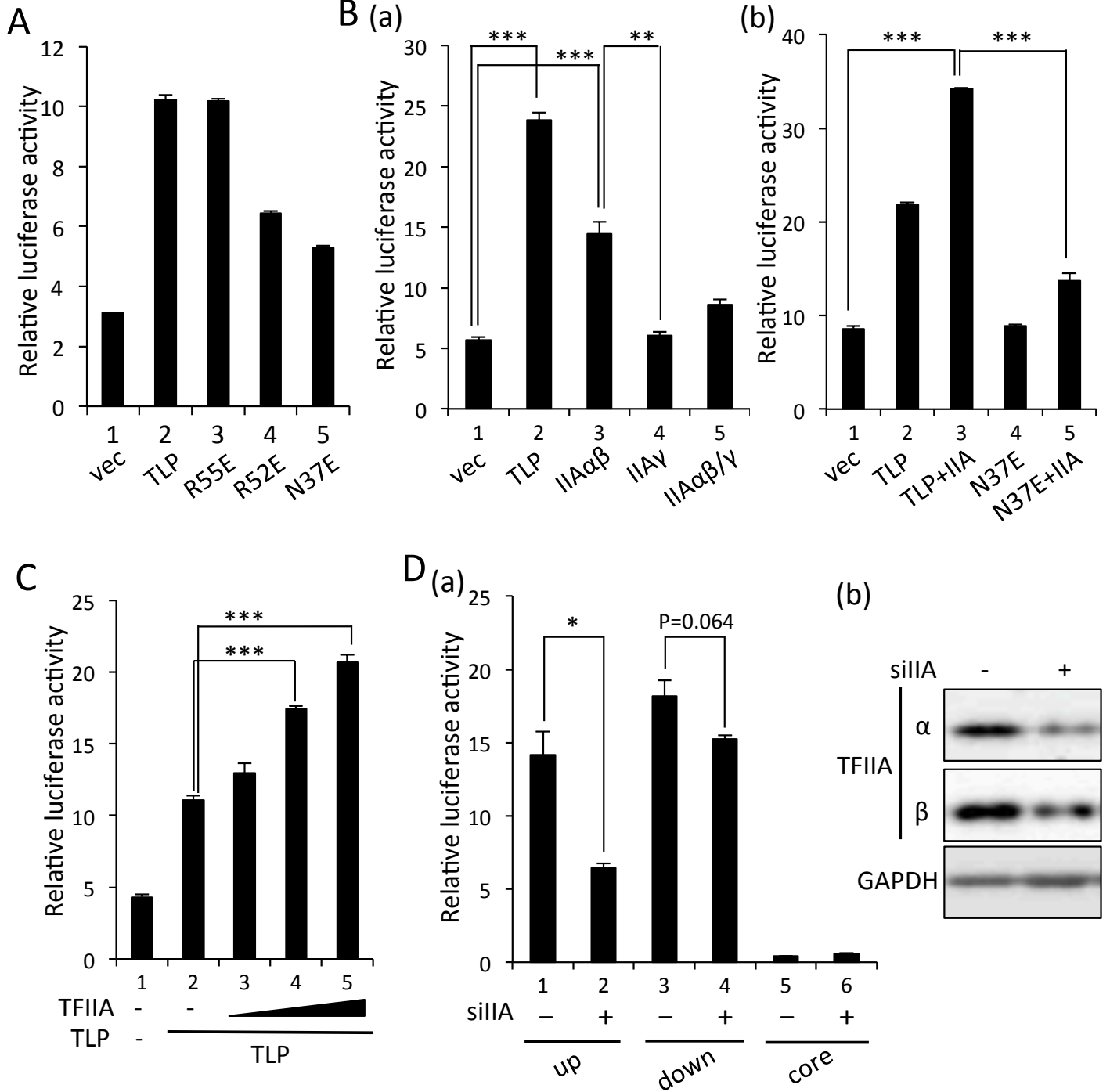


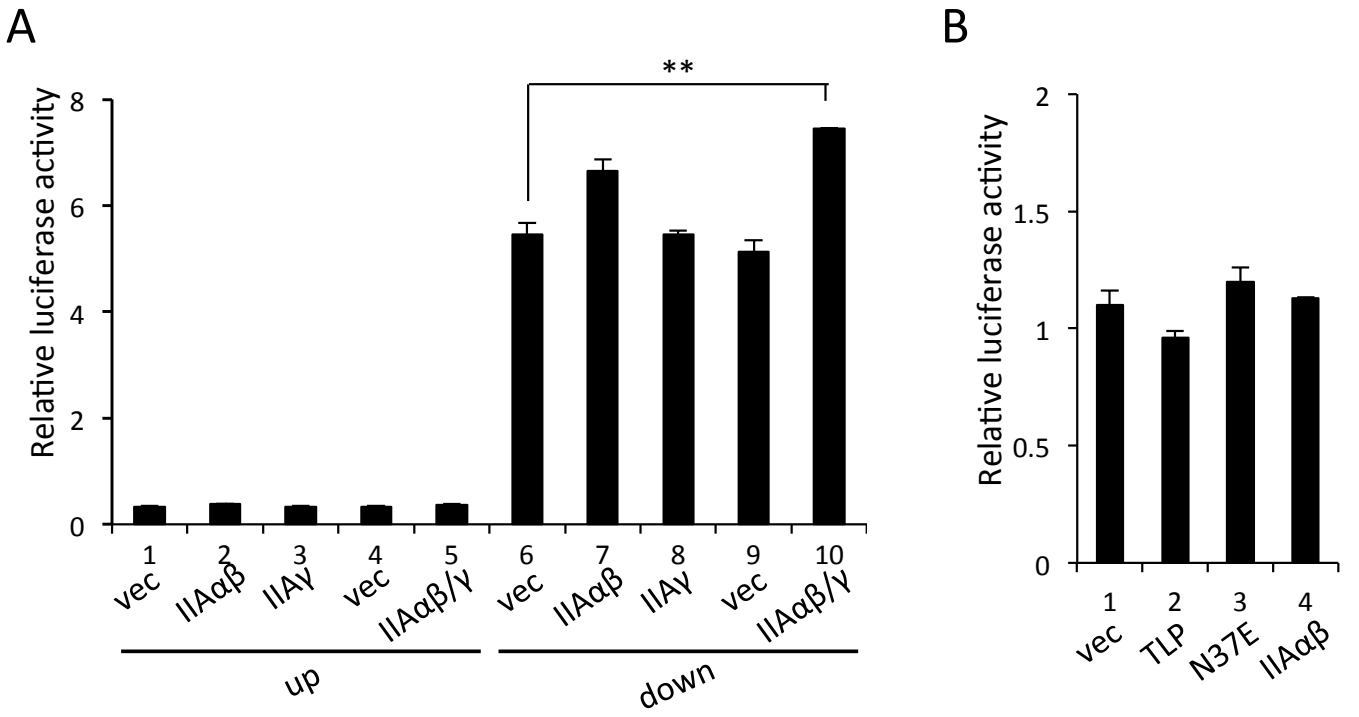
A

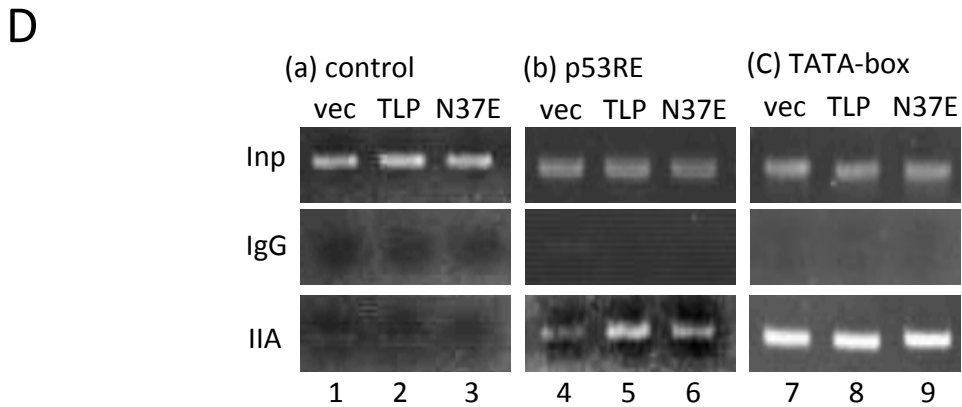
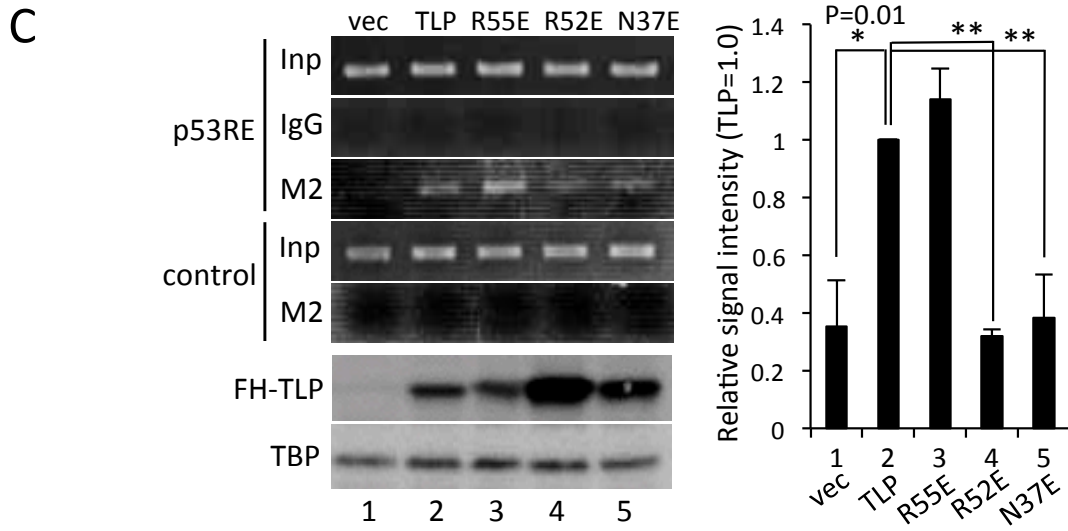
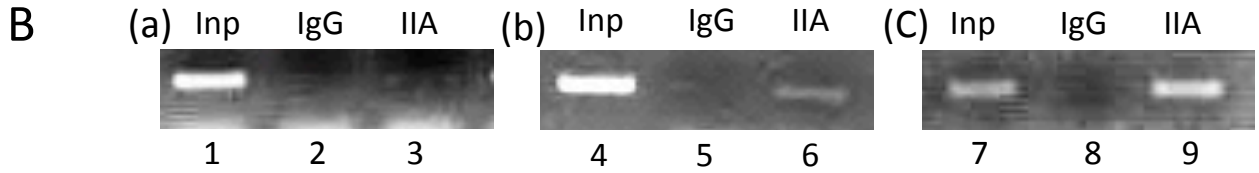
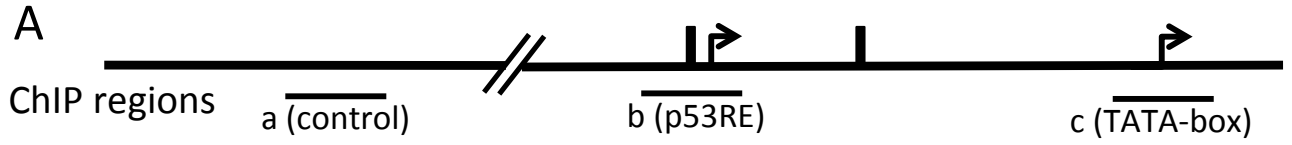


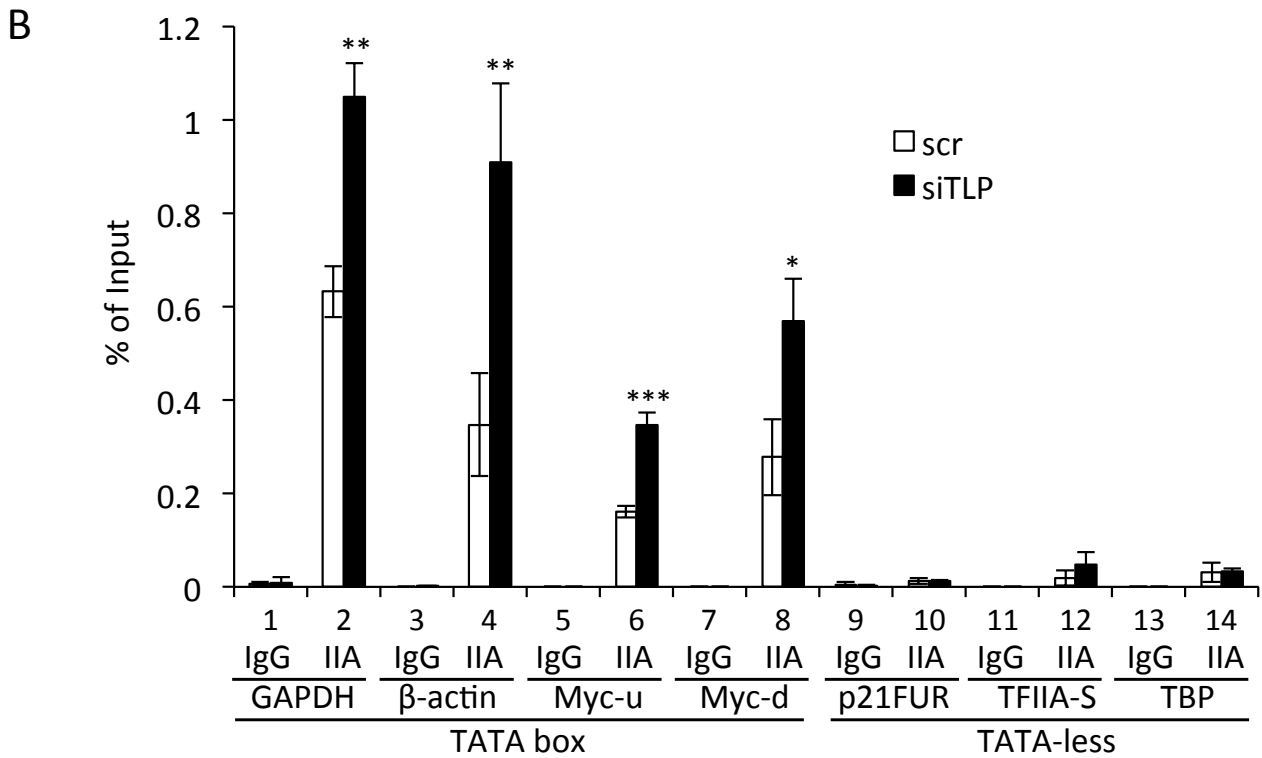
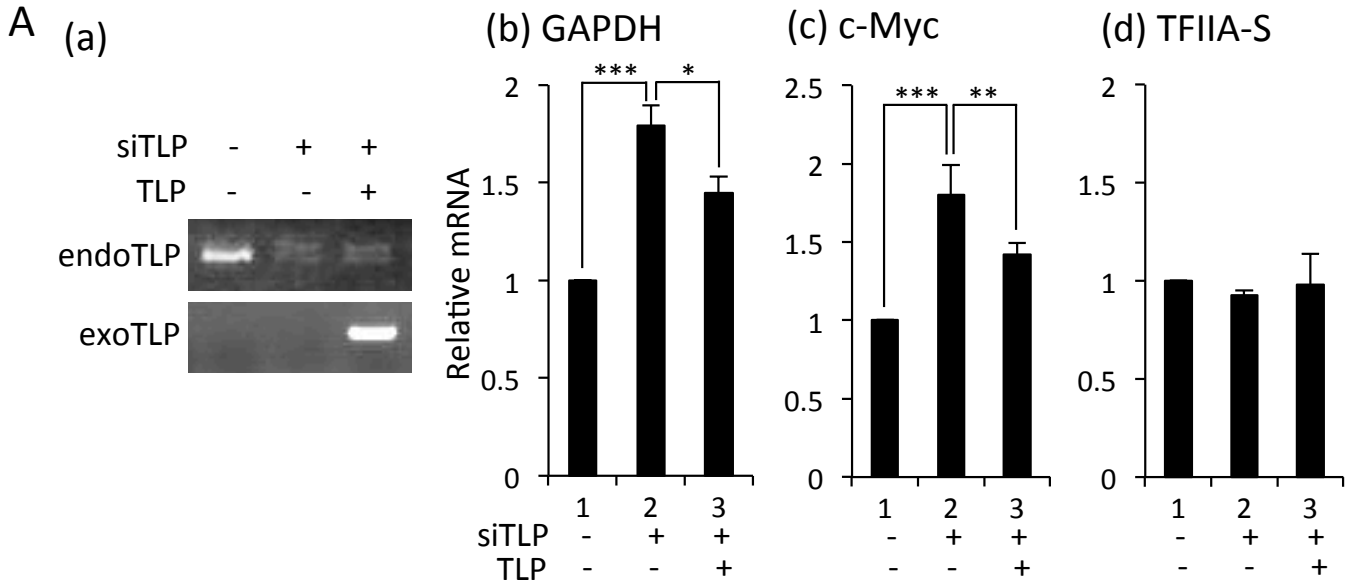
B





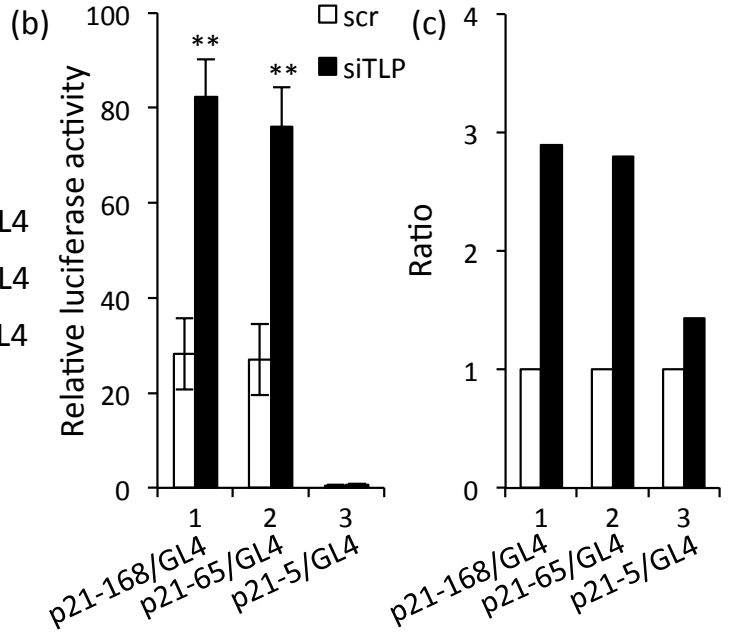
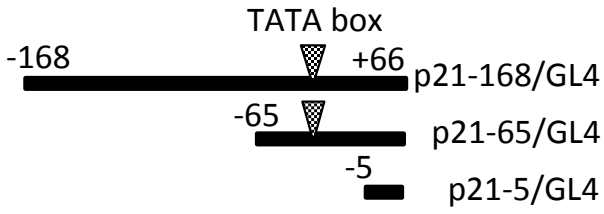






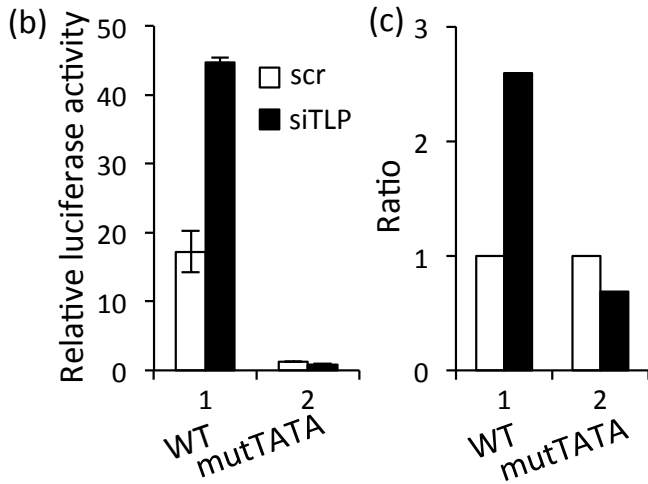
8

A (a)

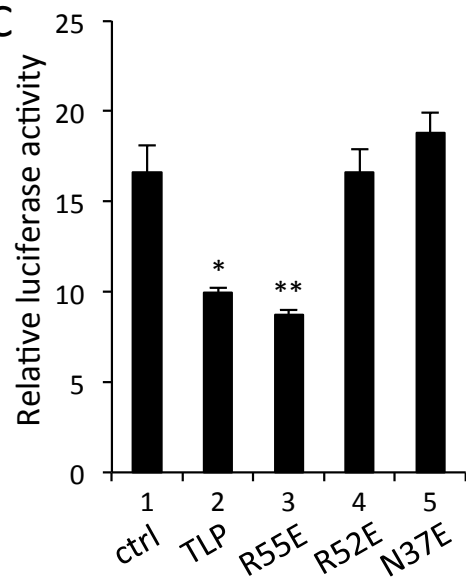


B (a)

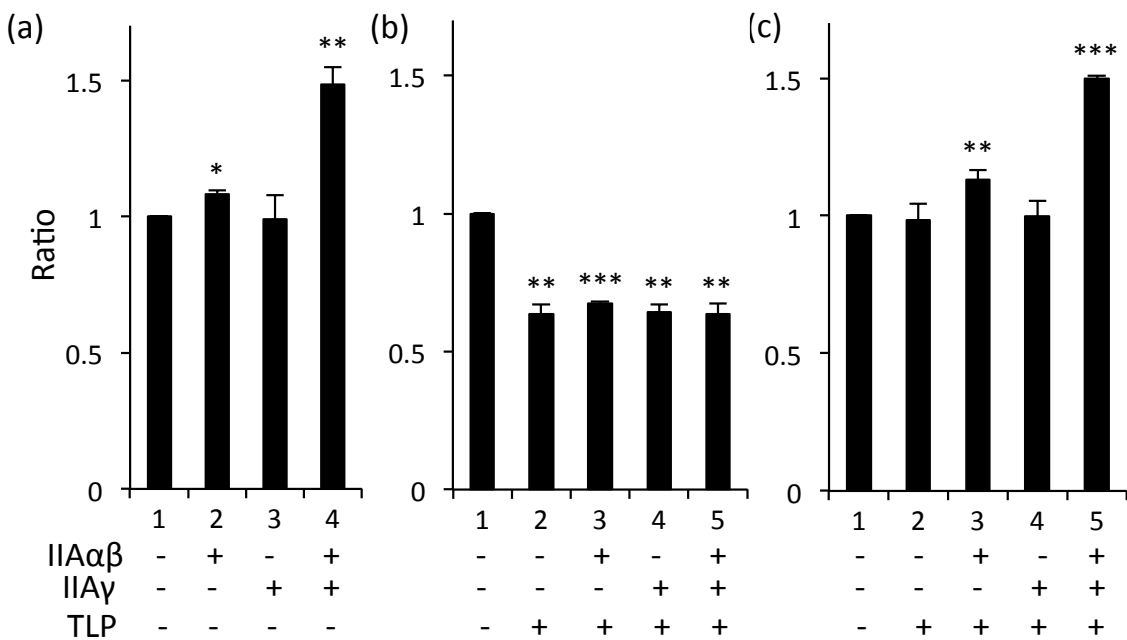
WT: -36 -CGGTTTCTATAAATTGAGCC-19
mutTATA: -CGGTTTCgcggttgTGAGCC-

