

研究報告書

「転写メディエーター複合体 CDK モジュールの構造機能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 今崎 剛

1. 研究のねらい

メディエーターは、ES や iPS 細胞で必須の転写活性化因子 Oct4、Sox2、Nanog が働く際、必要不可欠な役割を果たす転写制御因子であり、その機構解明は重要である (Whyte et al., Cell, 2014)。メディエーターは転写開始上流エンハンサー領域の転写活性化因子と Pol II への仲介する形で転写制御を行う。真核生物で保存されており、出芽酵母(以下酵母)で分子量 1.4MDa、25 サブユニット、ヒトでは 1.8 MDa、30 サブユニットにもなる超分子複合体である。メディエーターはヘッド、ミドル、テイル(この3つのモジュールを併せてコアメディエーターと呼ぶ)、そして CDK モジュールの4つのモジュールから構成されている。4つのモジュールのうち CDK モジュールはコアメディエーターと直接相互作用し抑制、またはコアメディエーターと独立にリン酸化による転写活性化や他因子のリクルートによる転写活性化のように、メディエーターの ON/OFF を行う重要モジュールである。

CDK モジュールはキナーゼサブユニット CDK8、CycC、Med12、Med13 の計4つのサブユニット、酵母では 420 kDa、ヒトでは 600 kDa の複合体である。CDKM の原子レベルでの構造機能研究は、キナーゼサブユニット CDK8 と CycC の結晶構造解析を軸に行われてきた。しかしリン酸化活性には Med12 が必要で CDK8-CycC のみでは非常に低く、コアメディエーターとの相互作用には Med13 が必要である。このように CDK モジュールの転写制御機構解明は CDK モジュール全体を対象として、そのサブユニット間相互作用を明らかにできる原子レベルでの構造解析、リン酸化活性制御機構の解明が必要である。しかし構造研究は酵母、ヒト CDK モジュールでは低分解能構造解析の報告例のみであり、そのサブユニット相互作用やリン酸化活性制御機構は未だ不明である。

本研究では CDK モジュールの転写制御機構解明のため、(1)酵母、ヒト CDK モジュールのクライオ電子顕微鏡単粒子解析による高分解能構造解析、(2)酵母、ヒト CDK モジュールのリン酸化活性の活性化機構、疾病原因変異との関連の解明を目指し研究を行った。本成果は基礎生物学のみならず、疾病の発症原理の解明および分子標的治療にもつながることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

転写メディエーター複合体 CDK モジュール(以下 CDK モジュール)は転写メディエーター複合体(以下メディエーター)のモジュールの一つで、コアメディエーターによる RNA polymerase II(以下 Pol II)転写の抑制、キナーゼサブユニットによるリン酸化、転写活性化因子のリクルートによる転写活性化を行う転写制御モジュールである(図 1)。CDK モジュールの変異は精神性疾患、大腸癌、肉腫など疾病とも関連しており、その機構解明は急務であるが詳細は未だ不明である。

本研究では CDK モジュールの転写制御機構解明のため、原子レベルでの構造と変異体を用いた生化学解析より CDK モジュールによるリン酸化メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。原子レベルでの構造、リン酸化メカニズムを解明するために

- (1) 酵母、ヒト CDK モジュールのクライオ電子顕微鏡(CryoEM)単粒子解析による高分解能構造解析
- (2) 酵母、ヒト CDK モジュールの疾患関連変異とリン酸化活性の解析

を行った。本研究のために組換えタンパク質発現系による酵母、ヒト CDK モジュールの再構成を行い成功した。さらに酵母 CDK モジュールは CryoEM による高分解能構造解析を行っている。また酵母、ヒト CDK モジュールについては各種変異体を作製しその活性測定を行い CDK モジュールのリン酸化活性メカニズムの一端を明らかにした。本研究は将来的に基礎生物学のみならず、疾病の発症原理の解明および分子標的治療にもつながることが期待される。

(2) 詳細

(A) 酵母、ヒトメディエーターCDK モジュールの組換えタンパク質発現系による再構成

メディエーターCDK モジュールの転写制御機構研究は(i)サブユニット数が多い、(ii) 細胞内ではコピー数が低くサブユニットのコピー数も異なる、さらにパラログが存在する等によりヘテロである、(iii)150-250kDa もの巨大なサブユニットが存在するため困難であった。我々はこれらの問題を、問題(i)(ii)についてバキュロウイルス-昆虫細胞を利用した MultiBacシステムを導入しモジュールのサブユニット全てを一つのベクターに組み込み再構成、問題(iii)について MBP や SUMO タグの導入による発現可用性の促進により解決した (図 2A)。

次に精製法の確立を行ったがこれは予想外に困難であった。酵母、ヒト CDK モジュールを精製してみたところ、精製時に Glycerol 入りの Buffer で精製しなければ濃度を 0.1 mg/ml 以上にできない問題に直面した。X線結晶構造解析、CryoEM 共に少なくとも0.5-1mg/ml 以上のタンパク質濃度が必要となる。また Glycerol は X線結晶構造解析では結晶の核形成を抑えるため、好ましくない。それ以上に CryoEM 単粒子解析を行う場合、タンパク質をグリッドの穴に非晶質の氷となる状態で適切な氷の厚みで凍らせる必要があるが、Glycerol 存在下では氷の形成が均一にならず厚みの調製が非常に難しくなる。そのため Glycerol を取り除く(もしくは1%以下まで濃度を低下させる)ことは必須であったため CDK モジュールの Glycerol 非存在下では濃縮出来ないことが非常に大きな問題となった。この問題解決を行うため以下の仮説を立て検討を行った。