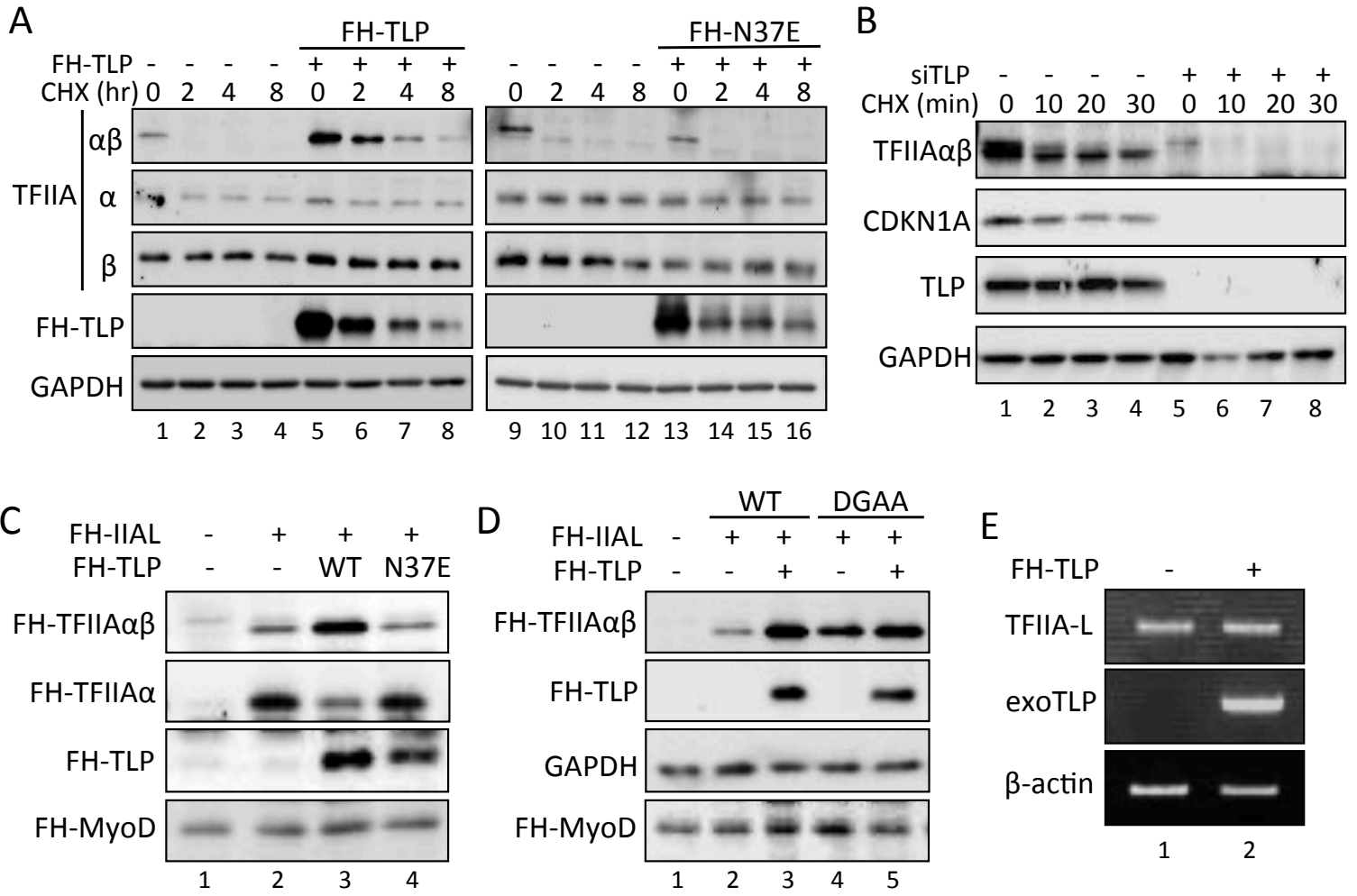


C



D





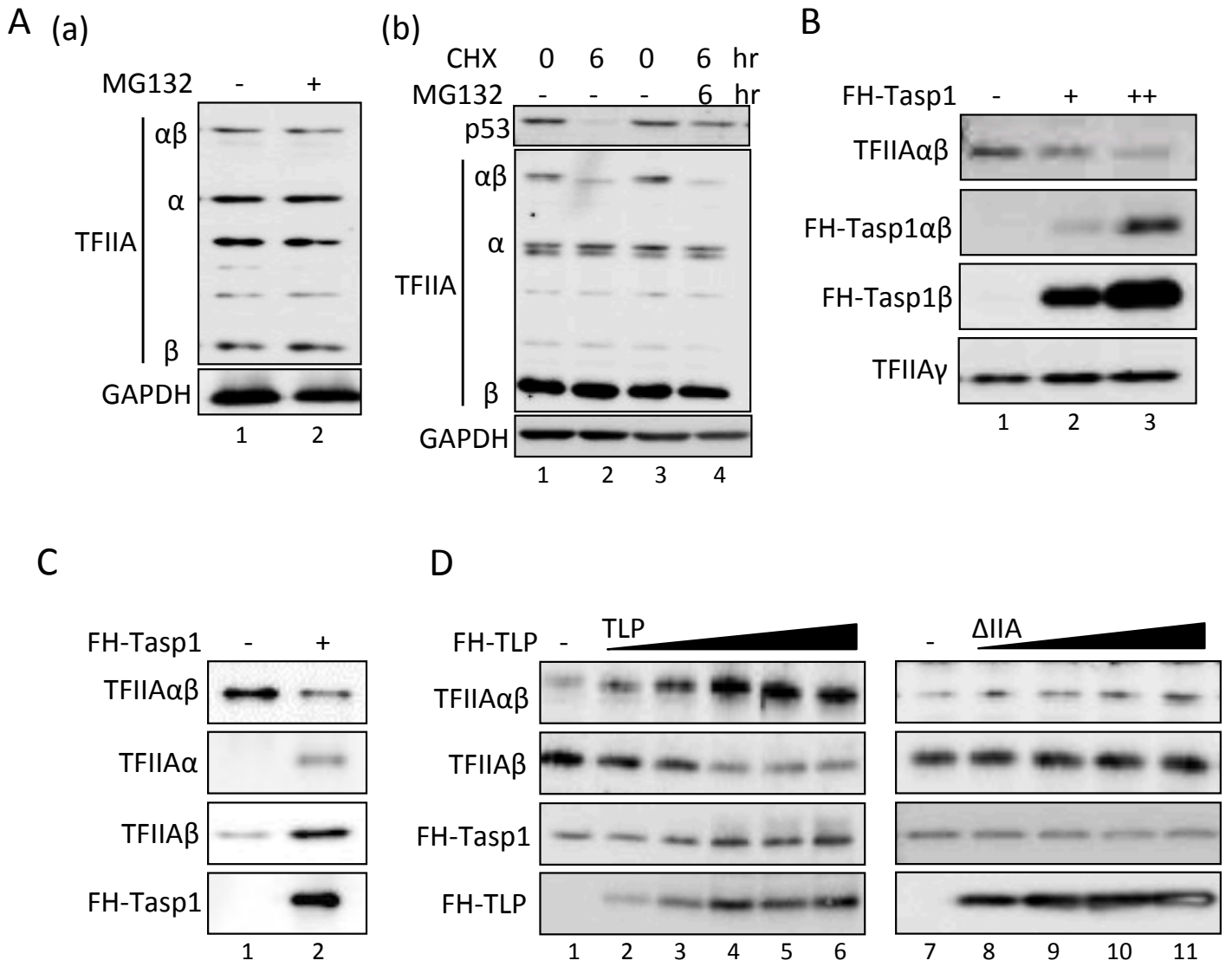
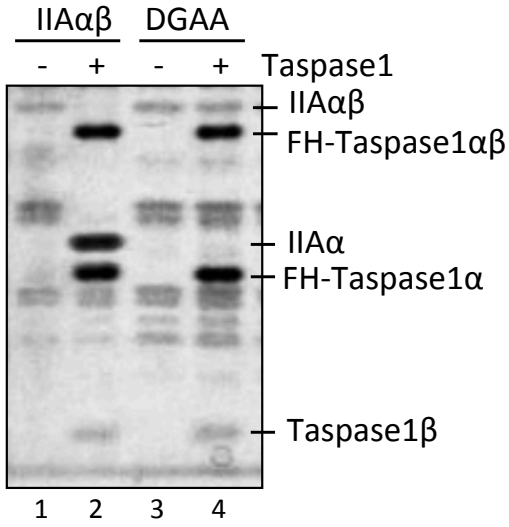
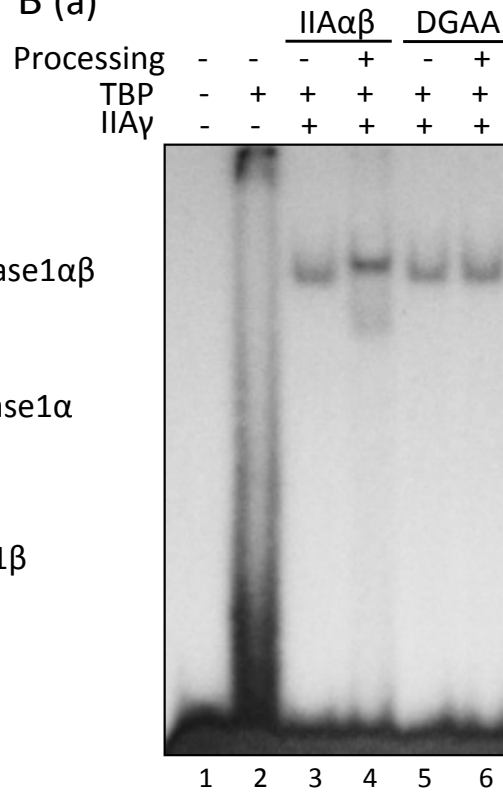


Figure 11

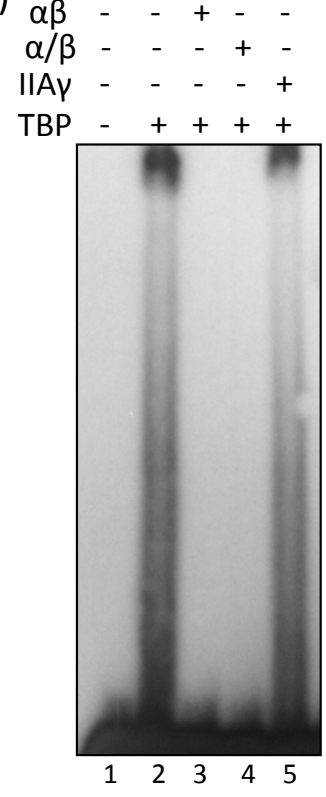
A



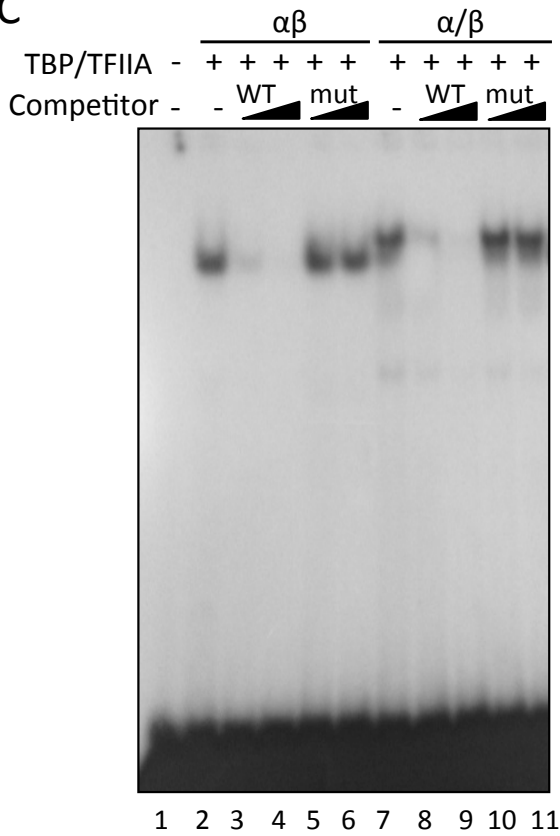
B (a)



(b)



C



D

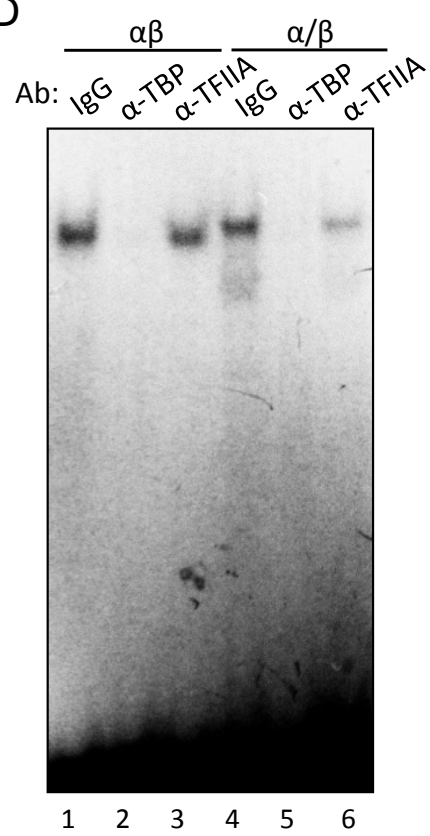
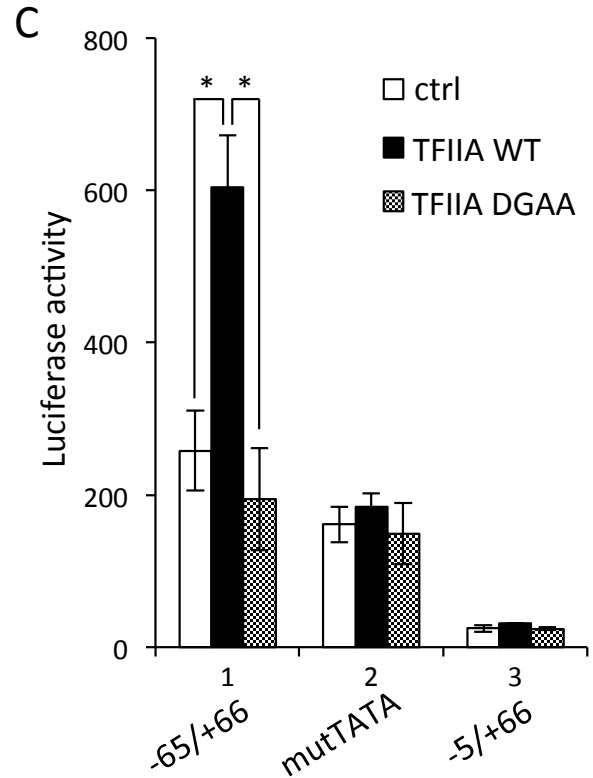
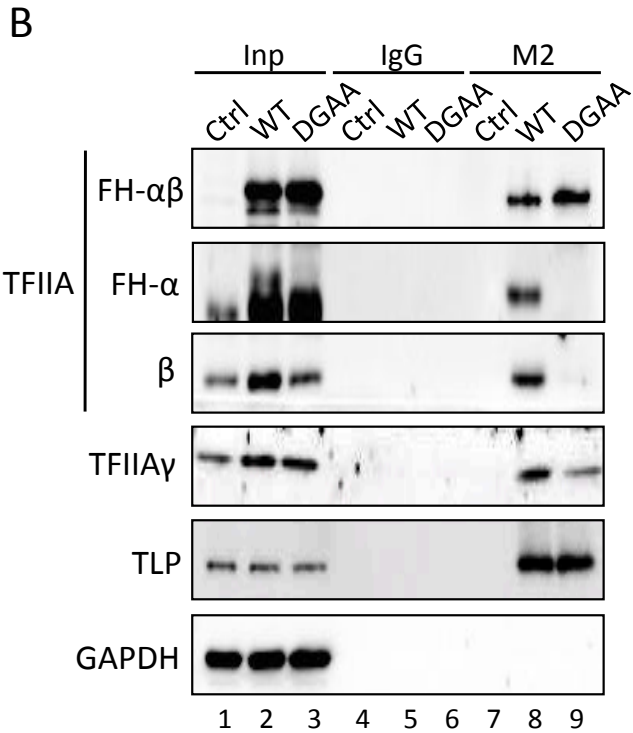
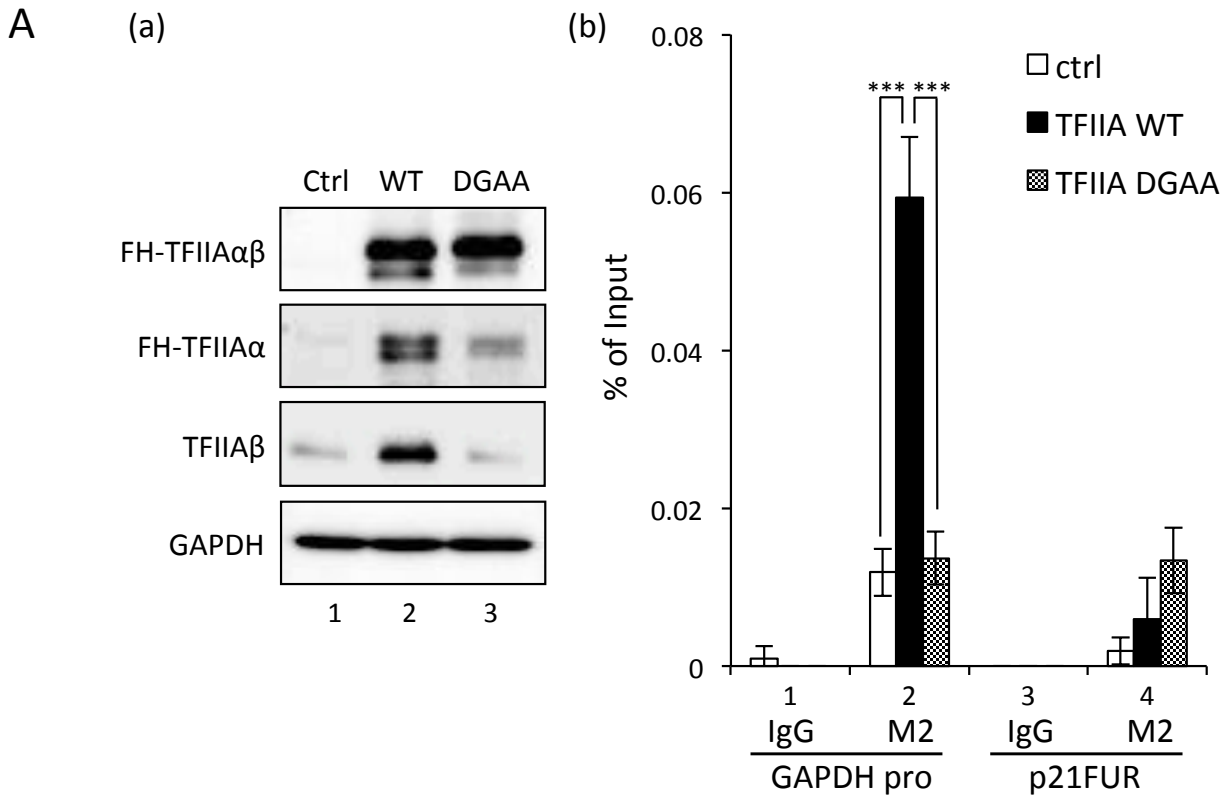


Figure 12



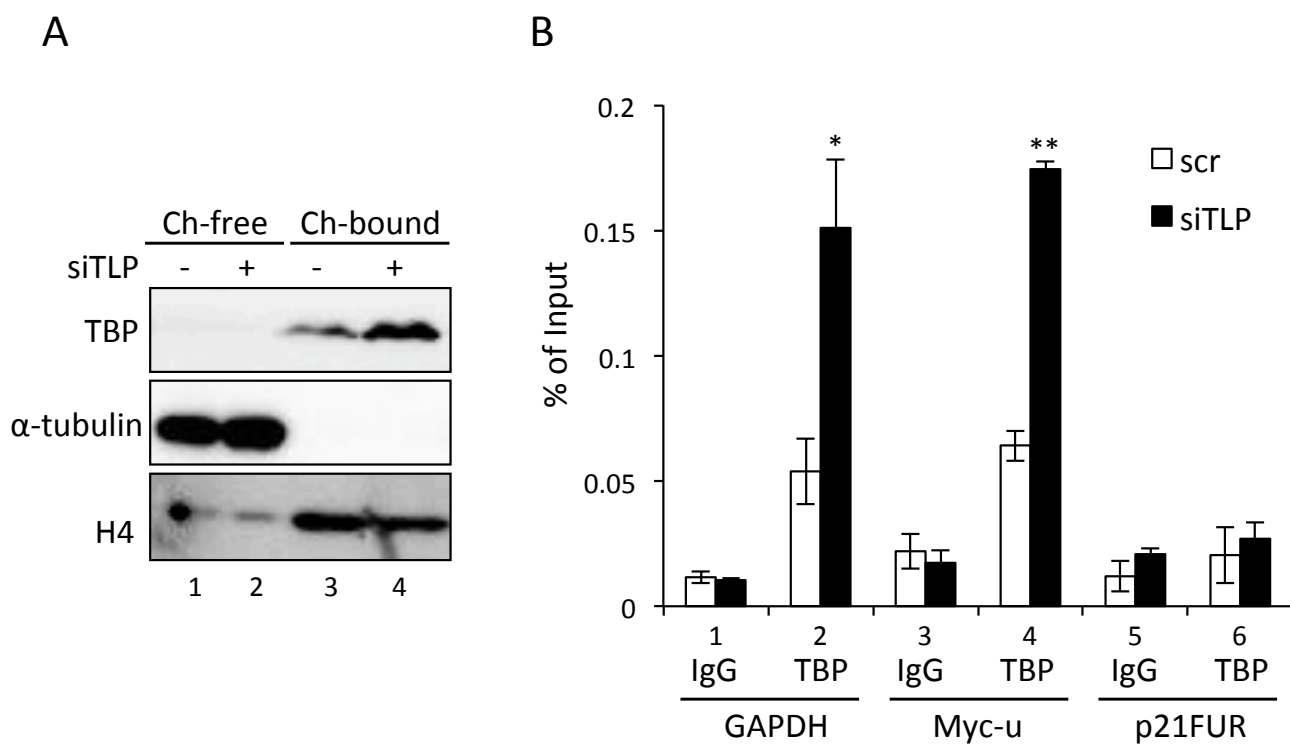
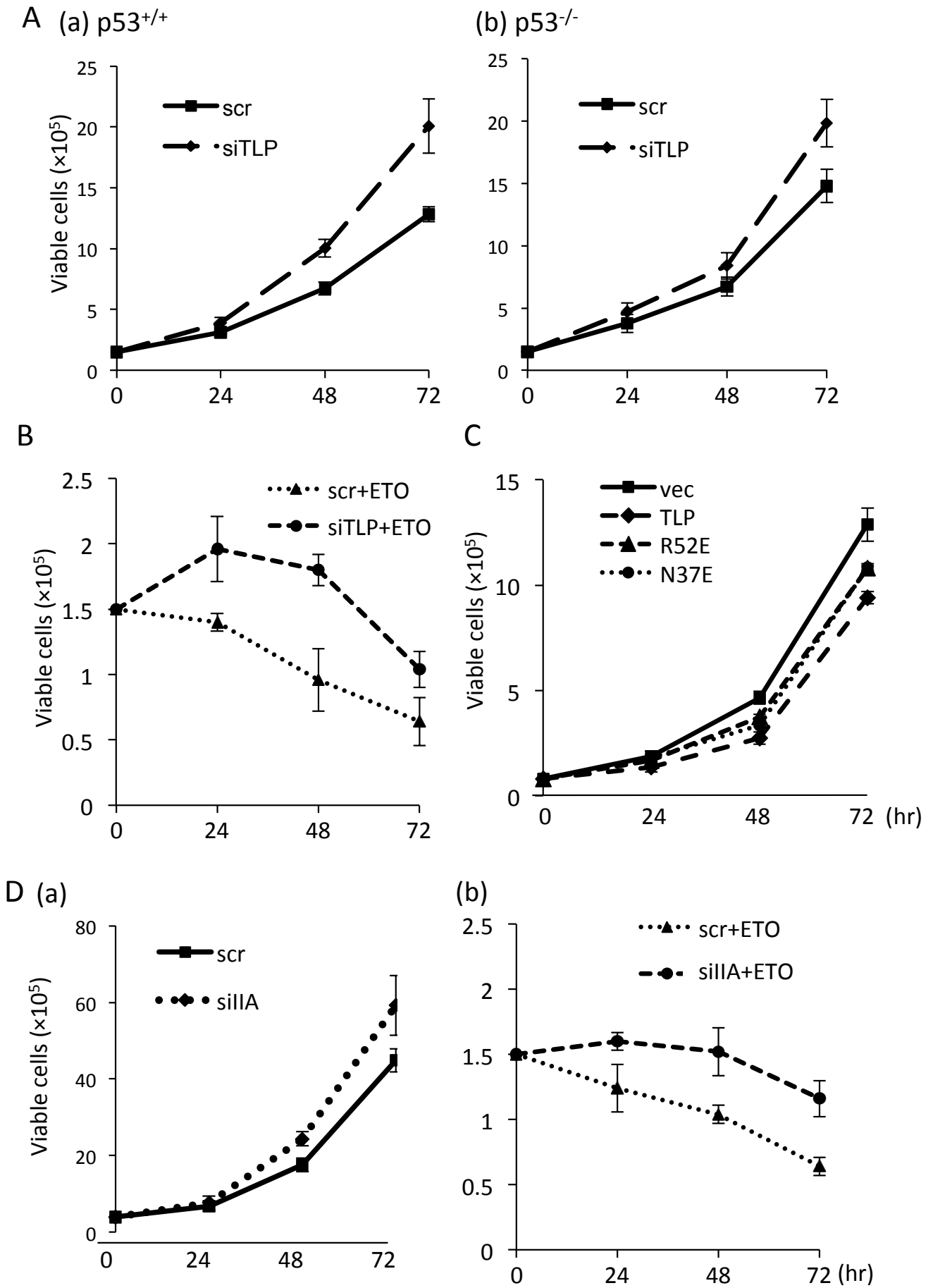
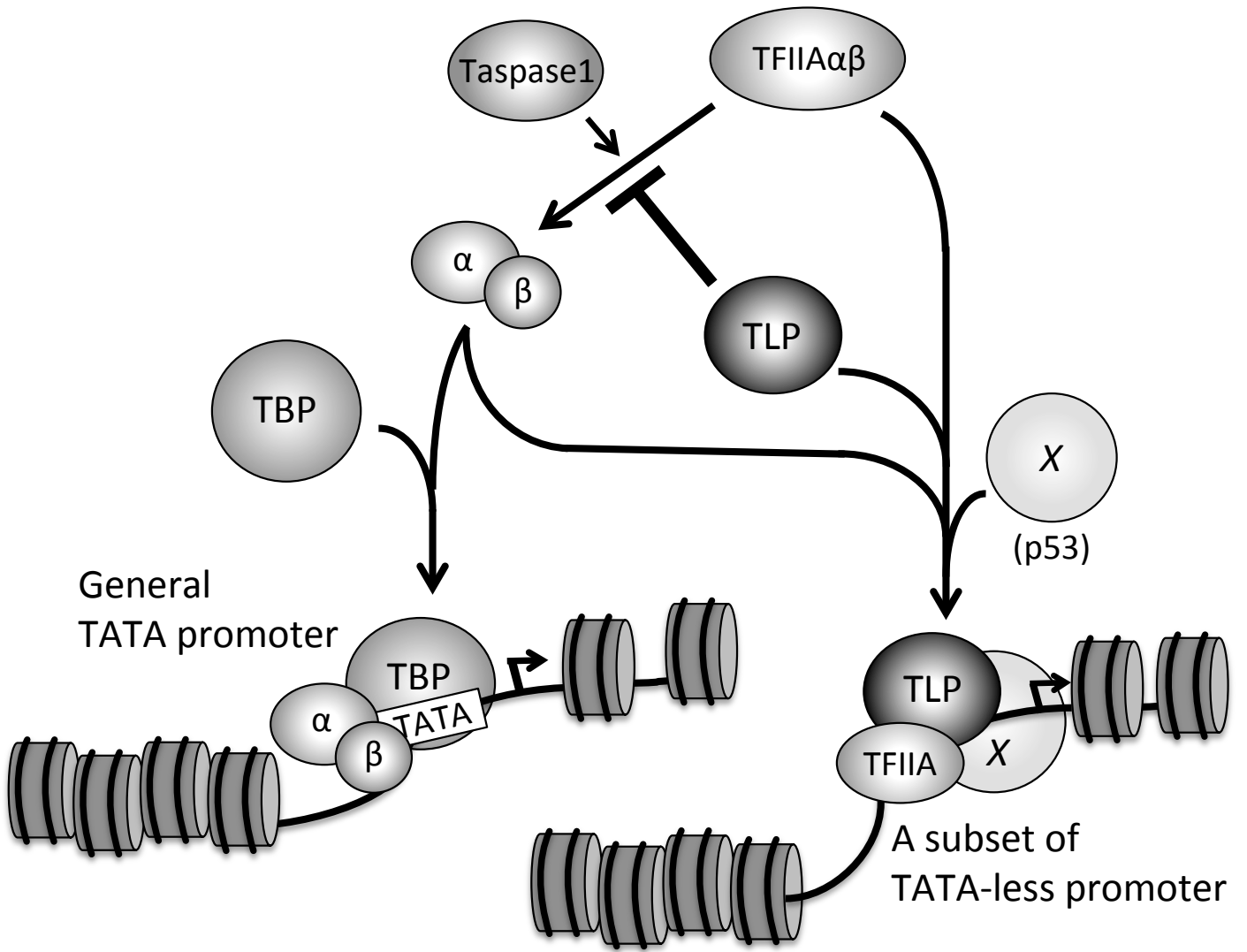


Figure 14





論文目録

既公表論文

鈴木 秀文、前田 亮、中太 智義、田村 隆明：

Activity of the upstream TATA-less promoter of the p21Waf1/Cip1 gene depends on transcription factor IIA (TFIIA) in addition to TFIIA-reactive TBP-like protein. *FEBS J.*, **281**, 3126-3137, 2014

鈴木 秀文、磯貝 桃子、前田 亮、浦 聖恵、田村 隆明：

TBP-like protein (TLP) interferes with Taspase1-mediated processing of TFIIA and represses TATA box gene expression. *Nucleic Acids Res.* (印刷中)

参考論文

北村 拓也、鈴木 秀文、田村 隆明：

Mouse Wee1 gene is repressed by Krüppel-like factor 3 (KLF3) via interaction with multiple upstream elements. *Gene*, **492**, 361-367, 2012

鈴木 秀文、鈴木 あい、前川 由惟、白石 征二、田村 隆明：

Interplay between two myogenesis-related proteins: TBP-interacting protein 120B and MyoD. *Gene*, **504**, 213-219, 2012

鈴木 秀文、伊藤 亮、池田 香織、田村 隆明：

TATA-binding protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of upstream promoter of p21Waf1/Cip1 gene. *J. Biol. Chem.*, **287**, 19792-19803, 2012

前田 亮、鈴木 秀文、田中 悠太、田村 隆明：

Interaction between transactivation domain of p53 and middle part of TBP-like protein (TLP) is involved in TLP-stimulated and p53-activated transcription from the p21 upstream promoter. *PLoS One*, **9**, e90190, 2014

Activity of the upstream TATA-less promoter of the *p21^{Waf1/Cip1}* gene depends on transcription factor IIA (TFIIA) in addition to TFIIA-reactive TBP-like protein

Hidefumi Suzuki, Ryo Maeda, Tomoyoshi Nakadai* and Taka-aki Tamura

Graduate School of Science, Chiba University, Japan

Keywords

p21; p53; TFIIA; TLP; transcription

Correspondence

T. Tamura, Graduate School of Science,
Chiba University, 1-33 Yayoicho, Inage-ku,
Chiba 263-8522, Japan
Fax: +81 43 290 2824
Tel: +81 43 290 2823
E-mail: ttamura@faculty.chiba-u.jp

*Present address:

Laboratory of Biochemistry and Molecular
Biology, Rockefeller University, New York,
NY 10065, USA

(Received 17 March 2014, revised 9 May
2014, accepted 14 May 2014)

doi:10.1111/febs.12848

TATA-binding protein-like protein (TLP) binds to transcription factor IIA (TFIIA) with high affinity, although the significance of this binding is poorly understood. In this study, we investigated the role of TFIIA in transcriptional regulation of the *p21^{Waf1/Cip1}* (*p21*) gene. It has been shown that TLP is indispensable for p53-activated transcription from an upstream TATA-less promoter of the *p21* gene. We found that mutant TLPs having decreased TFIIA-binding ability exhibited weakened transcriptional activation function for the upstream promoter. Activity of the upstream promoter was enhanced considerably by an increased amount of TFIIA in a p53-dependent manner, whereas activity of the TATA-containing downstream promoter was enhanced only slightly. TFIIA potentiated the upstream promoter additively with TLP. Although TFIIA is recruited to both promoters, activity of the upstream promoter was much more dependent on TFIIA. Recruitment of TFIIA and TLP to the upstream promoter was augmented in etoposide-treated cells, in which the amount of TFIIA–TLP complex is increased, and TFIIA-reactive TLP was required for the recruitment of both factors. It was confirmed that etoposide-stimulated transcription depends on TLP. We also found that TFIIA-reactive TLP acts to decrease cell growth rate, which can be explained by interaction of the *p21* promoter with the transcription factors that we examined. The results of the present study suggest that the upstream TATA-less promoter of *p21* needs TFIIA and TFIIA-reactive TLP for p53-dependent transcriptional enhancement.

Structured digital abstract

- [TLP physically interacts](#) with [TFIIA beta](#) and [TFIIA alpha](#) by [anti tag coimmunoprecipitation](#) ([View interaction](#))
- [TFIIA alpha/beta physically interacts](#) with [TLP](#) by [anti bait coip](#) ([View interaction](#))

Introduction

Transcriptional regulation of an RNA polymerase II driven gene is governed by a particular set of gene-specific DNA-reactive transcription regulatory factors and their associating transcriptional cofactors. Moreover, general transcription factors such as TFIID

(transcription factor IID) and TFIIA are assembled at a promoter region to conduct transcriptional initiation [1–3], which is enhanced by gene-specific transcription regulatory factors through functional interaction.

Abbreviations

ChIP, chromatin immunoprecipitation; qPCR, quantitative PCR; siRNA, short interfering RNA; TBP, TATA-binding protein; TFIIA, transcription factor IIA; TLP, TBP-like protein.

TATA-binding protein (TBP) is an essential component in TFIID that binds to the TATA-box promoter element [2,4–6]. TBP-like protein (TLP, also called TRF2) has been identified as one of the TBP family proteins [7–9] and has been shown to enhance expression of TATA-less genes such as *NF-1*, *Cyclin-G2*, *TAp63* and *Wee1* [10–12]. TLP is unable to bind to the TATA-box, and a consensus TLP-binding sequence has not been determined so far. In the *Drosophila PCNA* gene, TLP is engaged in transcriptional activation as a cofactor for a transcription regulatory factor called DREF [13]. Although TLP is usually concentrated in the cytoplasm, it translocates to the nucleus in a particular cell-cycle period or when activated by a genotoxin such as etoposide [12]. Hence, TLP is thought to be involved in gene regulation related to growth control and DNA damage response. Recently, we have identified *p21* (*p21^{Waf1/Cip1}*) as one of the TLP-target genes [14].

p21 is a CDK inhibitor and causes cell-cycle arrest at G₁ or G₂ phase [15,16]. Since *p21* also participates in apoptosis, DNA repair and tumor suppression in some cases [17], *p21* is regarded as a major gene for cell growth regulation. The amount of intracellular *p21* is regulated at the transcription level, and its expression level is enhanced by multiple transcription factors [18,19]. The promoter-enhancer region of *p21* contains several binding sites for p53, which enhances the promoter activity. p53, which works for genome homeostasis, is a typical tumor suppressor and major regulator of the *p21* gene [20–22]. The human *p21* gene has two major promoters: a TATA-containing downstream promoter and an upstream TATA-less promoter [23,24]. TFIID is recruited to the TATA-box of the downstream promoter together with p53 upon UV irradiation, but it does not participate in regulation of the upstream promoter [24]. We have found that activity of the upstream promoter absolutely depends on TLP and p53 [14], and these two factors form a complex in cells [14,25].

The most attractive property of TLP is its potent TFIIA-binding ability. TFIIA is another member of the family of general transcription factors [3]. Although TFIIA binds to TBP to some extent in order to potentiate TFIID-dependent promoters, it is also used for TATA-less promoters [3,26,27]. In higher eukaryotes, TFIIA consists of three subunits including TFIIA α , β and γ [3]. TFIIA $\alpha\beta$ is encoded by a single gene and is cleaved into individual α and β subunits [3,28]. We have found that TLP binds more strongly to TFIIA than to TBP [29]. Although TLP is mainly localized in the cytoplasm, mutant TLPs with impaired TFIIA-binding ability display a diffuse localization

pattern [29]. However, the significance of the TFIIA-binding ability of TLP in transcriptional regulation has remained to be clarified.

In this study, we investigated the contribution of TLP–TFIIA interaction to *p21* gene regulation, and we found that mutant TLPs with weakened TFIIA-binding ability exhibit decreased transcription stimulation activity. Moreover, etoposide, which stimulates *p21* gene expression, facilitated binding of the upstream promoter to TFIIA and TFIIA-reactive TLP. One reason why TLP possesses a strong TFIIA-binding ability may be elucidated through this study.

Results

Transcriptional activation function of mutant TLPs for the *p21* promoter

We previously constructed various kinds of mutant TLPs [29]. Among them, N37E and R52E have weakened binding ability to TFIIA, and N37E is a more severe mutant than R52E for TFIIA binding, whereas R55E binds to TFIIA as strongly as does wild-type TLP. In this study, we first investigated in detail the intracellular TFIIA-binding strength of these mutants by co-immunoprecipitation assays. It was confirmed that wild-type TLP and R55E exhibited significant binding to TFIIA, whereas N37E did not bind to TFIIA (Fig. 1). We further investigated processed and unprocessed forms of TFIIA α/β and found that R52E binds to the α and β subunits of TFIIA but does not bind to uncleaved TFIIA $\alpha\beta$ (Fig. 1, lane 12).

The human *p21* gene produces mainly alt-a and variant-1 transcripts from the upstream and downstream promoters, respectively (Fig. 2A) [14,23]. Knockdown

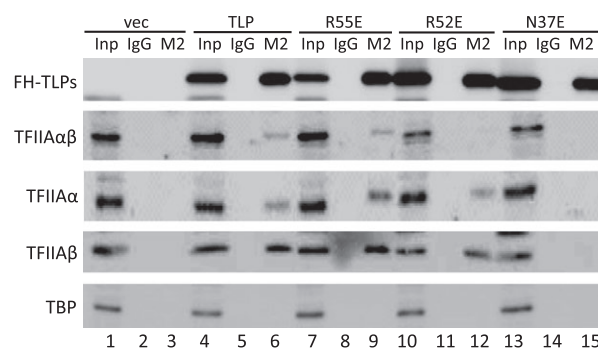


Fig. 1. TFIIA-binding ability of TLP. Co-immunoprecipitation to detect the interaction between TLP and TFIIA. Extracts of HCT116 cells into which FH-TLP (TLP) and its mutants (R55E, R52E and N37E) had been introduced were immunoprecipitated with M2 beads (M2) and examined for indicated proteins by western blotting using specific antibodies. Inp, input.

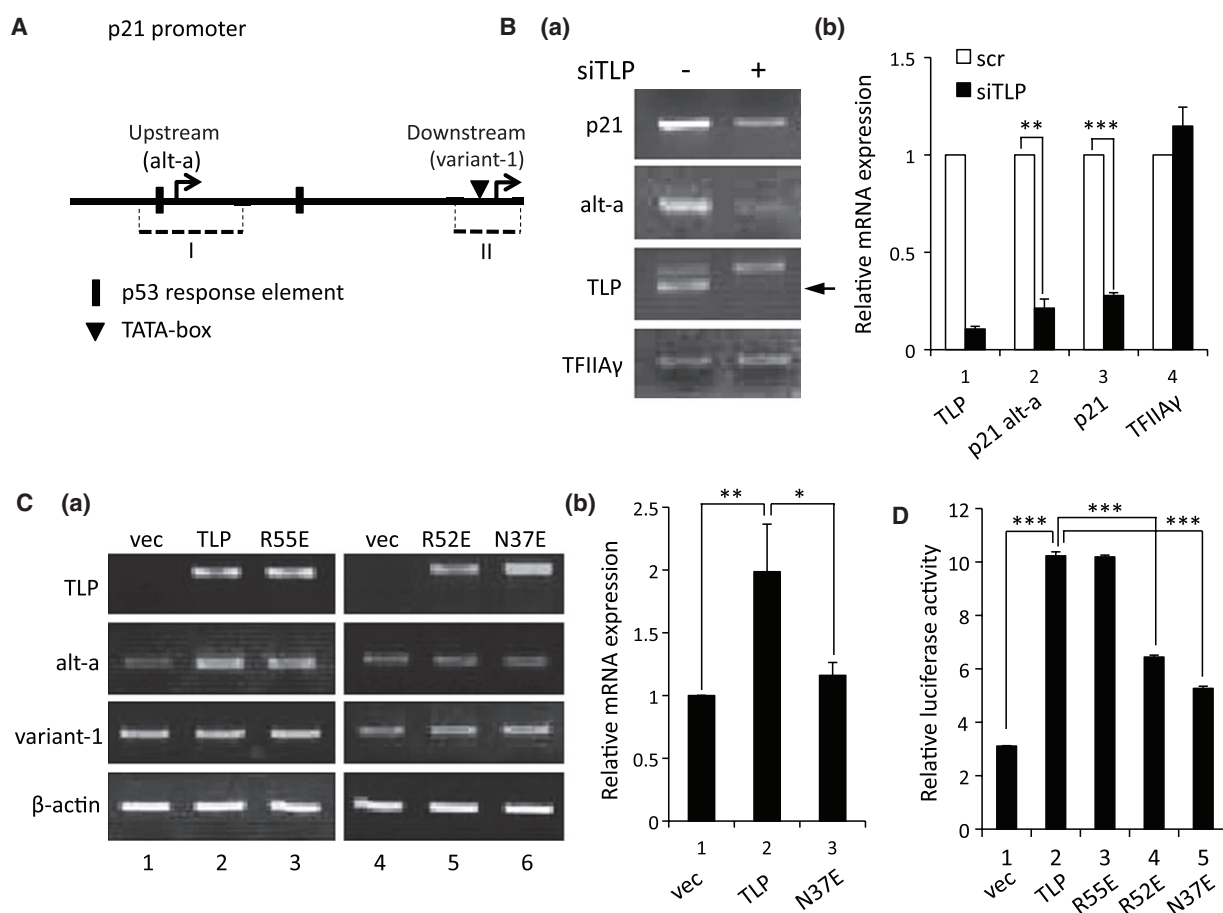


Fig. 2. Activation of the endogenous *p21* upstream promoter by TFIIA-reactive TLP. (A) Schematic representation of the promoter region of the human *p21* gene. Transcription start sites for the upstream and downstream promoters, which produce alt-a and variant-1 transcripts, respectively, are shown by arrows. Dotted lines (I and II) represent promoter regions included in luciferase reporter plasmids. (B) Effect of TLP knockdown on *p21* gene expression. Amounts of whole *p21* transcripts (p21) and alt-a (alt-a, *p21* alt-a) in HeLa cells were determined by semi-quantitative RT-PCR (a) and RT-qPCR (b). Control siRNA is depicted as – or scr. Each mRNA level for scr (open column) is assigned as 1.0, and relative mRNA level for siTLP (solid columns) is shown. Arrow, position of the specific signal. (C) Effects of overexpressed TLP and its mutants on mRNA transcribed from upstream (alt-a) and downstream (variant-1) promoters. HCT116 cells into which TLP or its mutants had been introduced were assayed for *p21* transcripts by RT-PCR (a) and RT-qPCR (b) using specific primer sets. The relative mRNA levels for TLP and N37E are displayed as ratios to the mRNA level for vec (lane 1). vec, empty vector. (D) Transcriptional activation of the upstream promoter by mutant TLPs. HCT116 cells transfected with indicated effector plasmids together with a reporter plasmid (*p21*up/GL4) carrying *p21* promoter-containing DNA from –2266 to –1875 were examined by luciferase assay for transcriptional activation function of the native and mutant TLPs.

of endogenous TLP resulted in decreased production of whole *p21* transcripts, mainly due to the decreased level of alt-a transcripts (Fig. 2B). An overexpression experiment confirmed that alt-a is specifically dependent on intracellular TLP level. Next, we investigated the transcriptional activation function of the above-mentioned TLP mutants. R55E, which has a native TFIIA-binding ability, considerably enhanced alt-a production (Fig. 2C–a, lane 3), whereas R52E and N37E exhibited almost no effect (lanes 5 and 6). R52E and N37E showed decreased transcription stimulation

activity for the upstream promoter compared with that of wild-type TLP and R55E (Fig. 2C). To obtain direct evidence that TFIIA-reactive TLP potentiates the upstream promoter, we performed a luciferase reporter assay in mutant TLP-overexpressed cells. It was demonstrated that R55E enhanced promoter activity as much as wild-type TLP did, whereas R52E and N37E had less effect on promoter activity than did wild-type TLP (Fig. 2D). These results suggest that TFIIA-binding ability is required for the transcription stimulation function of TLP.

TFIIA sensitivity of the upstream promoter

Since TFIIA-binding ability of TLP was found to affect the transcriptional activation function of the upstream promoter (Fig. 2C,D), we investigated how TFIIA works for *p21* promoters. Overexpression of TFIIA $\alpha\beta$ considerably stimulated the upstream promoter (Fig. 3A-a, lane 3). Since TFIIA γ exhibited little effect (Fig. 3A-a, lane 4), the concentration of TFIIA γ in cells seemed to be sufficient for the upstream promoter. We further investigated the cooperative effect directed by TLP and TFIIA in transcriptional regulation through co-overexpression of TFIIA $\alpha\beta$ and TLP or N37E. Although the activation degree of TLP for the upstream promoter was 2.6-fold, co-overexpression of both TLP and TFIIA $\alpha\beta$

yielded 4.0-fold activation (Fig. 3A-b, lanes 1–3). However, this additive effect was relatively small (1.8-fold) when N37E and TFIIA $\alpha\beta$ were used (Fig. 3A-b, lanes 4 and 5). A dose-responsive effect of TFIIA on TLP-dependent promoter activation was observed (Fig. 3A-c), suggesting physical and functional interactions between TLP and TFIIA. To exclude a possibility that overexpressed TFIIA increases the amount of TLP protein, we examined the expression level of TLP and TFIIA and confirmed that TFIIA does not exhibit a significant effect on the expression of both endogenous and exogenous TLP (Fig. 3A-d). The downstream promoter was potentiated only slightly by TFIIA (Fig. 3B). Therefore it is suggested that the upstream promoter is much more sensitive to the

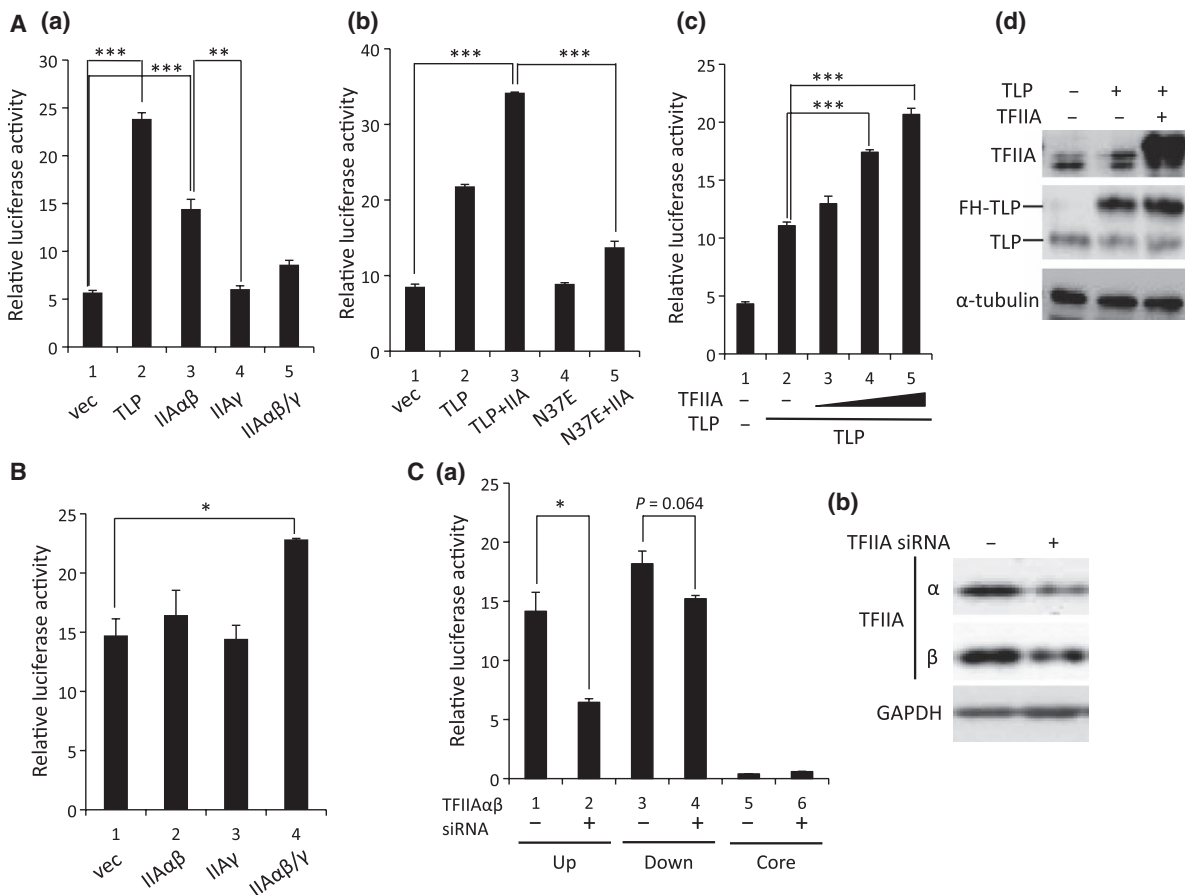


Fig. 3. Activation of *p21* promoter by TFIIA. The promoter activity in a reporter plasmid was examined in response to TFIIA in normal HCT116 cells. Cells were co-transfected with TFIIA expression plasmids for TFIIA $\alpha\beta$ (II $\alpha\beta$, II α) and TFIIA γ (II γ), and activities of the upstream promoter in p21up/GL4 (A) and downstream promoter in p21down/GL4 (B) were determined. (A-b) Cells were transfected with TLP and TFIIA $\alpha\beta$ or N37E and TFIIA $\alpha\beta$ to investigate the additive effect of the transcription factors. (A-c) Cells were transfected with a constant amount of TLP and an increasing amount of TFIIA $\alpha\beta$. (A-d) Expression levels of TFIIA and TLP protein were determined by western blotting. (C) Cells were co-transfected with TFIIA $\alpha\beta$ siRNA (+) or control siRNA (-) and the indicated reporter plasmids. (C-a) Luciferase activities were determined for the upstream (up) and downstream (down) promoters; core, core region of the downstream promoter without a TATA-box in p21core/GL4 plasmid. (C-b) Effect of TFIIA knockdown was checked by western blotting.

concentration of TFIIA and that TFIIA-binding activity of TLP is involved in this process. Knockdown experiments revealed that the upstream promoter is much more dependent on TFIIA than is the downstream promoter (Fig. 3C-a). The effect of downregulation of TFIIA by short interfering RNA (siRNA) was evaluated by western blotting (Fig. 3C-b). We then investigated whether TFIIA-dependent activation of the upstream promoter occurs in p53-deficient cells. As shown in Fig. 4A, however, TFIIA did not activate the upstream promoter in p53-deficient cells. Moreover, the upstream promoter harboring a mutant p53RE did not respond to TFIIA in addition to TLP (Fig. 4B).

Recruitment of TFIIA to the upstream promoter of the endogenous *p21* gene

It has been reported that TFIIA can be recruited to some TATA-less promoters as well as TFIID-dependent TATA-containing promoters [26,27,30,31]. In this study, we demonstrated that TFIIA $\alpha\beta$ activates the upstream promoter additively with native TLP (Fig. 3A-b,c). We investigated whether TFIIA is associated with *p21* promoters. Although we detected chromatin-bound TFIIA in the upstream promoter region (p53RE) as well as the downstream promoter region (TATA-box) (Fig. 5B), the amount of TFIIA was larger for the downstream promoter (Fig. 5B-c), possibly due to TFIID-assisted recruitment. We performed TFIIA knockdown experiments to examine TFIIA function for *p21* gene regulation, and we found that the production of alt-a mRNA was dependent on the amount of TFIIA (Fig. 5C). The amount of p21 variant-1 (Fig. 5C) and the total amount of *p21* mRNA (data not shown) were also decreased in TFIIA-depressed cells.

Recruitment of TFIIA and TFIIA-reactive TLP to the upstream promoter in etoposide-treated cells

Previously, we demonstrated that p53 and TLP are recruited to the same region of the *p21* gene in etoposide-treated cells [14]. In this study, we confirmed that p53 (Fig. 6A) and TLP (Fig. 6D, lanes 1 and 2) were substantially recruited to the upstream promoters in cells treated with etoposide, which is one of the typical genotoxins. Figure 6B shows that large amounts of TFIIA bind to the upstream p53RE-containing region. Furthermore, we found that exogenous TLP but not N37E increased the amount of upstream promoter-bound TFIIA (Fig. 6C). These results indicate that TFIIA-binding ability of TLP is required for recruitment of TFIIA to the upstream promoter. We next determined how many mutant TLPs are recruited to the promoter in etoposide-treated cells. Exogenously expressed TLP and R55E clearly bound to the p53-responsive element (Fig. 6D, lanes 2 and 3). On the other hand, R52E and N37E showed decreased binding signals (lanes 4 and 5) although these proteins were substantially present in cells. A further chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay demonstrated that the amount of promoter-bound wild-type TLP was significantly increased by etoposide, whereas that of N37E did not change and was lower than TLP, even though amounts of N37E were higher than those of TLP in nuclei of control and etoposide-treated cells (Fig. 6E). Consequently, R52 and N37E, whose chromatin-binding results were overestimated (Fig. 6D,E), were demonstrated to have weakened promoter-binding abilities compared with wild-type TLP. We then examined the effect of etoposide on TLP–TFIIA interaction. A co-immunoprecipitation experiment revealed that TLP and TFIIA form an intracellular complex in etoposide-treated cells upon DNA damage (Fig. 6F).

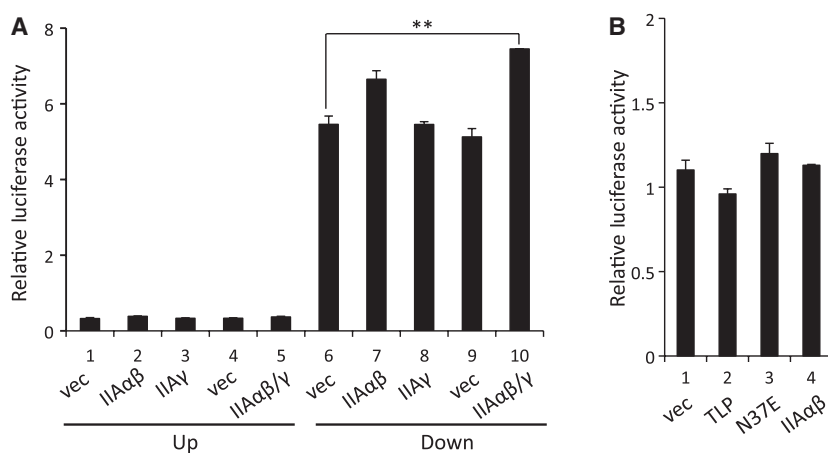
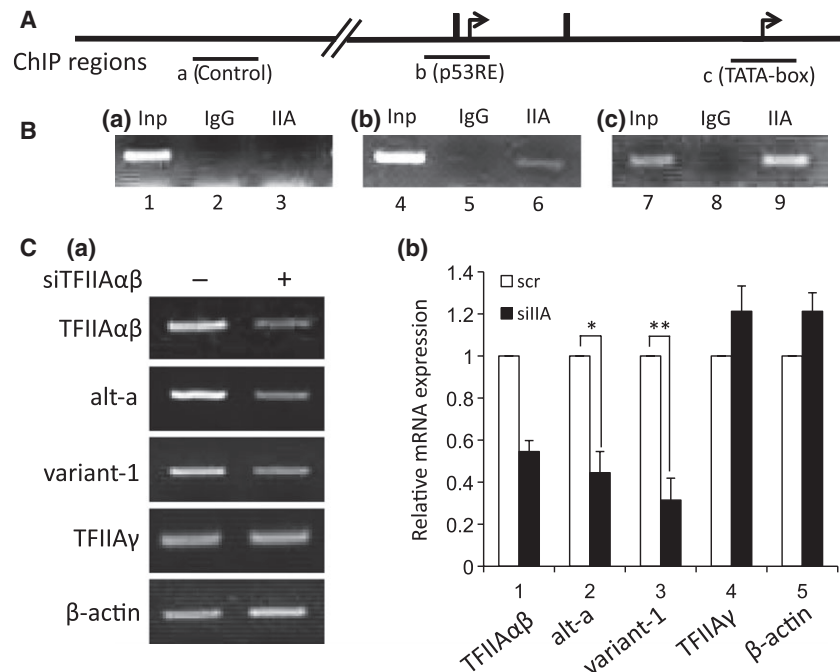


Fig. 4. p53-dependent promoter activation by TFIIA. Promoter activation function of TFIIA was examined in a p53-deficient condition. (A) Experiments similar to those for which results were shown in Fig. 3A-b, B were performed using *p53*^{-/-} HCT116 cells, and activities of upstream and downstream promoters were determined. (B) Cells were transfected with expression plasmids of TLP, N37E and TFIIA $\alpha\beta$ and the activity of the upstream promoter carrying a mutated p53 response element (p53RE) was determined.



The same result was obtained when exogenously expressed FH-TFIIA was examined (data not shown).

Lastly, we investigated whether activity of the upstream promoter is modulated by TLP in etoposide-treated cells. TLP knockdown resulted in a decrease in upstream promoter-driven mRNA production (Fig. 6G, left two columns). We found that the net quantity of knockdown-directed decreased mRNA production in etoposide-treated cells was twice as much as that obtained in normal cells (Fig. 6G, right two columns). We have confirmed that etoposide enhances transcription from the endogenous *p21* upstream promoter [14,23]. These situations suggest that etoposide-augmented promoter-recruited TLP, perhaps together with TFIIA, works for activated transcription from the *p21* upstream promoter.

Negative regulation of cell growth by TLP and TFIIA

In the above-described figures, we showed that TLP and TFIIA potentiate the upstream promoter of the *p21* gene and upregulate anti-mitotic p21 protein. We then examined how TLP and TFIIA affect the growth profile. Knockdown experiments demonstrated that reduction of endogenous TLP resulted in elevated proliferation for both normal (Fig. 7A-a) and p53-deficient cells (Fig. 7A-b). However, the rate of proliferation acceleration caused by depression of TLP was much higher for wild-type cells than in p53-deficient cells. Moreover, overexpression of N37E exhib-

ited a slight but significant growth-inhibitory effect compared with wild-type TLP (Fig. 7B). Knockdown of TFIIA also resulted in acceleration of the cell proliferation rate (Fig. 7C). We next examined the effects of TLP and TFIIA on the profile of etoposide-triggered cell death by knockdown experiments (Fig. 7D), and we found that both TLP (Fig. 7D-a) and TFIIA (Fig. 7D-b) accelerated cell death rate in a DNA-damaged condition. Since TLP and TFIIA play a negative role in cell growth and since association of the two factors is implicated from the results shown in Fig. 7B, these factors might modify the expression of growth- and apoptosis-related genes including *p21*.

Discussion

Previously, we demonstrated that TLP, which is one of the TBP family proteins, is involved in regulation of the upstream promoter [14]. The most attractive property of TLP is its stronger TFIIA-binding ability than that of TBP [29,30], although the functional significance of this property has not been elucidated. Bryant *et al.* [31] reported that mutant TBPs with decreased TFIIA-binding ability showed decreased transcription activation function *in vitro*. In this study, we demonstrated that Asn37 and Arg52 of TLP, which correspond to TFIIA-reactive Asn189 and Arg205 of TBP, respectively [31], are required for TFIIA binding in human cells (Fig. 1). N37E and R52E exhibited decreased transcriptional activation functions for the endogenous upstream promoter, while R55E, which

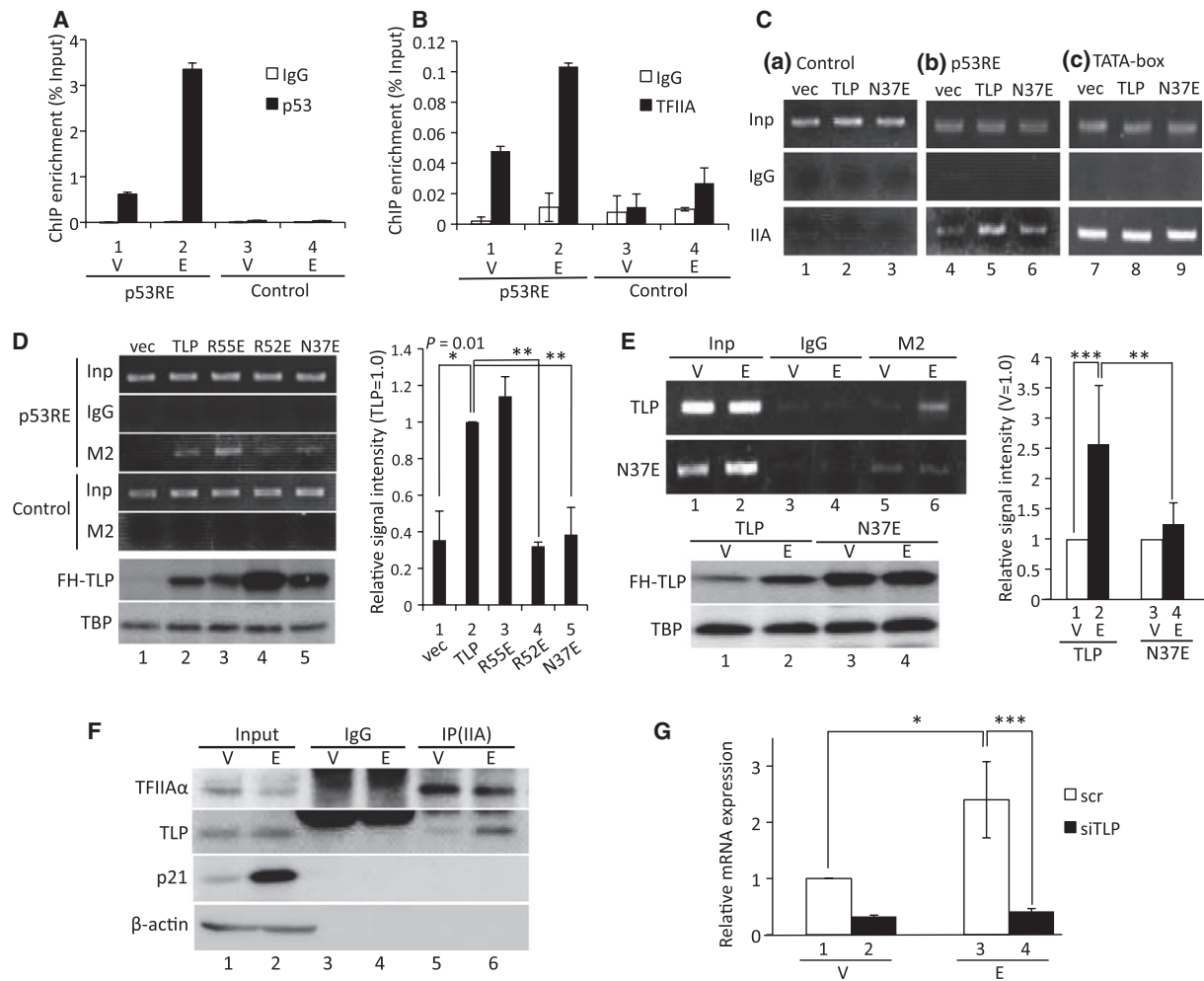


Fig. 6. Recruitment of TFIIA and TLP to the *p21* upstream promoter upon etoposide stress. Etoposide-induced recruitment of p53 (A) and TFIIA (B) to the upstream promoter. Normal HCT116 cells treated with etoposide were subjected to ChIP assay using specific antibodies. ChIP enrichment was determined by qPCR. (C) Amount of chromatin-bound endogenous TFIIA was determined by ChIP using α -TFIIA $\alpha\beta$ antibody. Cells transfected with an effector plasmid (TLP or N37E) and empty vector (vec) were treated with etoposide, and chromatin-bound TFIIA was detected for three regions as shown in Fig. 5A. (D) Binding of mutant TLPs to the upstream promoter of the endogenous *p21* gene. Cells into which FH-tagged wild-type and mutant TLP had been introduced were subjected to ChIP assay using α -FLAG M2 beads after etoposide treatment. Results are shown in the left panel. p53RE, an experimental p53RE-containing upstream promoter region; control, negative control region. Nuclear TBP and exogenous TLP proteins were determined by western blotting. We assigned the signal intensity of TLP (lane 2) as 1.0, and relative intensities of experimental ChIP signals are displayed as ratios to that of each TLP (right panel). (E) Amount of chromatin-bound TLP in etoposide-treated cells. Enrichment of chromatin-bound TLP or N37E at the upstream promoter region was determined. Cells treated with etoposide (E) or a solvent (V) were subjected to ChIP (left panel). Nuclear TBP and exogenous TLP proteins were determined by western blotting. Relative intensity of experimental ChIP signals (E/V for each TLP protein) is also shown (right panel). (F) Association of TFIIA and TLP in etoposide-treated cells. Cells treated with etoposide or a solvent were harvested and a co-immunoprecipitation assay was performed. Material immunoprecipitated with α -TFIIA $\alpha\beta$ antibody was detected for TLP. IP(IIA), immunoprecipitation with α -TFIIA $\alpha\beta$. (G) Requirement of TLP for etoposide-stimulated expression of the *p21* gene. HeLa cells transfected with TLP siRNA or control siRNA were exposed to etoposide. The level of *p21* was determined by RT-qPCR. We assigned the mRNA level of lane 1 as 1.0, and the relative mRNA level of each sample is shown.

has substantial TFIIA-binding capacity, exhibited native function (Fig. 2C). These mutant TLPs also exhibited decreased transcriptional activation function for the upstream promoter in an exogenous reporter plasmid (Fig. 2D). Consequently, TFIIA-binding abil-

ity of TLP is thought to be required for TLP-dependent transcriptional activation. Although R52E had binding ability to processed TFIIA (Fig. 1, lane 12), it exhibited little transcriptional function. Because unprocessed TFIIA has been reported to be transcriptionally

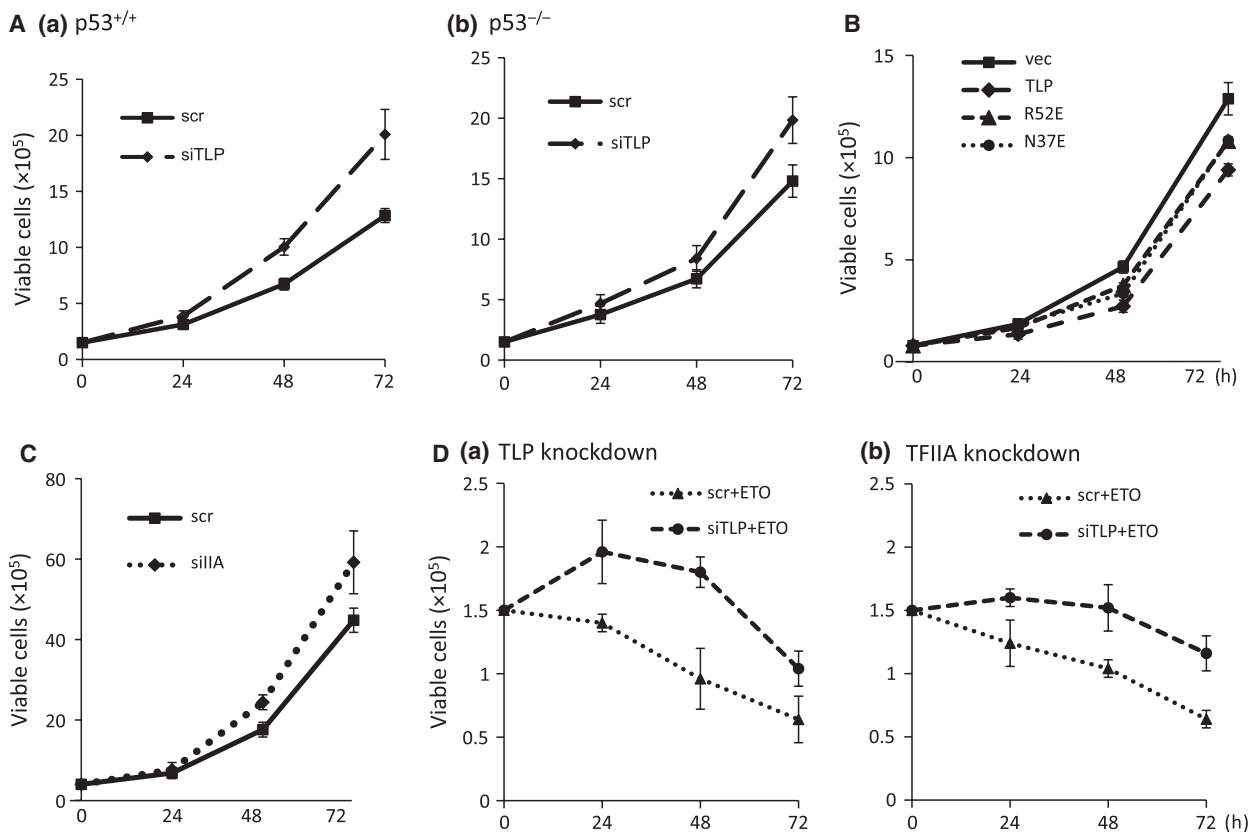


Fig. 7. Inhibitory effect of TLP and TFIIA on cell growth. HCT116 cells were treated with dimethylsulfoxide (A) or etoposide (D). (A) Normal (a) and *p53*^{-/-} cells (b) were transfected with TLP siRNA (siTLP) or control siRNA (scr). The cells were replated and cultured. Then cell numbers were counted at the indicated times. (B) Growth profile of TLP-overexpressing cells. Cells transfected with an effector plasmid expressing TLP or its mutants were replated and cell numbers were counted. (C) Growth profile of TFIIA $\alpha\beta$ knockdown cells. Cells were transfected with TFIIA $\alpha\beta$ siRNA (siIIA) or control siRNA (scr), and the growth profile was analyzed. (D) Knockdown of TLP (a) or TFIIA (b) of etoposide-treated cells. Cells transfected with siRNAs were cultured in an etoposide-containing medium and viable cells were counted at the indicated times.

active [28], it is possible that binding to unprocessed TFIIA is required for TLP function to activate *p21* upstream promoter.

TFIIA activates RNA polymerase II promoters via interaction with various transcription factors. As is generally known, TFIIA indirectly associates with the TATA-box promoter element via TBP [1–3,6]. Li *et al.* [24] showed that TFIID is recruited to the TATA-box of the *p21* downstream promoter and that p53 is associated indirectly with the TATA-box via TFIID. Indeed, abundant chromatin-bound TFIIA was detected at the downstream promoter (Fig. 5B). However, overexpressed TFIIA enhanced the endogenous downstream promoter only slightly (Fig. 3B). On the other hand, the upstream promoter was significantly activated by TFIIA (~3.0-fold) (Fig. 3A-a). Moreover, results shown in Fig. 3C and maybe Fig. 5C suggest that the upstream promoter requires a high concentration of intracellular TFIIA for its maximal activity. It has remained a ques-

tion for a long time why TFIIA is an essential factor for cell growth [32], despite the fact that it works just as a cofactor. We speculate that some essential TATA-less genes need TFIIA as well as TLP. Results shown in Fig. 3A-b also demonstrate an additive effect between TFIIA and TFIIA-interactive TLP but not mutant ones, suggesting a functional interaction of these two factors for the upstream promoter. As already stated, the human *p21* gene has two major promoters: a TATA-less upstream promoter and a TATA-containing downstream promoter [23,24]. Although the mechanism by which TFIIA exhibits different responses to the two promoters of the *p21* gene is not fully understood, the TATA-box element seems to be one of the determinants. Existence of multiple promoters of the *p21* gene might have an advantage to maximize the level of gene expression, which is governed by different sets of transcription factors, when cells are exposed to different kinds of stimuli and stresses.

It has been confirmed that the upstream promoter is basically driven by p53 [23]. Activity of the upstream promoter was almost inert in p53-deficient cells (Fig. 4A). Moreover, TLP does not exhibit a transcription activation function for the upstream promoter in p53-null cells. We found that the upstream promoter is upregulated by TFIIA and is dependent on TFIIA in addition to p53 and TLP (Figs 3 and 4). The results shown in Figs 5 and 6 demonstrate that these three transcription factors are recruited to the upstream promoter, and etoposide, which stimulates *p21* gene expression, increased this recruitment. *Drosophila* TLP works as a cofactor for DREF transcription factor of the *PCNA* gene [13]. Moreover, TFIIA can work as a co-activator of several activators [33–36] and binds to p53 [37]. We have observed intracellular binding of TLP and TFIIA [29]. Furthermore, we showed interaction between TLP and p53 [25]. We therefore speculate that TLP can form a triple complex with TFIIA and p53, and TLP and TFIIA coordinately function as a binary co-activator complex for p53 on the *p21* upstream promoter. The fact that the native, but not N37E, TLP stimulates the upstream promoter additively with TFIIA (Fig. 3A-b) supports this hypothesis.

In addition to p21, TLP and p53 are widely involved in growth repression and apoptosis of cells. The present study revealed that TFIIA is also associated with the function of TLP. The results presented in Fig. 7A show that TLP-mediated growth repression is dependent on p53. Since TLP with decreased TFIIA reactivity exhibited a weaker growth-inhibitory effect (Fig. 7B), some parts of TLP-mediated growth repression can be governed by at least TLP- and TFIIA-dependent transcription from the upstream promoter of the anti-mitotic *p21* gene. Furthermore, we observed that TLP and TFIIA are also involved in etoposide-mediated cell death (Fig. 7D). We believe that TLP and TFIIA contribute to this phenomenon through interaction with the *p21* upstream promoter.

Materials and methods

Cell culture, drug treatment and DNA transfection

Human HCT116 cells (wild-type and p53-deficient mutant cells) [27] and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified MEM with high glucose and low glucose respectively (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) at 37 °C in the presence of 10% fetal bovine serum. Cell numbers were counted by the trypan blue dye-exclusion method with a hemacytometer. Etoposide dissolved in dimethylsulfoxide was added to the medium to 30–50 μ M. Transfection of

nucleic acids was performed by using Lipofectamine and Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

Expression plasmids for mammalian cells

pCIneo-FH-TLP, which is an expression plasmid of flag/oligohistidine (FH) tagged mouse TLP, was described previously [14]. Mouse and human TLPs have an identical amino acid sequence. Plasmids for mutant TLPs (R55E, R52E and N37E) were described previously [29]. TFIIA expression plasmids, pCIneo-FH-TFIIA $\alpha\beta$ and pCIneo-FH-TFIIA γ , have an open reading frame of human TFIIA $\alpha\beta$ and TFIIA γ with an FH-tag at their amino termini.

Reporter plasmids for luciferase assay

pGL4.10 vector (Promega, Madison WI, USA) was used for construction of luciferase reporter plasmids. A reporter plasmid (designated p21up/GL4) containing a human *p21* promoter region encompassing from –2266 to –1875 was described previously [14]. The +1 position represents the transcription start site of the downstream promoter. In this study, we constructed two new luciferase reporter plasmids, p21down/GL4 and p21core/GL4, that contain a downstream promoter region from –168 to +66 and a short DNA stretch from –5 to +66 of the *p21* downstream promoter, respectively. These constructs were generated by a PCR-based strategy using a reporter plasmid encompassing from –2677 to +66, which has been named p21luc1 as previously described [14]. Primer sets to amplify DNA fragments from –168 to +66 and from –5 to +66 sequences were as follows: –168 to +66 forward, 5'-CTCGAGGGCCTGCTGGAAGCTCGGCCAG; –5 to +66 forward, 5'-CTCGAGGCGCCAGCTGAGGTGTGAGCA; and common reverse, 5'-AGATCTCGGCCAATCCGCGCCAGCT.

RNA interference

siRNAs were prepared by a Silencer siRNA Construction Kit (Ambion, Carlsbad, CA, USA). Sequences for target human TFIIA $\alpha\beta$ were 5'-GATGGGCAGGTGGAAGAAG (sense) and 5'-CTTCTTCCACCTGCCATC (antisense). The sequence for human TLP was described previously [14]. A scrambled sequence of a part of TFIIA $\alpha\beta$ was used as a control siRNA. Cells were transfected with 50–100 nm of siRNA and cultured for an appropriate period.

PCR

Total cellular RNAs were prepared using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), and RT-PCR was performed as described previously [38]. Amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Quantitative

determination of the PCR products (qPCR) was performed using a Thunderbird qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan) and 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All reactions were performed in triplicate. Primer sets to detect *p21* transcripts were as follows: total *p21* forward, 5'-GACACCACTGGAGGG TGACT; reverse, 5'-CCCTAGGCTGTGCTCACTTC; alt-a forward, 5'-GGTGGCTATTTTGTCCCTTG; reverse, 5'-AC AGGTCACATGGTCTTCC; variant-1 forward, 5'-CTGCC GAAGTCAGTTCCTTG; reverse, common to alt-a reverse.

Luciferase assay

Cells were inoculated into a 24-well plate (8×10^4 cells-well⁻¹). Twenty-four hours later, cells were transfected with the indicated amount of a reporter plasmid and an effector plasmid and cultured for 24 h. Total amounts of transfected DNA were adjusted with pRL-TK (Promega). Cells were disrupted with a Passive Lysis Buffer (Promega). Luciferase activity in lysates was determined by a Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Immunoprecipitation of intracellular proteins

Cell extracts were prepared as previously described [29]. Five hundred micrograms of the extract was used for immunoprecipitation. Endogenous proteins in extracts were mixed with a specific antibody and precipitated with protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience, Piscataway, NJ, USA). FH-proteins in extracts were precipitated by anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Normal rabbit IgG (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) and IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) were used as control antibodies. Bound proteins were eluted and analyzed by western blotting as described before [29].

Western blotting

Proteins were separated by SDS/PAGE, transferred to an Immobilon-P poly(vinylidene difluoride) membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) and detected by an ECL Prime (GE Healthcare Bioscience) as previously described [29] by using specific antibodies and appropriate horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies including anti(α)-rabbit IgG and α -mouse IgG. As primary antibodies, we used α -p53 antibody (Santa Cruz), α - β -actin antibody (Sigma-Aldrich) and antigen-purified α -TLP antibody and TFIIA $\alpha\beta$ antibody as described previously [29].

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cells transfected with plasmids were treated with 50 μ M etoposide for an appropriate time. After fixation of cells, ChIP assay was performed as described previously [14]. Endoge-

nous and exogenous FH-proteins were precipitated with a specific antibody and Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) and α -Flag M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich), respectively. Immunoprecipitated DNAs and control input DNAs were analyzed by semi-quantitative PCR or qPCR using *p21* promoter-specific primer sets. Primer sets for ChIP analysis were as follows: p53RE forward, 5'-CAC CTTTCACCATTCCCCTA; reverse, 5'-GCAGCCCAAGG ACAAATAG; TATA-box forward, 5'-TGCTGGAAC TCGGCCAGGCTCAGCTG; reverse, 5'-CCAGCTCCG GCTCCACAAGGAACTG; control forward, 5'-TGGTAG GCCTCTCCAAGGTA; reverse, 5'-ACACATGTGACTTG GGGTGA.

Statistical analysis

Data in this study are shown as mean \pm standard error of the mean obtained from at least three independent experiments. Statistical significance of quantitative data was determined using Bonferroni's method with R CONSOLE (ver. 3.0.3). The number of experiments used for statistical analysis was at least three ($n = 3$). $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical significance of differences between samples is shown in the figures with asterisks: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Acknowledgements

This work was supported by JSPS KAKENHI Grant number 254583. We thank all of the colleagues in the laboratory for valuable discussions.

Author contributions

HS, RM and TN performed experiments. HS and TT prepared the manuscript. TT organized and conducted the study.

References

- Jacobson RH & Tjian R (1996) Transcription factor IIA: a structure with multiple functions. *Science* **272**, 827–828.
- Thomas MC & Chiang CM (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 105–178.
- Høiby T, Zhou H, Mitsiou DJ & Stunnenberg HG (2007) A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochim Biophys Acta* **1769**, 429–436.
- Greenblatt J (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell* **66**, 1067–1070.
- Pugh BF & Tjian R (1992) Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J Biol Chem* **267**, 679–682.

- 6 Weideman CA, Netter RC, Benjamin LR, McAllister JJ, Schmiedekamp LA, Coleman RA & Pugh BF (1997) Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J Mol Biol* **271**, 61–75.
- 7 Ohbayashi T, Makino Y & Tamura TA (1999) Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the drosophila TBP-related factor. *Nucleic Acids Res* **27**, 750–755.
- 8 Berk AJ (2000) TBP-like factors come into focus. *Cell* **103**, 5–8.
- 9 Reina JH & Hernandez N (2007) On a roll for new TRF targets. *Genes Dev* **21**, 2855–2860.
- 10 Chong JA, Moran MM, Teichmann M, Kaczmarek JS, Roeder R & Clapham DE (2005) TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol Cell Biol* **25**, 2632–2643.
- 11 Tanaka Y, Nanba YA, Park KA, Mabuchi T, Suenaga Y, Shiraishi S, Shimada M, Nakadai T & Tamura TA (2007) Transcriptional repression of the mouse weel gene by TBP-related factor 2. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 21–28.
- 12 Suenaga Y, Ozaki T, Tanaka Y, Bu Y, Kamijo T, Tokuhisa T, Nakagawara A & Tamura TA (2009) TATA-binding protein (TBP)-like protein is engaged in etoposide-induced apoptosis through transcriptional activation of human TAp63 Gene. *J Biol Chem* **284**, 35433–35440.
- 13 Hochheimer A, Zhou S, Zheng S, Holmes MC & Tjian R (2002) TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* **420**, 439–445.
- 14 Suzuki H, Ito R, Ikeda K & Tamura TA (2012) TATA-binding protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of upstream promoter of p21Waf1/Cip1 gene. *J Biol Chem* **287**, 19792–19803.
- 15 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K & Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805–816.
- 16 Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R & Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701–704.
- 17 Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, Stivala LA & Prosperi E (2010) Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21 (CDKN1A) in the DNA damage response. *J Biol Chem* **704**, 12–20.
- 18 Gartel AL & Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* **246**, 280–289.
- 19 Jung YS, Qian Y & Chen X (2010) Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal* **22**, 1003–1012.
- 20 el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW & Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817–825.
- 21 Vousden KH (2002) Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **14**, 47–59.
- 22 Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594–604.
- 23 Radhakrishnan SK, Gierut J & Gartel AL (2006) Multiple alternate p21 transcripts are regulated by p53 in human cells. *Oncogene* **25**, 1812–1815.
- 24 Li AG, Piluso LG, Cai X, Gadd BJ, Ladurner AG & Liu X (2007) An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment. *Mol Cell* **28**, 408–421.
- 25 Maeda R, Suzuki H, Tanaka Y & Tamura TA (2014) Interaction between transactivation domain of p53 and middle part of TBP-like protein (TLP) is involved in TLP-stimulated and p53-activated transcription from the p21 upstream promoter. *PLoS One* **9**, e90190.
- 26 De Cesare D, Fimia GM, Brancorsini S, Parvinen M & Sassone-Corsi P (2003) Transcriptional control in male germ cells: general factor TFIIA participates in CREM-dependent gene activation. *Mol Endocrinol* **17**, 2554–2565.
- 27 Contreras-Levicoy J, Urbina F & Maldonado E (2008) *Schizosaccharomyces pombe* positive cofactor 4 stimulates basal transcription from TATA-containing and TATA-less promoters through mediator and transcription factor IIA. *FEBS J* **275**, 2873–2883.
- 28 Zhou H, Spicuglia S, Hsieh JJ, Mitsiou DJ, Høiby T, Veenstra GJ, Korsmeyer SJ & Stunnenberg HG (2006) Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol Cell Biol* **26**, 2728–2735.
- 29 Nakadai T, Shimada M, Shima D, Handa H & Tamura TA (2004) Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J Biol Chem* **279**, 7447–7455.
- 30 Teichmann M, Wang Z, Martinez E, Tjernberg A, Zhang D, Vollmer F, Chait BT & Roeder RG (1999) Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13720–13725.
- 31 Bryant GO, Martel LS, Burley SK & Berk AJ (1996) Radical mutations reveal TATA-box binding protein surfaces required for activated transcription *in vivo*. *Genes Dev* **10**, 2491–2504.
- 32 Ranish JA, Lane WS & Hahn S (1992) Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science* **255**, 1127–1129.
- 33 Ma D, Watanabe H, Mermelstein F, Admon A, Oguri K, Sun X, Wada T, Imai T, Shiroya T & Reinberg D (1993) Isolation of a cDNA encoding the largest subunit of TFIIA reveals functions important for activated transcription. *Genes Dev* **7**, 2246–2257.

- 34 Yokomori K, Zeidler MP, Chen JL, Verrijzer CP, Mlodzik M & Tjian R (1994) *Drosophila* TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev* **8**, 2313–2323.
- 35 Sun X, Ma D, Sheldon M, Yeung K & Reinberg D (1994) Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes Dev* **8**, 2336–2348.
- 36 Shykind BM, Kim J & Sharp PA (1995) Activation of the TFIID–TFIIA complex with HMG-2. *Genes Dev* **9**, 1354–1365.
- 37 Xing J, Sheppard HM, Corneille SI & Liu X (2001) p53 stimulates TFIID–TFIIA–promoter complex assembly, and p53–T antigen complex inhibits TATA binding protein–TATA interaction. *Mol Cell Biol* **21**, 3652–3661.
- 38 Jogo M, Shiraishi S & Tamura TA (2009) Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett* **583**, 2715–2719.

TBP-like protein (TLP) interferes with Taspase1-mediated processing of TFIIA and represses TATA box gene expression

Hidefumi Suzuki*, Momoko Isogai, Ryo Maeda, Kiyoe Ura and Taka-aki Tamura

Department of Biology, Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoicho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Received March 31, 2015; Revised May 15, 2015; Accepted May 20, 2015

ABSTRACT

TBP-TFIIA interaction is involved in the potentiation of TATA box-driven promoters. TFIIA activates transcription through stabilization of TATA box-bound TBP. The precursor of TFIIA is subjected to Taspase1-directed processing to generate α and β subunits. Although this processing has been assumed to be required for the promoter activation function of TFIIA, little is known about how the processing is regulated. In this study, we found that TBP-like protein (TLP), which has the highest affinity to TFIIA among known proteins, affects Taspase1-driven processing of TFIIA. TLP interfered with TFIIA processing *in vivo* and *in vitro*, and direct binding of TLP to TFIIA was essential for inhibition of the processing. We also showed that TATA box promoters are specifically potentiated by processed TFIIA. Processed TFIIA, but not unprocessed TFIIA, associated with the TATA box. In a TLP-knocked-down condition, not only the amounts of TATA box-bound TFIIA but also those of chromatin-bound TBP were significantly increased, resulting in the stimulation of TATA box-mediated gene expression. Consequently, we suggest that TLP works as a negative regulator of the TFIIA processing and represses TFIIA-governed and TATA-dependent gene expression through preventing TFIIA maturation.

INTRODUCTION

The assembly of the transcription initiation complex on a promoter region is a critical step in gene expression. The TATA box is a promoter-proximal regulatory element that is responsible for high transcription efficiency of RNA polymerase II (polII)-dependent genes (1,2). It is known that over 20% of polII-driven promoters have a TATA box (3). Recruitment of general transcription factors (GTFs) de-

termines the activity of TATA box-containing promoters (TATA promoters). TATA-binding protein (TBP), which is a main component of transcription factor IID (TFIID), recognizes and directly binds to the TATA box, and it recruits other GTFs to the promoter-proximal region (2,4–6). Transcription factor IIA (TFIIA) is another GTF and is known to be a binding partner of TBP (7–9). TFIIA enhances the transcription activity of TATA promoters through stabilization of binding of TBP to the TATA box. TFIIA directly binds to TBP and constitutes the core of the preinitiation complex with TFIIB. In addition, TFIIA has been reported to have an activator-like function (10,11), implying that transcription is regulated by TFIIA via various mechanisms. Otherwise, TFIIA is a biologically significant protein since it is essential for cell growth (12). However, compared with other GTFs, TFIIA has not been deeply investigated from mechanistic point of view in gene expression.

TFIIA consists of α , β and γ subunits (9). TFIIA α and β are encoded by single gene called TFIIA-L, which is referred to as TOA1 in budding yeast. The TFIIA $\alpha\beta$ precursor is processed by Taspase1 at the QVDG site (13), and processed TFIIA α and β assemble into a holo-TFIIA complex together with TFIIA γ ($\alpha/\beta + \gamma$). The holo-TFIIA complex has been thought to be a transcriptionally functional form of TFIIA. In the process of spermatogenesis, the TFIIA $\alpha\beta$ precursor is processed by Taspase1 along with development, and holo-TFIIA potentiates the expression of spermatogenic genes (14). In cultured HeLa cells, most of the TFIIA proteins exist as processed forms. On the other hand, it has been reported that the unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ precursor itself also has a transcription activation function. An abnormality in the development of a TFIIA-deficient *Xenopus* embryo was rescued by the introduction of un-cleavable TFIIA (13). It has also been reported that, unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ in P19 embryonic carcinoma cells forms a complex with TBP and TFIIA γ , which is referred to as TAC (TBP-TFIIA-containing) complex (15,16). Those reports suggest that processed and unprocessed TFIIAs each have a specific role in cell growth and development. The function of processed and unprocessed TFIIAs has there-

*To whom all correspondence should be addressed. Tel: +81 43 290 2884; Fax: +81 43 290 2824; Email: h.suzuki-0204@chiba-u.jp

fore been studied in specific biological conditions like embryonic development. Moreover, the mechanistic investigation for each form of TFIIA has been performed just by *in vitro* analyses. Eventually, the intrinsic and general significance of the processing in transcriptional regulation is remained to be elucidated. Therefore, studies in functional differences between processed and unprocessed TFIIA and the regulatory mechanism of TFIIA processing are to be carried out by using commonly used cells such as HeLa cells.

TBP-like protein (TLP) was identified as one of the TFIIA-binding proteins with the highest affinity (17,18). TLP, also known as TRF2, is a member of the TBP-family proteins (19–22). Amino acids of TBP for binding to TFIIA and TFIIB are conserved in TLP, even though TLP does not bind stably to the TATA box sequence. It has been reported that the affinity of TLP to TFIIA is one order higher than that of TBP (18). We previously found that interaction between TLP and TFIIA is required for activation of TATA-less promoters (23–25). TLP and TFIIA regulate cell proliferation through activation of the upstream promoter of the *p21* gene in a p53-dependent manner. A recent study has also shown that TLP is engaged in potentiation of several types of TATA-less promoters of *Drosophila* (26,27). Furthermore, in an *in vitro* assay system, TLP inhibits TATA box-driven transcription by competing with TBP for TFIIA association (28). However, the *in vivo* role of TLP in TATA box promoters remains unclear.

In this study, we examined the effect of TLP-TFIIA interaction on TATA promoters and found that TLP represses TATA box-driven gene expression *in vivo*. We propose as a new mechanism that TLP represses promoter activity by preventing Taspase1-mediated processing of TFIIA. We also found that the TFIIA $\alpha\beta$ itself is not involved in TATA box-mediated transcription activation and the processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor by Taspase1 is essential for full potentiation of TATA box promoters in cultured human cells. The role of TLP-TFIIA interaction is thought to be a critical determinant for expression of TATA box genes.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, transfection and drug treatment

Human HCT116 cells and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified MEM with high and low concentration of glucose, respectively (Sigma-Aldrich) at 37°C in the presence of 10% fetal calf serum. Knockdown experiments were performed as described previously (25). Lipofectamin2000 reagent (Invitrogen) was used for transfection of plasmids and siRNA. Cycloheximide (CHX) and MG132 dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to the media for some experiments.

Plasmids

Mammalian expression plasmids: expression plasmids for flag/oligohistidine-tagged (FH)-TLP, FH-N37E, FH-TFIIA-L, FH-TFIIA-S and FH-MyoD were described previously (25,29). pCIneo-FH-TBP has an open reading frame of human TBP with an FH-tag at each of its amino termini. DGAA mutant of TFIIA-L was generated

by a polymerase chain reaction (PCR)-based mutagenesis method from pCIneo-FH-TFIIA-L. Amino acids of the 274th aspartic acid and 275th glycine were substituted by alanine in the DGAA mutant.

Bacterial expression plasmids: open reading frames of *TBP*, *Taspase1*, *TFIIA $\alpha\beta$* and *TFIIA γ* were subcloned into a pET-3a vector (Novagen). An FH-tag was added to each of the amino terminal ends of the open reading frames of *TBP* and *Taspase1*, and oligohistidine (His)-tag was linked to that of *TFIIA γ* .

Reporter plasmids for luciferase assay: a pGL4.10 vector was used for construction of reporter plasmids. Promoter regions of human *p21* were amplified from human genomic DNA and cloned into a pGL4 vector by a standard PCR-based method. p21-168/GL4, p21-65/GL4 and p21-5/GL4 harbor distinct length of the p21 promoter as shown in Figure 2A(a). In the figure, +1 represents the transcription start site of a promoter gene. GAPDHWT/GL4, which carries a promoter region from -145 to +52 of the human *GAPDH* gene, was also generated as described above. GAPDHmutTATA/GL4, which is a mutant construct of GAPDHWT/GL4, has a disrupted TATA box sequence.

PCR

Preparation of total cellular RNAs and reverse transcription PCR (RT-PCR) and quantitative PCR (qPCR) were performed as previously described (25,30). Semi-quantitative PCR was performed using Paq5000 DNA polymerase, and amplified products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. All reactions were performed in triplicate. Primer sets to detect transcripts were as follows: β -actin forward, 5'-ACTGGGACGACATGGAGAAAA; reverse, 5'-GATAGCACAGCCTGGATAGCAA; GAPDH forward, 5'-GTCAAGGCTGAGAACGGGAA; reverse, 5'-AAATGAGCCCCAGCCTTCTC; c-Myc forward, 5'-CATCAGCACAACACTACGCAGC; reverse, 5'-GCTGGTGCATTTTCGGTTGT; α -tubulin forward, 5'-CTGGCTTACCTCACTCCTG; reverse, 5'-GAAGGCACAGTCTGAGTGCT; BRCA1 forward, 5'-GGTGGTACATGCACAGTTGC; reverse, 5'-ACTCTGGGGCTCTGTCTTCA; TLP forward, 5'-GGAAGATTGCTTTGGAAGGAGC; reverse, 5'-CCTGAGGACCAAATTGTAGCTG; INK4a forward, 5'-GAATAGTTACGGTCCGGAGGC; reverse, 5'-GTACCGTGCAGACATCGCGAT; LMNA forward, 5'-TCGCATCACCGAGTCTGAAG; reverse, 5'-ACTGAGTCAAGGGTCTTGCG; TBP forward, 5'-CTGGCCCATAGTGATCTTTGC; reverse, 5'-TCAATTCCTGGGTTATCTTACA; TFIIA-S forward, 5'-TTTGGGAAACAGTCTTCAGGA; reverse, 5'-CCATCACAGGCTACAATTTTCA; 14-3-3 σ forward, 5'-AGAGCGAAACCTGCTCTCAG; reverse, 5'-CTCCTTGATGAGGTGGCTGT; GADD45 forward, 5'-ACGAGGACGACGACAGAGAT; reverse, 5'-GCAGGATCCTTCCATTGAGA; p21alt-a forward, 5'-CTGTTTTTCAGGCGCCATGTC; reverse, 5'-GGTGGCTATTTTGTCTTGG

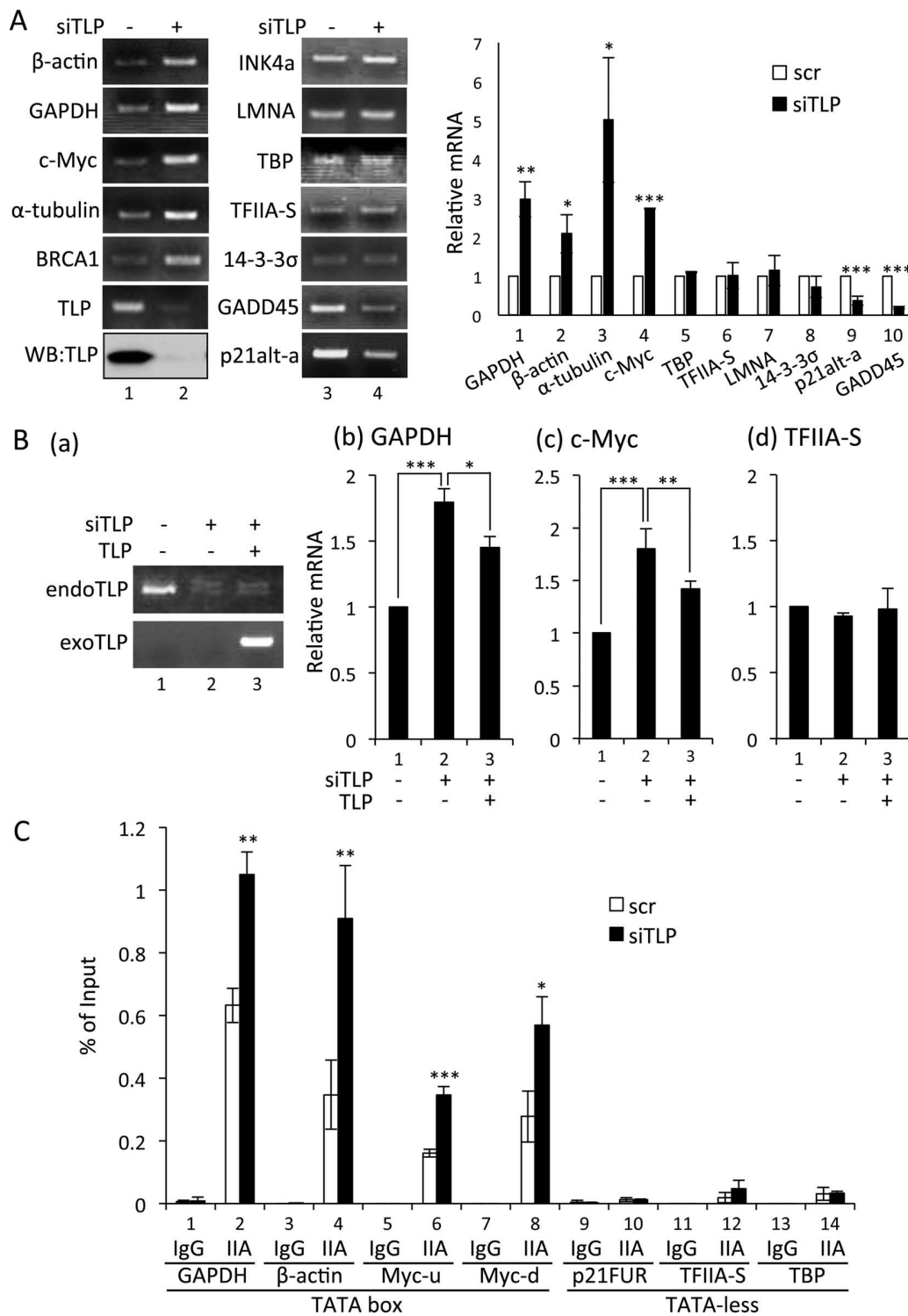


Figure 1. Negative function of TLP in endogenous gene expression. (A) Effect of TLP knockdown on endogenous gene expression of human cells. HeLa cells were transfected with TLP siRNA (siTLP) and control siRNA (scr), and amounts of mRNAs were determined by qRT-PCR. Relative amount of mRNA with siTLP (solid columns) to that with scr (open columns) for each of the genes is shown. Knockdown efficiency of TLP was checked by Western blotting (left panel). (B) Effect of exogenous expression of TLP on endogenous gene expression. HeLa cells were transfected with TLP siRNA together with a TLP expression plasmid. *TLP* mRNA was determined by semi-qRT-PCR (a). mRNAs of *GAPDH*, *c-Myc* and *TFIIA-S* were determined by qRT-PCR (b-d). (C) Amounts of chromatin-bound TFIIA. TLP-knocked-down HeLa cells were subjected to a ChIP assay using a TFIIA α -specific antibody. ChIP enrichment was determined by qPCR. IgG and IIA: IgG- and TFIIA-specific immunoprecipitates, respectively. Myc-u and Myc-d indicate upstream and downstream promoters of the *c-Myc* gene, respectively. p21FUR indicates the far-upstream region (-7018 to -6833) of the *p21* promoter used as a negative control.

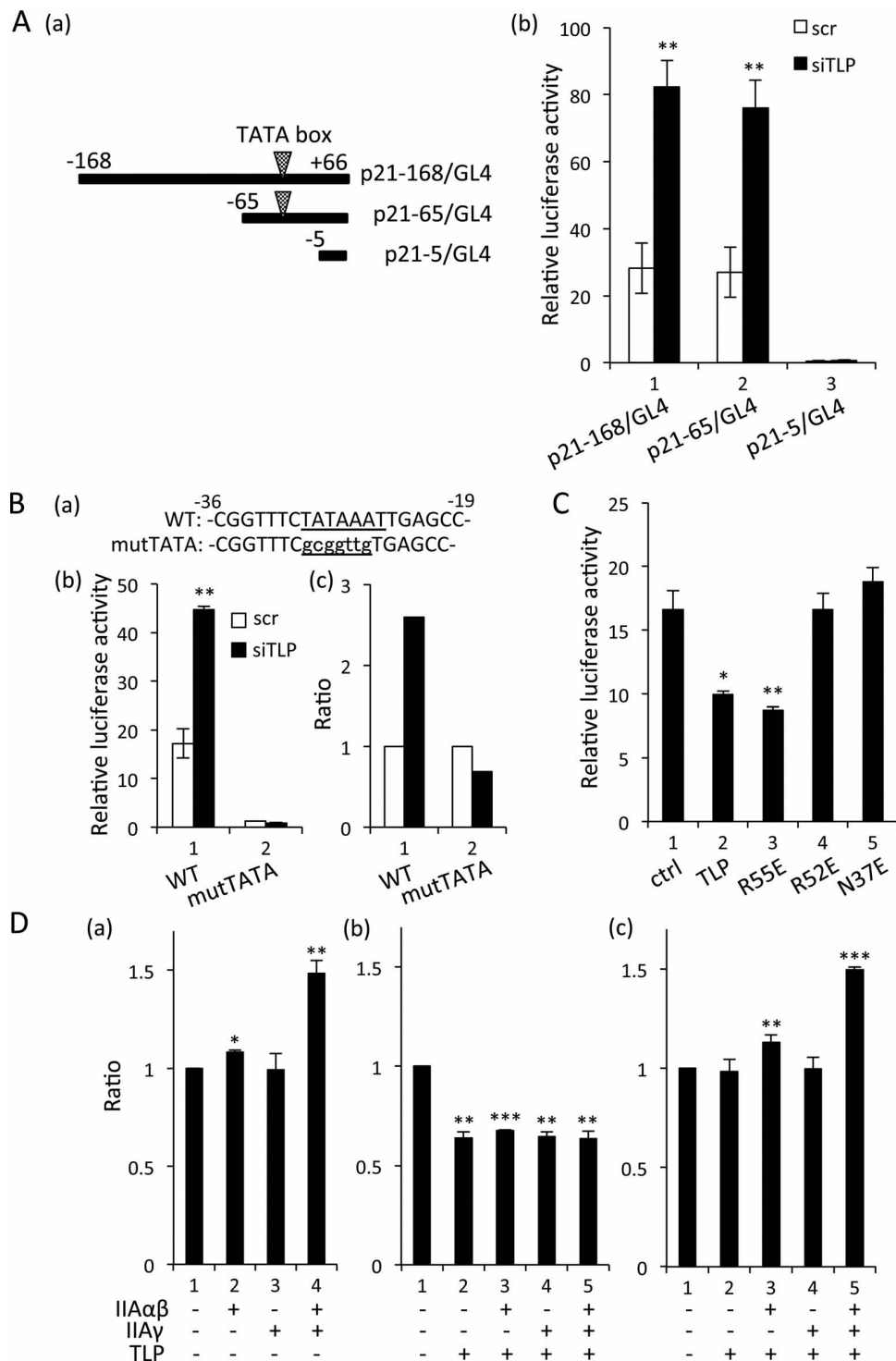


Figure 2. TLP-dependent repression of TATA promoters. (A) Luciferase reporter assay for TATA-containing human *p21* promoters. HeLa cells transfected with TLP siRNA together with the indicated *p21* promoter reporter were examined for relative luciferase activity. (a) Schematic representation of the promoter regions of the human *p21* gene inserted in p21-168/GL4, p21-65/GL4 and p21-5/GL4. Open arrowheads show the TATA box sequence. (b) Relative promoter activity was determined. (B) Luciferase reporter assay for TATA-containing human *GAPDH* promoter. Relative luciferase activity of the *GAPDH* promoter in TLP-knocked-down HeLa cells and the ratios were determined as described above. WT: wild-type TATA box-harboring *GAPDH* promoter. mutTATA: consensus TATA box sequence of the *GAPDH* promoter (TATAAAT) was mutated to gcggttg. (C) Effect of overexpressed TLP on *GAPDH* promoter activity. Wild-type TLP and its mutants R55E, R52E and N37E were introduced into HeLa cells together with a *GAPDH* promoter-containing reporter plasmid, and relative luciferase activity was determined. (D) Effect of co-expression of TLP and TFIIA on the *p21* promoter. HCT116 cells were transfected with TFIIA expression plasmids together with TLP (b) and N37E (c) expression plasmids, and the ratios of luciferase activity of p21-168/GL4 (vec = 1.0) are shown.

Luciferase reporter assay

A luciferase assay was performed as previously described (25). In a TLP-knocked-down condition, siRNA for TLP was introduced into cells 36 h before transfection of reporter and effector plasmids. Cells were transfected with the indicated amounts of reporter plasmids and cultured for 12–24 h. Then the cells were disrupted with a Passive Lysis Buffer (Promega). Luciferase activity in lysates was determined by a Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Amounts of transfected DNA were standardized with a control thymidine kinase promoter (Promega). In a single luciferase assay, luciferase activity was normalized with protein concentration of lysates determined by the BCA method.

Immunoprecipitation

Cell extracts were prepared as previously described (18). Three hundred micrograms of the extract was used for immunoprecipitation. Extracts were mixed with a specific antibody and precipitated with protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience). Exogenous FH-tagged proteins in extracts were precipitated with anti-Flag M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich). Normal rabbit IgG (Santa Cruz) and IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) were used as control antibodies. Bound proteins were eluted and detected by Western blotting as described before (18).

Western blotting

Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to an Immobilon-P PVDF membrane (Millipore), and detected by an ImmunoStar Zeta (Wako) by using specific antibodies and appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies including anti (α)-rabbit IgG and α -mouse IgG. The primary antibodies used included α -p53 antibody (Santa Cruz), α - β -actin antibody (Sigma-Aldrich), α -GAPDH antibody (Santa Cruz), α - α -tubulin antibody (Santa Cruz), α -p21 antibody (Santa Cruz) and α -FLAG M5 antibody (Sigma-Aldrich). Anti-TLP, α -TFIIA $\alpha\beta$, α -TFIIA γ , α -TBP and α -TFIIB antibodies were used as antigen-purified antibodies.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was performed by a previously described method (23). Briefly, cells were cross-linked with formaldehyde, followed by cell lysis and DNA-fragmentation by micrococcal nuclease. Endogenous proteins and exogenous FH-proteins were precipitated with a specific antibody using Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) and α -Flag M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich), respectively. Antigen-purified α -TFIIA $\alpha\beta$ antibody and commercial α -TBP antibody (Santa Cruz) were used for ChIP analyses. Immunoprecipitated DNAs were purified and analyzed by qPCR. Primer sets for ChIP analysis were as follows: β -actin forward, 5'-TCCTCAATCTCGCTCTCGCT; reverse, 5'-GCCGCTGGGTTTATAGGGC; GAPDH forward, 5'-CTCAAGACCTTGGGCTGGG; reverse, 5'-TCGAACAGGAGGAGCAGAGA; Myc-u

forward, 5'-GGCGTGGGGGAAAAGAAAAA; reverse, 5'-CGTCCAGACCCTCGCATTAT; Myc-d forward, 5'-GAGGCTTGGCGGGAAAAGA; reverse, CTCTGCCTCTCGCTGGAAT; IIA-S forward, 5'-CTTCCCTGACAAGGCTTGAGT; reverse, 5'-CAGAAGTCTGACGACCC; TBP forward, 5'-CTCAAGAGCTTCGCCCTC; reverse, 5'-AATGTCACCTCCGCCAGTT.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSA was conducted with purified recombinant proteins. Double-stranded DNA carrying a GAPDH TATA box sequence (sense: CGGTTTCTATAAATTGAGCC) was labeled with ^{32}P - γ -ATP as previously described (23), and 80 000 cpm of the DNA probe was used for each EMSA reaction. Fifty nanograms of TBP was mixed with 40 ng of TFIIA γ and 40 ng of processed or unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ in EMSA buffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 10% glycerol) and incubated at 37°C for 30 min to form TBP-TFIIA complex. Labeled probe DNA was then added to the mixture and incubated at 30°C for 45 min to form protein-DNA complex. Protein-DNA complexes were separated by 4% native PAGE and detected by autoradiography. If necessary, unlabeled probe DNA was added to the binding reaction as a competitor.

Purification of bacterially expressed proteins

FH-TBP, FH-Taspase1, TFIIA $\alpha\beta$ and His-TFIIA γ were transformed into BL21 (DE3) *E. coli*, and the recombinant proteins were induced by isopropyl-1-thio- β -D-galactoside. Cells were lysed with lysis buffer (500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1% Triton X-100, 10% glycerol, protease inhibitor mix [PI mix]). Proteins were purified from lysates using anti-Flag M2 Affinity Gel or Ni-NTA Agarose (QIAGEN). Although TFIIA $\alpha\beta$ has no appending tags, it binds to Ni-NTA due to an oligohistidine moiety in the central region of the polypeptide. Affinity carriers were washed three times with lysis buffer, and M2 and Ni-NTA-bound proteins were eluted with FLAG peptide and imidazole, respectively.

For preparation of processed TFIIA α and β subunits, 1 μg of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor was mixed with M2 Agarose-bound FH-Taspase1 in a reaction buffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 10% glycerol) and incubated at 37°C for 1 h. M2 Agarose-bound FH-Taspase1 was eliminated from the TFIIA solution by centrifugation centrifuge. Processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor was checked by SDS-PAGE and silver staining.

Cell fractionation

A method described by Xie *et al.* (31) was used for preparation of chromatin-free and chromatin-bound fractions. Cells were lysed with NETN100 buffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 20mM Tris-HCl [pH 7.5]), and the supernatant fraction was collected as the chromatin-free fraction. Chromatin pellets were washed twice with NETN100 buffer. The pellets were then suspended in

NETN420 buffer (420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 20mM Tris-HCl [pH 7.5]) and the supernatant material was collected as the chromatin-bound fraction.

Statistical analysis

Data obtained in this study are shown as means \pm standard error of means from at least three independent experiments. Statistical significance of quantitative data was determined by Bonferroni's method with R Console (ver.3.0.3). $P < 0.05$ was regarded as statistically significant. Statistical significance of differences between samples is shown in figures with asterisks such as *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$ and ***; $P < 0.001$.

RESULTS

Repression of TATA box genes by TLP

A subset of TATA-less promoters including *NF1*, *TAp63* and *p21* is potentiated by TLP through its recruitment to a promoter region (23–25,32,33). On the other hand, TLP is reported to have neither affinity to TATA box DNA nor a function for activation of TATA box-containing promoters (TATA promoters) (22). Indeed, chromatin-bound TLP was not detected in TATA promoters in our previous works. Rather, TLP was shown by *in vitro* analyses to repress TATA promoters (28,32). In this study, to elucidate the *in vivo* function of TLP in a TATA box, we first performed knock-down experiments to investigate effect of TLP on expression of endogenous genes. Knockdown of endogenous TLP increased mRNAs of TATA genes (*β -actin*, *GAPDH*, *c-Myc*, *α -tubulin* and *BRCA1*) (Figure 1A). In contrast, expression of TATA-less genes (*INK4a*, *LMNA*, *TBP*, *TFIIA-S*, *14-3-3 σ* , *GADD45* and *p21alt-a*) was not increased by TLP knockdown (Figure 1A). Rather, expression of *GADD45* and *p21alt-a* was decreased by TLP knockdown, suggesting that TLP potentiates a subset of TATA-less promoters. Additionally, expression of *GAPDH* and *c-Myc* was suppressed when TLP expression was recovered by introduction of a TLP expression plasmid (Figure 1B). These results demonstrate that TLP affects the expression of TATA genes.

We next examined the effect of TLP on the *in vivo* promoter-associating capacity of TFIIA. ChIP results confirmed that TFIIA was enriched in TATA promoters (Figure 1C). We found that TLP knockdown increased the amount of TATA box-bound TFIIA (Figure 1C). Considerable amounts of promoter-associating TFIIA were detected in TATA box-carrying *GAPDH*, *β -actin* and *c-Myc* promoters under a TLP-knocked-down condition (Figure 1C, lanes 1–8). The human *c-Myc* gene has two TATA promoters (34), and the amount of promoter-bound TFIIA was increased for both TATA elements (Figure 1C, lanes 5–8).

We further examined whether the TATA box sequence is critical for TLP-mediated repression of promoters. We performed a luciferase reporter assay using *p21* (*CDKN1A*) and *GAPDH* promoters. In a TLP-knocked-down condition, the TATA box-harboring *p21* promoter exhibited higher activity than that of the control one (Figure 2A). Similarly, the *GAPDH* promoter was significantly elevated by TLP knockdown, while mutation of a canonical TATA

sequence to a non-TATA sequence abolished the TLP sensitivity (Figure 2B), indicating that TLP affects promoter activity via the TATA box sequence. Consistent with the results described above, TLP overexpression downregulated the activities of TATA-containing *GAPDH* (Figure 2C) and *p21* promoters (data not shown). Additionally, we examined three TLP mutants R55E, R52E and N37E. While R55E has normal TFIIA binding ability, R52E and N37E have been shown to be defective just in TFIIA binding ability (18). TFIIA-reactive R55E exhibited a repression effect on TATA-promoters as the wild-type TLP did (Figure 2C, lanes 2 and 3). Notably, R52E and N37E, which do not interact with TFIIA, did not affect those promoter activities (Figure 2C, lanes 4 and 5), implying that TFIIA reactivity of TLP is required for repression of the TATA promoter by TLP. We then examined a synergistic effect of TLP and TFIIA on the TATA promoter. Exogenously expressed TFIIA potentiated the TATA promoter of *p21* (Figure 2D, panel a), and that promoter activation was suppressed by TLP overexpression (panel b), while the repression was not restored by N37E (panel c). These results suggested that, although endogenous TLP does not associate with the TATA promoter, it represses TATA-containing genes through inhibition of TFIIA activity needed for TATA promoters.

Inhibition of TFIIA maturation by TLP

We next focused on the mechanism of TLP-mediated repression of TFIIA activity. Since the TFIIA $\alpha\beta$ precursor is processed into mature α and β subunits by Taspase1 (13), the processing is a key step for intracellular TFIIA activity. To investigate the effects of TLP on TFIIA processing, we performed overexpression and knockdown experiments. The TFIIA $\alpha\beta$ precursor has been reported to be rapidly processed into matured subunits in cells (35). Indeed, we found that the half-life of intracellular TFIIA $\alpha\beta$ was less than 30 min. However, the amount of TFIIA $\alpha\beta$ significantly increased in a TLP-overexpressed condition, and the half-life was prolonged to over 1 h (Figure 3A, lanes 5–8). Stabilization of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor was not observed for the N37E mutant (lanes 13–16). In turn, TLP knockdown resulted in destabilization of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor (Figure 3B). To demonstrate the inhibitory effect of TLP on nascent TFIIA protein, we examined the processing efficiency of TFIIA $\alpha\beta$ by using exogenously expressed TFIIA. The exogenous TFIIA $\alpha\beta$ precursor was processed into each subunit like the endogenous one (Figure 3C, lane 2). As expected, TLP, but not N37E, decreased the processing rate for exogenous TFIIA $\alpha\beta$ (Figure 3C). Moreover, the protein level of DGAA mutant TFIIA, which is not processed by Taspase1, was not affected by TLP overexpression (Figure 3D). The amount of TFIIA transcript was not affected by TLP (Figure 3E). These results suggest that processing of TFIIA $\alpha\beta$ precursor is inhibited by TLP.

We showed that the TFIIA $\alpha\beta$ precursor was not degraded by the ubiquitin-proteasome system (Figure 4A). We further checked whether reduction of the precursor was due to Taspase1 (Figure 4B). We examined the inhibitory effect of TLP on *in vivo* processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor using purified recombinant proteins. Although the precursor of recombinant TFIIA $\alpha\beta$ was sufficiently pro-

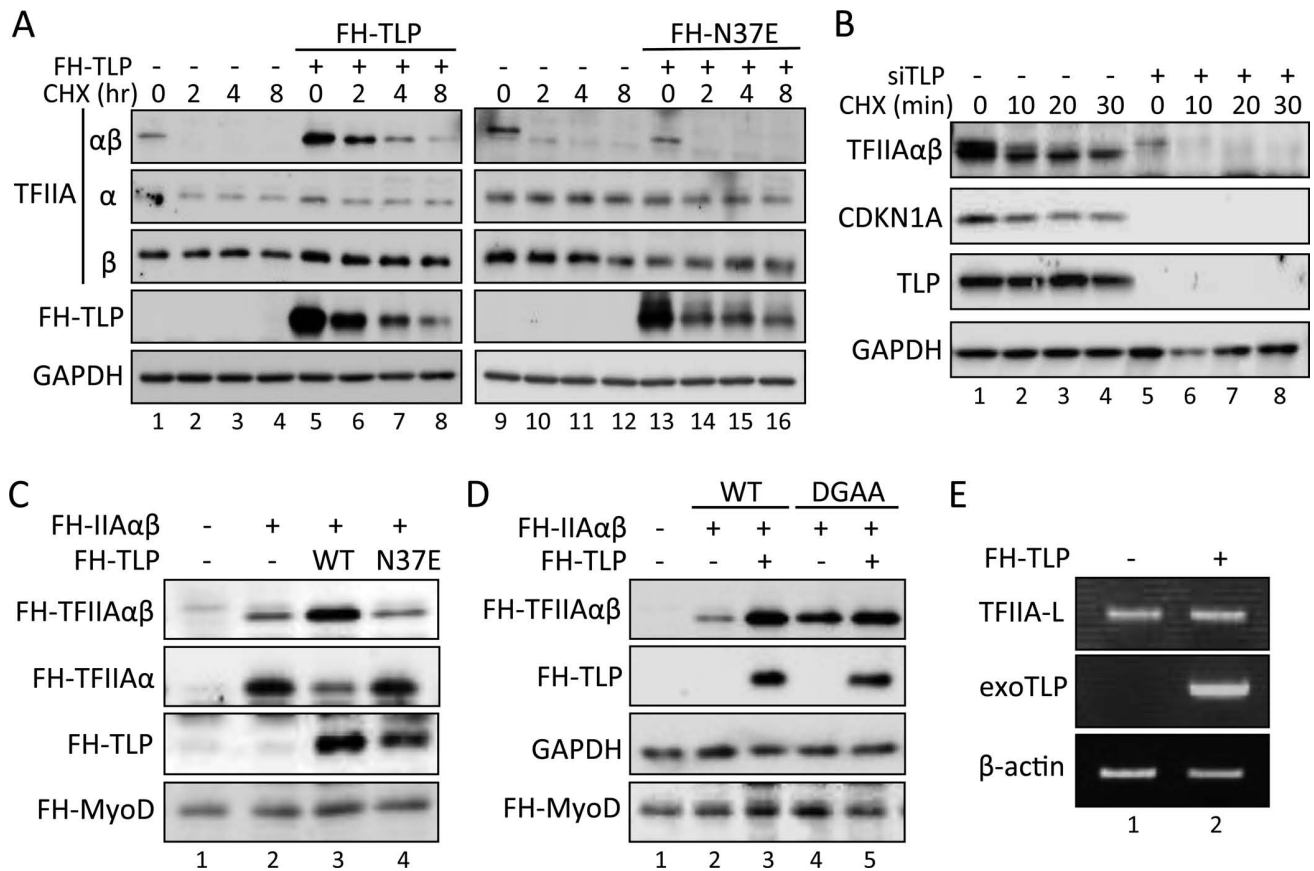


Figure 3. Inhibitory effect of TLP on the processing of TFIIA $\alpha\beta$. TFIIA $\alpha\beta$ protein was determined by Western blotting. (A) Effect of overexpressed TLP on intracellular TFIIA $\alpha\beta$ protein. TLP- and N37E-introduced HCT116 cells were treated with CHX for the indicated time, and the amount of endogenous TFIIA protein was determined. (B) Effect of TLP knockdown on TFIIA $\alpha\beta$ precursor. The amount of endogenous TFIIA $\alpha\beta$ precursor in TLP-knocked-down HeLa cells was assayed as described above. (C) Effect of TLP on TFIIA $\alpha\beta$ processing. HeLa cells were transfected with expression plasmids for FH-TLP and FH-N37E together with FH-TFIIA $\alpha\beta$, and the TFIIA $\alpha\beta$ precursor and generating α subunit were detected. (D) Effect of TLP on the uncleavable DGAA mutant. HeLa cells were transfected with expression plasmids of FH-TFIIA and FH-DGAA mutant together with TLP, and the amount of the FH-TFIIA $\alpha\beta$ precursor was determined. FH-MyoD introduced into cells was used as an electrophoresis loading standard. (E) RT-PCR for detection of *TFIIA-L* transcripts. TLP-overexpressed HCT116 cells were assayed for *TFIIA-L* transcripts by RT-PCR using specific primers.

cessed into α and β subunits by recombinant Taspase1 (Figure 4C), supplementation of TLP protein clearly prevented the processing of TFIIA $\alpha\beta$ in a TLP-dose dependent manner, while the Δ IIA mutant of TLP, which has no affinity to TFIIA, did not affect the processing efficiency (Figure 4D). Taken together, the results showed that TLP inhibits Taspase1-driven processing of TFIIA $\alpha\beta$. Since TFIIA-binding ability-deficient TLP mutants did not affect the processing rate of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor, direct binding of TLP to TFIIA $\alpha\beta$ was suggested to be critical for prevention of the processing.

TATA promoter activation by processed TFIIA $\alpha\beta$

Since TLP repressed TATA-containing genes and inhibited processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor, we speculated that TLP negatively regulates TATA genes through inhibiting TFIIA $\alpha\beta$ processing. However, it has remained ambiguous how the processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor functions in potentiation of TATA promoters.

To clarify the significance of TFIIA $\alpha\beta$ processing for promoter regulation, we performed an EMSA to exam-

ine the TATA box-association potential of processed and unprocessed forms of TFIIA $\alpha\beta$. First, we confirmed that purified recombinant TFIIA $\alpha\beta$ was processed by Taspase1, whereas the DGAA mutant was not affected (Figure 5A). Although TBP alone did not stably bind to the TATA box, addition of TFIIA generated a higher protein (TBP-TFIIA)-DNA complex (Figure 5B). Unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ and processed TFIIA $\alpha\beta$ generated two specific complexes. The combination of TBP, TFIIA γ and unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ or DGAA mutant generated a faster migrating complex (lower complex) (Figure 5B(a), lanes 3, 5 and 6). On the other hand, processed TFIIA $\alpha\beta$ generated a slower migrating complex (upper complex) together with TBP and TFIIA γ (Figure 5B(a), lane 4). Since combinations of TBP and TFIIA $\alpha\beta$, or TBP and TFIIA γ did not generate stable protein-DNA complex (Figure 5B(b)), both TFIIA $\alpha\beta$ and TFIIA γ were suggested to be required for formation of TBP-based protein-DNA complex. A competition assay revealed that these complexes were specific for the TATA box sequence (Figure 5C). We further performed a super-shift assay using specific antibodies to clarify the

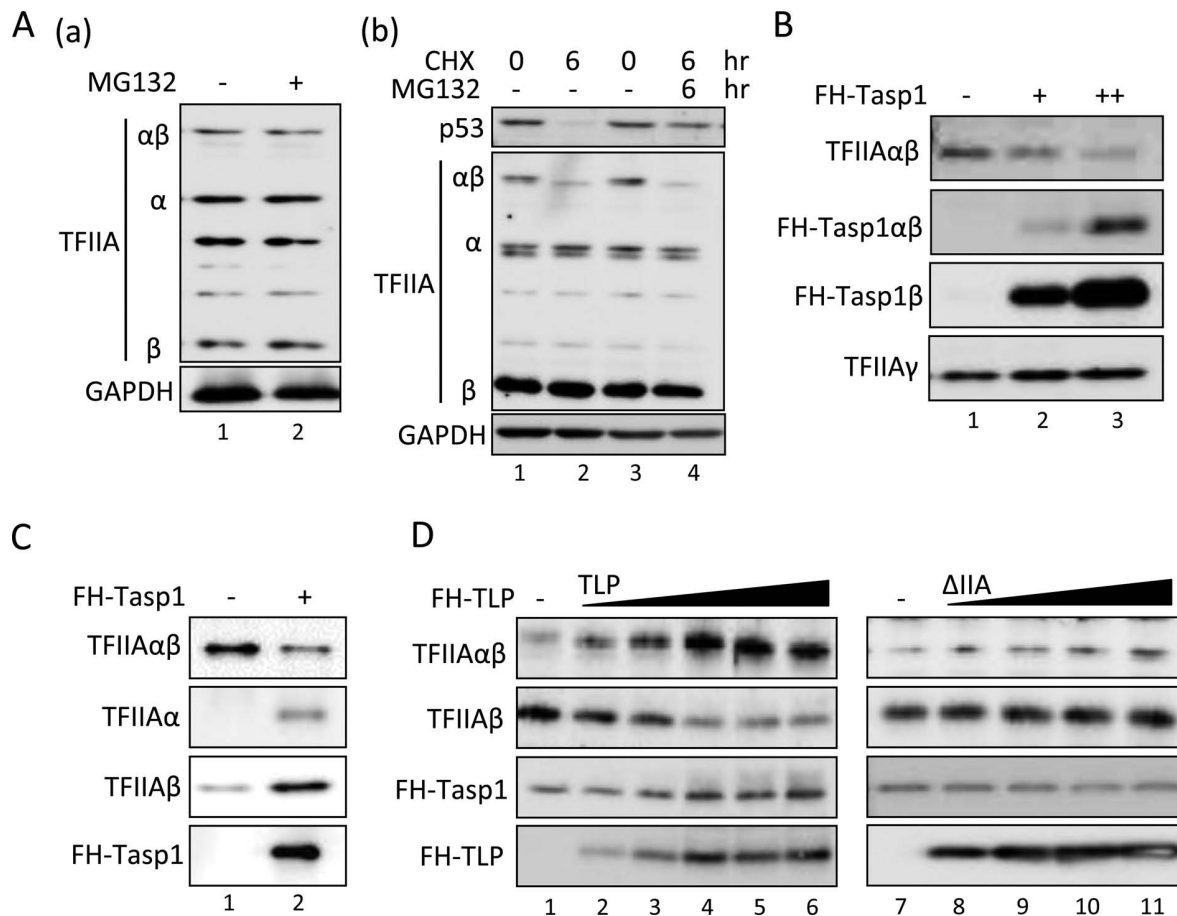


Figure 4. Inhibition of Taspae1-mediated processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor by TLP. (A) Effect of MG132 on TFIIA proteins. HCT116 cells were treated with MG132 and CHX for the indicated time, and the amount of TFIIA protein was determined. (B) Effect of overexpressed Taspase1 on the endogenous TFIIA $\alpha\beta$ precursor. HCT116 cells were transfected with expression plasmids of FH-Taspase1, and the amount of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor was determined. (C) Taspase1-mediated processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor *in vitro*. Five nanograms of purified recombinant TFIIA $\alpha\beta$ was mixed with 20 ng of purified recombinant FH-Taspase1 and incubated at 37°C for 1.5 h, and proteins were detected by Western blotting. Effect of TLP on Taspase1-mediated processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor *in vitro*. Twelve nanograms of TFIIA $\alpha\beta$ and 6 ng of TFIIA γ were incubated with 50 to 200 ng of TLP or Δ IIA mutant protein at 37°C for 1 h. Fifty nanograms of FH-Taspase1 was then added to the mixture and incubated for 1.5 h.

characteristic of these complexes. It was confirmed that both complexes contain TBP because these shifted bands reacted with a TBP-specific antibody (Figure 5D, lanes 2 and 5). However, these shifted bands exhibited different reaction to a TFIIA-specific antibody (Figure 5D, lanes 3 and 6). Because the lower complex did not react to TFIIA antibody, it was suggested that TFIIA $\alpha\beta$ was not included in the lower complex, whereas processed form of TFIIA $\alpha\beta$ was included in the upper complex. These EMSA results show that the processing step of TFIIA $\alpha\beta$ is required for stable association of TFIIA with the TATA box.

We performed ChIP analyses to determine whether the processing of TFIIA $\alpha\beta$ is critical for its *in vivo* association with TATA promoters. Exogenously expressed TFIIA $\alpha\beta$ was processed into the subunits (Figure 6A(a)). Processed TFIIA proteins were detected at the TATA promoter of the endogenous *GAPDH* gene, while the DGAA mutant was not detected at the promoter (Figure 6A(b)). Analysis of the promoter activation function of TFIIA showed that unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ is almost inert for the TATA-

containing promoter (Figure 6B). To investigate the mechanism to achieve transcriptional activation by processed and unprocessed TFIIA $\alpha\beta$, we examined the interaction of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor (DGAA) with TFIIA γ . Although the TFIIA $\alpha\beta$ precursor and processed TFIIA exhibited similar affinity to TLP, the TFIIA $\alpha\beta$ precursor exhibited lower affinity to TFIIA γ (Figure 6C). The function assay revealed that TFIIA γ is required for TFIIA $\alpha\beta$ -mediated potentiation of the TATA promoter. A dose-responsive effect of TFIIA γ on TFIIA $\alpha\beta$ -mediated TATA promoter activation was observed (Figure 6D). The TFIIA γ subunit is thus thought to be required for potentiation of TATA promoters. Indeed, the EMSA showed that stable protein-DNA complexes were not generated in the absence of TFIIA γ (Figure 5B(b)). Consequently, it was clarified that processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor is required for its association with the TATA box and TFIIA γ -dependent potentiation of target promoters. Therefore, inhibition of TFIIA $\alpha\beta$ processing by TLP is responsible for depression of TATA genes.

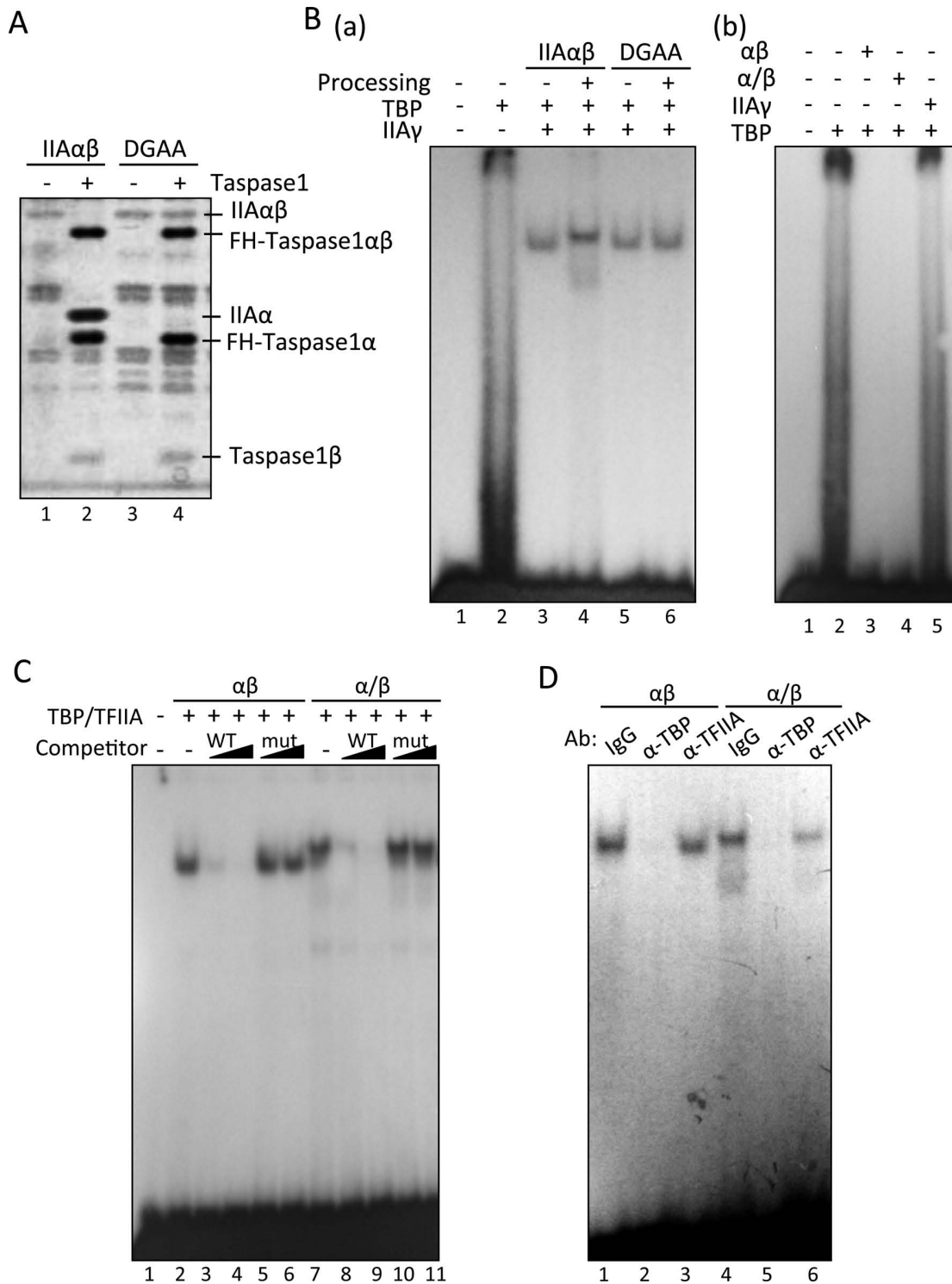


Figure 5. EMSA to detect the association of TFIIA with TATA the box. **(A)** *in vitro* processing of recombinant TFIIAαβ precursor protein. Twenty nanograms of purified recombinant TFIIAαβ and DGAA expressed in *E. coli* were mixed with 70 ng of purified recombinant FH-Taspase1 and incubated at 37°C for 1 h. Proteins were separated by SDS-PAGE and detected by silver staining. **(B–D)** EMSA of TFIIA and TBP to detect TATA box binding of the *GAPDH* promoter. Purified TFIIAαβ, His-TFIIAγ and FH-TBP were used. Panel B: (a) processed TFIIAαβ (indicated as Processing +, same with αβ of panel b) and unprocessed TFIIAαβ (indicated as Processing -, same with α/β of panel b) were used for EMSA. Processing: purified recombinant TFIIAαβ and DGAA were incubated with FH-Taspase1, and TFIIA proteins were purified. (b) Indicated combinations of purified proteins were used for EMSA. Panel C: cold probe DNA (WT) and its mutant (mut) were used as competitors in EMSA binding reactions. Sequences of wild-type and mutant competitors were 5'-CGGTTTCTATAAATTGAGCC and 5'-CGGTTTCCAGTAACTGAGCC, respectively. Panel D: specific antibodies against TBP, TFIIAαβ and control IgG were included in the EMSA. αβ and α/β indicate unprocessed and processed TFIIAαβ, respectively.

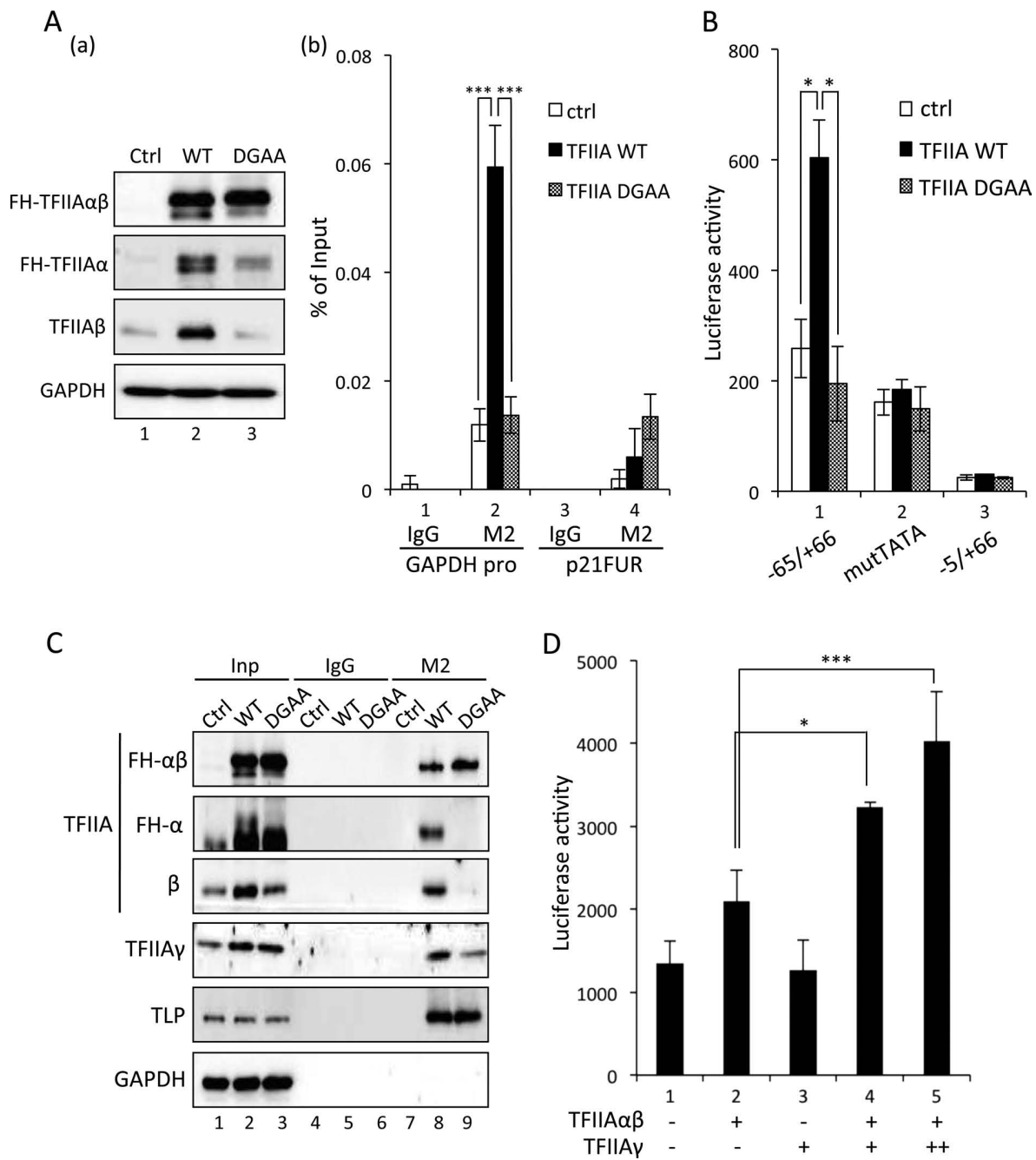


Figure 6. *In vivo* function of mature TFIIA α and TFIIA β . (A) Chromatin binding of TFIIA $\alpha\beta$. Wild-type FH-TFIIA $\alpha\beta$ (WT) and FH-DGAA (DGAA) were introduced into HeLa cells. Processing of wild-type TFIIA $\alpha\beta$ was checked by Western blotting (a). Amounts of chromatin-bound exogenous FH-TFIIA $\alpha\beta$ and FH-DGAA were determined by CHIP using M2 Agarose beads. CHIP enrichment at the TATA box-containing *GAPDH* promoter (*GAPDH* pro) and control DNA region (p21FUR) was determined by qPCR (b). Ctrl indicates control. (B) Activation of TATA promoter. Wild-type FH-TFIIA $\alpha\beta$ and FH-DGAA were introduced into HeLa cells together with indicated *p21* reporter constructs, and the luciferase activity was determined. (C) Affinity of TFIIA $\alpha\beta$ to its interacting proteins. Exogenously expressed FH-TFIIA $\alpha\beta$ and FH-DGAA were immunoprecipitated with M2 Agarose beads, and co-precipitated TLP and TFIIA γ were detected. Inp: input. (D) A dose-responsive effect of TFIIA γ on TATA promoter activation. Indicated combinations of TFIIAs were introduced into HCT116 cells together with p21-65/GL4 reporter plasmid, and luciferase activity was determined. For dose-dependent analysis, 100 ng (+) or 200 ng (++) of TFIIA γ expression plasmid was used.

Prevention of chromatin binding of TBP by TLP

TBP is essential for potentiation of TATA promoters, and TFIIA supports TBP function through stabilization of the TBP-DNA association (9). Since TLP repressed TFIIA activity, it is speculated that TBP-DNA binding is affected by TLP. To confirm this hypothesis, we examined the amount of chromatin-bound TBP by cell fractionation and ChIP techniques. As expected, the amount of chromatin-bound TBP was markedly increased in a TLP-knocked-down condition (Figure 7A). Moreover, ChIP results showed that chromatin-bound TBP was specifically increased in the core promoter region (Figure 7B). This TLP-knockdown-dependent increase in TBP-chromatin binding was correlated with the increase in expression levels of TATA genes (Figure 1A). These results suggest that TLP works as a negative factor for TBP-driven transcription through inhibiting TFIIA function.

DISCUSSION

Repression of TATA genes by TLP

Since TLP is one of the TBP-family proteins, the role of TLP in transcription regulation has been studied (21,22). The most attractive characteristic of TLP is the highest affinity to TFIIA (17,18). In the transcription regulation of TATA-less promoters, several direct regulatory mechanisms of TLP have been shown over the past decade. We previously demonstrated that TATA-less promoters including *cyclinG2*, *TAp63* and *p21* need TLP-TFIIA interaction for transcription activation (23–25,33,36). Other groups demonstrated that several TATA-less promoters are also governed by TLP (e.g. TCT- and DPE-driven promoters and promoters of the histone gene cluster of *Drosophila*) (26,27). On the other hand, the mechanism by which TATA genes are affected by the TLP-TFIIA interaction *in vivo* has remained unclear. In this study, we showed that the TLP-TFIIA interaction has a negative effect on TATA genes (Figures 1 and 2). We found a novel mechanism that TLP inhibits TATA genes expression through preventing TFIIA maturation (Figures 3 and 4). Since 24% of the core promoters of human genes have a typical TATA box or TATA-like element (3), TLP may widely affect the expression of TATA genes as a global regulator.

TLP behaves as an inhibitor of TFIIA processing

Sequence-specific cleavage of proteins is critical for regulation of cellular functions such as cell death, homeostasis and cell-cycle progression (37–39). TFIIA $\alpha\beta$ has been demonstrated to be subjected to Taspase1-mediated proteolytic processing for production of mature TFIIA α and TFIIA β (13). Although the processing of TFIIA $\alpha\beta$ is known to be critical in spermatogenesis and head morphogenesis (14,40), the regulation mechanism of TFIIA $\alpha\beta$ processing has remained unknown. We found that TLP functions as an inhibitor of TFIIA $\alpha\beta$ processing (Figures 3 and 4). TLP has a specific and critical function for TFIIA $\alpha\beta$ through its strong affinity to TFIIA. Results of this study suggest that direct binding of TLP to TFIIA $\alpha\beta$ is required for inhibition of TFIIA $\alpha\beta$ processing (Figures 3 and 4D).

Although the amino acid sequence of TBP is 40% similar to that of TLP (19,28), TBP never inhibits the processing *in vivo* (data not shown). Our previous works have further shown that TLP has one-order higher affinity to TFIIA than TBP does (18). The high degree of stability of the TLP-TFIIA complex ensures the prevention of Taspase1-mediated processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor. These observations suggest that TLP is not just a TBP alternative with inadequate ability but is a unique factor with a function distinct from that of TBP.

TFIIA $\alpha\beta$ processing is required for activation of the TATA promoter

Although the transcription activation function of TFIIA has been studied in yeast, yeast TFIIA $\alpha\beta$ (TOA1) does not undergo proteolytic processing (13). On the other hand, the significance of Taspase1-mediated TFIIA $\alpha\beta$ processing in human cells has not been elucidated. Although, from results of previous *in vitro* analyses, the Taspase1-mediated processing has been thought to be essential step for the TATA promoter activation (9), several studies demonstrated that the unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ has transcriptional activity (15,16,40). To demonstrate functional differences between each form of TFIIA clearly, we examined TFIIA function in conventionally used cultured cells. Finally, we showed that the processing of TFIIA is required for activation of TATA genes in human HeLa cells and HCT116 cells (Figure 6), and the unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ is inactive in transcription activation, which is explained below. We demonstrated that there are essential functional differences between processed and unprocessed forms of TFIIA $\alpha\beta$. Only processed TFIIA $\alpha\beta$ is associated with the TATA box together with TBP and TFIIA γ (Figures 5 and 6). Moreover, processed TFIIA $\alpha\beta$ has transcription activation function specifically for TATA promoters (Figure 6B). TFIIA γ is required for holo-TFIIA function (41), and the present study revealed that TFIIA γ is needed for both the TATA box associating ability and promoter activation function of processed TFIIA $\alpha\beta$ (Figures 5B and 6D). In agreement with the promoter activation ability of processed TFIIA $\alpha\beta$, processed TFIIA $\alpha\beta$ exhibited higher affinity to TFIIA γ than did its unprocessed form (Figure 6C). This considerable affinity is presumably needed for the TATA box-activation function of processed TFIIA $\alpha\beta$. Thus, the Taspase1-mediated processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor is required for acquiring both TATA box association ability and promoter activation function. Since processed TFIIA $\alpha\beta$ can associate with the TATA box in the presence of TBP and TFIIA γ (Figure 5B), processed TFIIA $\alpha\beta$ is likely to function as a co-activator of TBP together with TFIIA γ . Since the unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ does not exhibit such ability, this co-activator function is thought to be one of the mature TFIIA $\alpha\beta$ -specific identities.

Unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ can facilitate TBP-TATA box binding but is inactive in transcription activation

TBP alone does not exhibit high affinity to the TATA box (3). This is probably because TBP is a sticky protein and tends to form functionally inactive homo-dimers (42,43).

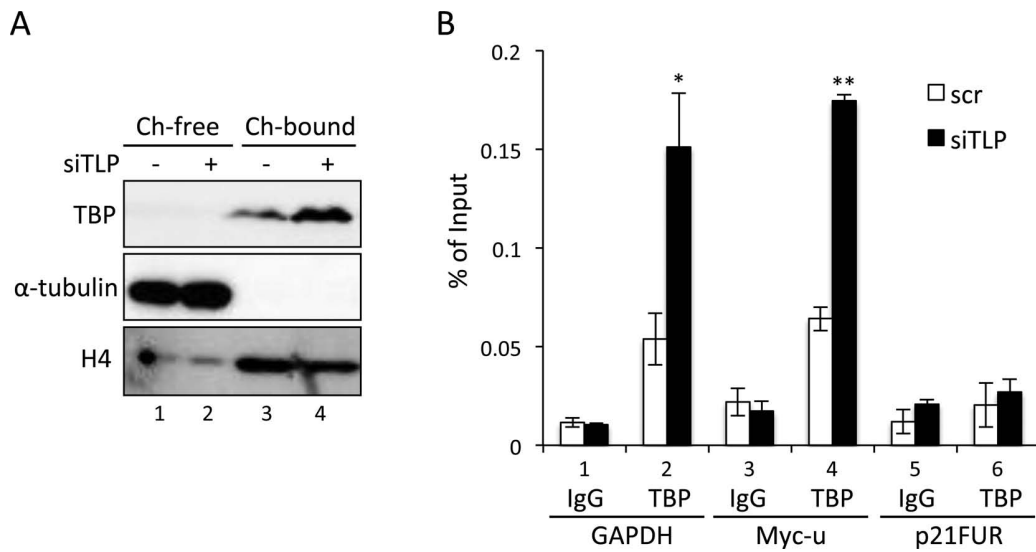


Figure 7. Negative effect of TLP on chromatin binding of TBP. (A) Amounts of chromatin-bound TBP. Chromatin-unbound (Ch-free) and chromatin-bound fractions (Ch-bound) were prepared from TLP-knocked-down HeLa cells, and the proteins were detected. Tubulin and histone H4 were used as standard proteins for chromatin-unbound and chromatin-bound fractions, respectively. (B) Amounts of promoter-bound TBP. TLP-knocked-down HeLa cells were subjected to a ChIP assay using a TBP-specific antibody. ChIP enrichment was determined by qPCR. IgG and TBP: IgG- and TBP-specific immunoprecipitates, respectively.

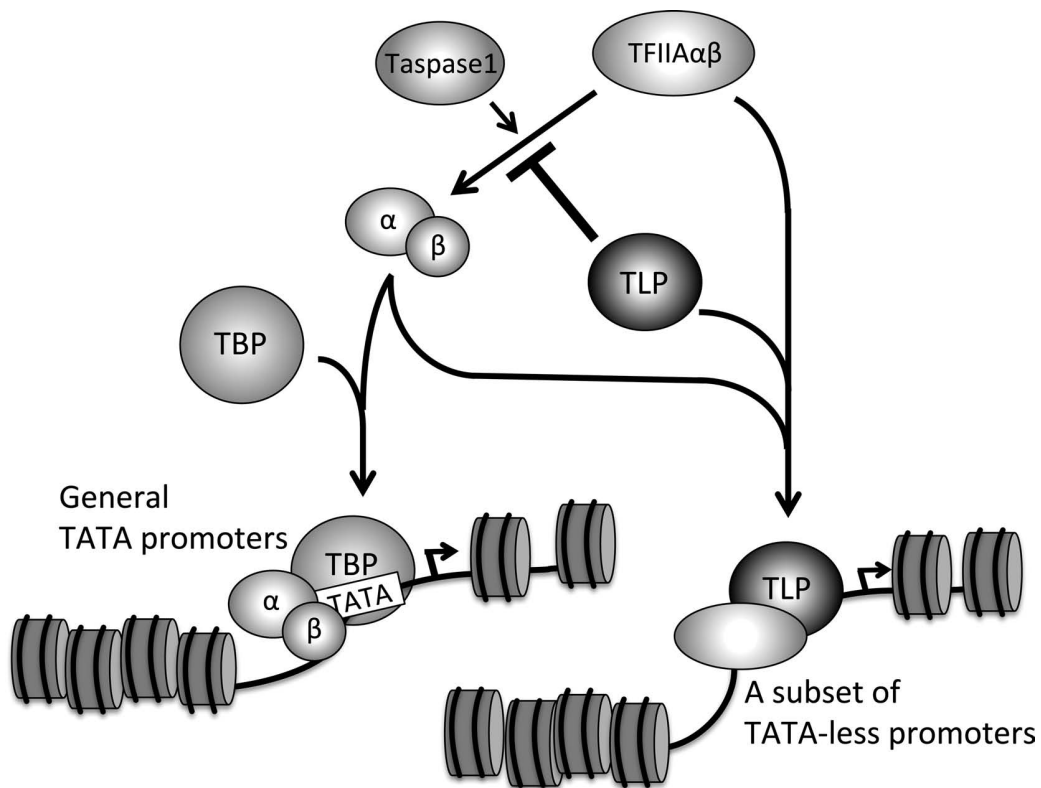


Figure 8. TLP-dependent promoter selection model of TFIIA. TLP inhibits Taspase1-mediated maturation of TFIIA $\alpha\beta$ and represses TATA gene expression. TLP forms a complex with both the processed and unprocessed forms of TFIIA $\alpha\beta$ and potentiates TLP-mediated genes. Consequently, TLP governs promoter selectivity of TFIIA and regulates gene expression.

We previously found that TFIIA enhances the dissociation of TBP dimers (18,44). Unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ does not exhibit a stable TATA box-association function (Figures 5 and 6), but it facilitated the formation of a stable TBP-TATA box complex in solution (Figure 5). Other groups also reported that TBP-TATA box binding is stimulated by unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ (8,41). Hence, even the unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ can dissociate TBP dimers and orientate a TBP monomer to the TATA box. Because processed TFIIA $\alpha\beta$ also facilitated TBP-TATA box association (Figure 5), the TBP-TATA stabilizing function of TFIIA $\alpha\beta$ is restored after processing. So far, TATA box-association of TFIIA has been assumed to be required for orientation of TBP to a TATA box. Data obtained in this study, however, suggest that even the TFIIA $\alpha\beta$ precursor, which does not exhibit association ability with the TATA box, basically has TBP-TATA box stabilization ability, and Taspase1-directed processing enables TFIIA to associate with the TATA box for full potentiation of TATA promoters as mentioned above. Consequently, we hypothesize that there are two steps for TFIIA-mediated potentiation of TATA promoters. The first step is orientation of a TBP monomer to TATA box DNA without association of TFIIA with the TATA box. The second step is TATA box-binding of TFIIA itself for activation of an associating promoter. Moore *et al.* demonstrated by *in vitro* analysis that TLP prevents TBP-TATA box complex formation as the first step through competing with TBP for TFIIA binding (28). We clearly showed that TLP prevents TBP-TATA box binding *in vivo* (Figure 7), probably due to disruption of TBP-TFIIA interaction by TLP. On the other hand, it might be possible that TLP disrupts TBP-TATA box binding via other mechanisms such as alternation of chromatin structure (45). In any cases, the present study demonstrated clearly that the Taspase1-mediated processing is a novel step for TLP to inhibit TATA-containing genes (Figure 8).

TLP participates in promoter selectivity of TFIIA

We demonstrated that unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ is inactive in TATA promoter activation. On the other hand, unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ has much more capacity to activate a subset of TLP-dependent TATA-less promoters (Figure 8). We found that unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ activates the upstream promoter of the human *p21Cip1* gene (our unpublished data), which is rather dependent on TLP. Actually, promoter recruitment of unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ has been reported. Takeda *et al.* demonstrated that unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ associates with TATA-less promoters of *p16Ink4a* and *p19Arf* genes and enhances expression of those genes during mouse craniofacial morphogenesis (40). Thus, the TFIIA $\alpha\beta$ precursor is likely to activate TBP-independent and TLP-governed TATA-less promoters. Because TLP also interacts with TFIIB, another GTF, TLP-governed promoters can be regulated by a specific transcription preinitiation complex containing TLP, unprocessed TFIIA and TFIIB.

We propose a TLP-governed promoter selection model of TFIIA (Figure 8). TLP inhibits processing of the TFIIA $\alpha\beta$ precursor and accumulates the precursor. Although inhibition of TFIIA $\alpha\beta$ maturation by TLP results in repression of

TATA genes, TLP and accumulating unprocessed TFIIA $\alpha\beta$ are cooperatively recruited to TATA-less promoters and potentiate a subset of genes.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all of the colleagues in the laboratory for valuable discussion.

FUNDING

Japan Society for the Promotion of Science [254583, 24570193]. Funding for open access charge: Japan Society for the Promotion of Science [24570193].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev.*, **16**, 2583–2592.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **41**, 105–178.
- Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F.M. and Martinez, E. (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, **389**, 52–65.
- Greenblatt, J. (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **66**, 1067–1070.
- Pugh, B.F. and Tjian, R. (1992) Diverse transcriptional functions of the multisubunit eukaryotic TFIID complex. *J. Biol. Chem.*, **267**, 679–682.
- Pugh, B.F. (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene*, **255**, 1–14.
- Jacobson, R.H. and Tjian, R. (1996) Transcription factor IIA: a structure with multiple functions. *Science*, **272**, 827–828.
- Weideman, C.A., Netter, R.C., Benjamin, L.R., McAllister, J.J., Schmiedekamp, L.A., Coleman, R.A. and Pugh, B.F. (1997) Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA. *J. Mol. Biol.*, **271**, 61–75.
- Høiby, T., Zhou, H., Mitsiou, D.J. and Stunnenberg, H.G. (2007) A facelift for the general transcription factor TFIIA. *Biochim. Biophys. Acta*, **1769**, 429–436.
- Yokomori, K., Zeidler, M.P., Chen, J.L., Verrijzer, C.P., Mlodzik, M. and Tjian, R. (1994) Drosophila TFIIA directs cooperative DNA binding with TBP and mediates transcriptional activation. *Genes Dev.*, **8**, 2313–2323.
- Sun, X., Ma, D., Sheldon, M., Yeung, K. and Reinberg, D. (1994) Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes Dev.*, **8**, 2336–2348.
- Ranish, J.A., Lane, W.S. and Hahn, S. (1992) Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science*, **255**, 1127–1129.
- Zhou, H., Spicuglia, S., Hsieh, J.J., Mitsiou, D.J., Høiby, T., Veenstra, G.J., Korsmeyer, S.J. and Stunnenberg, H.G. (2006) Uncleaved TFIIA is a substrate for taspase 1 and active in transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2728–2735.
- Oyama, T., Sasagawa, S., Takeda, S., Hess, R.A., Lieberman, P.M., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2013) Cleavage of TFIIA by Taspase1 activates TRF2-specified mammalian male germ cell programs. *Dev. Cell*, **27**, 188–200.
- Mitsiou, D.J. and Stunnenberg, H.G. (2000) TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIA α precursor and the TFIIA γ subunit. *Mol. Cell*, **6**, 527–537.
- Mitsiou, D.J. and Stunnenberg, H.G. (2003) p300 is involved in formation of the TBP-TFIIA-containing basal transcription complex, TAC. *EMBO J.*, **22**, 4501–4511.
- Teichmann, M., Wang, Z., Martinez, E., Tjernberg, A., Zhang, D., Vollmer, F., Chait, B.T. and Roeder, R.G. (1999) Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates

- with hTFIIA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13720–13725.
18. Nakadai, T., Shimada, M., Shima, D., Handa, H. and Tamura, T. (2004) Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J. Biol. Chem.*, **279**, 7447–7455.
 19. Ohbayashi, T., Makino, Y. and Tamura, T. (1999) Identification of a mouse TBP-like protein (TLP) distantly related to the drosophila TBP-related factor. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 750–755.
 20. Berk, A.J. (2000) TBP-like factors come into focus. *Cell*, **103**, 5–8.
 21. Reina, J.H. and Hernandez, N. (2007) On a roll for new TRF targets. *Genes Dev.*, **21**, 2855–2860.
 22. Zehavi, Y., Kedmi, A., Ideses, D. and Juven-Gershon, T. (2015) TRF2: TRansForming the view of general transcription factors. *Transcription*, **6**, 1–6.
 23. Suzuki, H., Ito, R., Ikeda, K. and Tamura, T. (2012) TATA-binding protein (TBP)-like protein is required for p53-dependent transcriptional activation of upstream promoter of p21Waf1/Cip1 gene. *J. Biol. Chem.*, **287**, 19792–19803.
 24. Maeda, R., Suzuki, H., Tanaka, Y. and Tamura, T. (2014) Interaction between transactivation domain of p53 and middle part of TBP-like protein (TLP) is involved in TLP-stimulated and p53-activated transcription from the p21 upstream promoter. *PLoS One*, **9**, e90190.
 25. Suzuki, H., Maeda, R., Nakadai, T. and Tamura, T. (2014) Activity of the upstream TATA-less promoter of the p21(Waf1/Cip1) gene depends on transcription factor IIA (TFIIA) in addition to TFIIA-reactive TBP-like protein. *FEBS J.*, **281**, 3126–3137.
 26. Wang, Y.L., Duttke, S.H., Chen, K., Johnston, J., Kassavetis, G.A., Zeitlinger, J. and Kadonaga, J.T. (2014) TRF2, but not TBP, mediates the transcription of ribosomal protein genes. *Genes Dev.*, **28**, 1550–1555.
 27. Kedmi, A., Zehavi, Y., Glick, Y., Orenstein, Y., Ideses, D., Wachtel, C., Doniger, T., Waldman, Ben-Asher, H., Muster, N., Thompson, J. *et al.* (2014) Drosophila TRF2 is a preferential core promoter regulator. *Genes Dev.*, **28**, 2163–2174.
 28. Moore, P.A., Ozer, J., Salunek, M., Jan, G., Zerby, D., Campbell, S. and Lieberman, P.M. (1999) A human TATA binding protein-related protein with altered DNA binding specificity inhibits transcription from multiple promoters and activators. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7610–7620.
 29. Suzuki, H., Suzuki, A., Maekawa, Y., Shiraishi, S. and Tamura, T. (2012) Interplay between two myogenesis-related proteins: TBP-interacting protein 120B and MyoD. *Gene*, **504**, 213–219.
 30. Jogo, M., Shiraishi, S. and Tamura, T. (2009) Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett.*, **583**, 2715–2719.
 31. Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J. and Livingston, D.M. (2006) Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol. Cell*, **22**, 719–729.
 32. Chong, J.A., Moran, M.M., Teichmann, M., Kaczmarek, J.S., Roeder, R. and Clapham, D.E. (2005) TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the neurofibromatosis type 1 and c-fos genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 2632–2643.
 33. Suenaga, Y., Ozaki, T., Tanaka, Y., Bu, Y., Kamijo, T., Tokuhisa, T., Nakagawara, A. and Tamura, T. (2009) TATA-binding protein (TBP)-like protein is engaged in etoposide-induced apoptosis through transcriptional activation of human TAP63 Gene. *J. Biol. Chem.*, **284**, 35433–35440.
 34. Albert, T., Wells, J., Funk, J.O., Pullner, A., Raschke, E.E., Stelzer, G., Meisterernst, M., Farnham, P.J. and Eick, D. (2001) The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20482–20490.
 35. Høiby, T., Mitsiou, D.J., Zhou, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Stunnenberg, H.G. (2004) Cleavage and proteasome-mediated degradation of the basal transcription factor TFIIA. *EMBO J.*, **23**, 3083–3091.
 36. Tanaka, Y., Nanba, Y.A., Park, K.A., Mabuchi, T., Suenaga, Y., Shiraishi, S., Shimada, M., Nakadai, T. and Tamura, T. (2007) Transcriptional repression of the mouse weel gene by TBP-related factor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 21–28.
 37. Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Herr, W. (2011) O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*, **144**, 376–388.
 38. Julien, E. and Herr, W. (2003) Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J.*, **22**, 2360–2369.
 39. Takeda, S., Chen, D.Y., Westergard, T.D., Fisher, J.K., Rubens, J.A., Sasagawa, S., Kan, J.T., Korsmeyer, S.J., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2006) Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev.*, **20**, 2397–2409.
 40. Takeda, S., Sasagawa, S., Oyama, T., Searleman, A.C., Westergard, T.D., Cheng, E.H. and Hsieh, J.J. (2015) Taspase1-dependent TFIIA cleavage coordinates head morphogenesis by limiting Cdkn2a locus transcription. *J. Clin. Invest.*, **125**, 1203–1214.
 41. Ozer, J., Moore, P.A., Bolden, A.H., Lee, A., Rosen, C.A. and Lieberman, P.M. (1994) Molecular cloning of the small (gamma) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. *Genes Dev.*, **8**, 2324–2335.
 42. Kato, K., Makino, Y., Kishimoto, T., Yamauchi, J., Kato, S., Muramatsu, M. and Tamura, T. (1994) Multimerization of the mouse TATA-binding protein (TBP) driven by its C-terminal conserved domain. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1179–1185.
 43. Coleman, R.A., Taggart, A.K., Benjamin, L.R. and Pugh, B.F. (1995) Dimerization of the TATA binding protein. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13842–13849.
 44. Coleman, R.A., Taggart, A.K., Burma, S., Chicca, J.J. and Pugh, B.F. (1999) TFIIA regulates TBP and TFIIID dimers. *Mol. Cell*, **4**, 451–457.
 45. Isogai, Y., Keles, S., Prestel, M., Hochheimer, A. and Tjian, R. (2007) Transcription of histone gene cluster by differential core-promoter factors. *Genes Dev.*, **21**, 2936–2949.