1. 培養条件が適切でないため組換えタンパク質がフォールディングに失敗している
2. 精製法が適切でないためタンパク質が精製途中で変性している

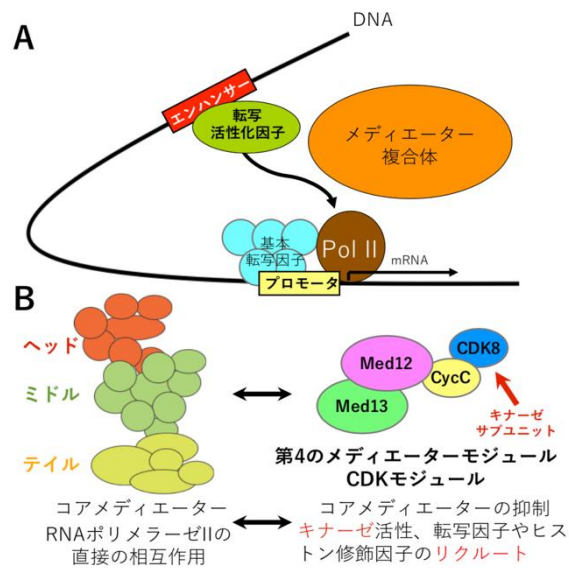


図 1: メディエーターによる転写調節

1. の問題を解決するため昆虫細胞によるタンパク質発現の培養条件の検討を、酵母 CDK モジュールを用いて行った。始めに培地の検討を行った。昆虫細胞用の培地には数種類販売されている中、Express Five (Thermo Fisher)、PSFM-J1 (和光純薬)、ESF921 (Expression systems)を用いて検討を行った。その結果 ESF921 でタンパク質発現量が最も多かった。経験的にフォールディングと発現量は正の相関があるためこの培地を用いることとした。次に細胞種の検討を行った。検討は Hi5、Sf9 で行ったところ Hi5 は発現が良好であったためこちらを選択した。最後に Hi5 で温度の検討を 27°C と 20°C で行ったところ発現量には大差はなかったが死細胞の割合が 20°C 培養の方が少なかったためこちらを選択した。

精製条件の検討を行った。詳細は省くが精

製途中に細胞由来のゲノム DNA を切断するため超音波破碎を加えることにより核酸由来のコンタミを抑えられることが分かった。さらに脱リン酸化処理を精製中に行うことによりサンプルの均一性が向上した。改良した精製条件ではゲル濾過 Superose6 の結果 4 量体の分子量 440kDa に相当する付近にピークを確認することが出来た。また濾過膜による濃縮を行ったところ、以前の精製法では 0.1mg/ml 以上濃縮することが困難であったのが 3mg/ml 程度まで濃縮可能となった。ヒト CDK モジュールでも同様に精製度、タンパク質の性状の向上を確認できた。活性を調べたところこれまでの報告と同様に CDK8-CycC では活性が低く、Med12-Med13 を加えた CDK モジュールで強い活性があることを確認した(図 2B)。

(B) 酵母、ヒトメディエーターCDK モジュールの高分解能構造解析へ向けた取り組み

我々はタンパク質調製条件を決めた標品を用いて高分解能構造解析への取り組みを行った。高分解能構造解析は X 線結晶構造解析、もしくは cryoEM による原子分解能構造解析を目指し行った。

1. X 線結晶構造解析にむけたタンパク質の結晶化

X 線結晶構造解析にむけて酵母 CDK モジュール、ヒト CDK モジュールの結晶化を行った。酵母 CDK モジュールは全長のコンストラクトで結晶化条件の探索を行ったが結晶を得ることは出来なかった。ヒト CDK モジュールも同様に結晶化条件の探索を行ったが結晶を得ることは出来なかった。ヒト CDK モジュールに関しては酵母と比較すると全体として 200kDa 程度巨大でありその付加的な部分に Disorder 領域を多く含んでいた。この領域を取り除くことにより結晶化が行えることを期待して、変異体で結晶化を行ったが結晶を得ることは出来なかった。

2. 電子顕微鏡での解析

原子分解能での構造解析を目指し電子顕微鏡による解析を行った。はじめに Negative 染色

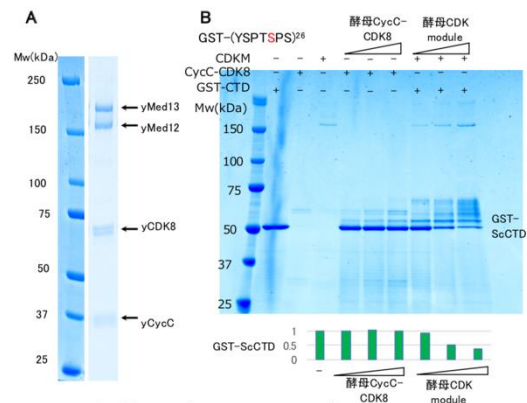


図 2: 組換え酵母 CDK モジュール

A: 組換えタンパク質発現系で再構成した出芽酵母 CDK モジュール B: CDK モジュールのリン酸化活性測定。30°C、30 分間基質と反応させリン酸化。その後 SDS-PAGE で泳動後未修飾 CTD を 1 としてバンドを定量

法(2%の酢酸ウラニウムでグリッド上のタンパク質を処理することにより高コントラストでタンパク質粒子を観察できる方法)によりカーボン皮膜付きグリッド上に CDK モジュールを固定し観察を行った。その結果酵母 CDK モジュールは粒子が凝集体や分解を起こさずに均一かつはっきりとした形をとっていることが分かった(図 3A)。一方ヒト CDK モジュールは分解と思われる酵母 CDK モジュールと比べても小さい粒子が数多く見られ、電子顕微鏡解析には適していないと判断した。今後ヒト CDK モジュールは変異体を作成することにより電子線顕微鏡解析に適したタンパク質の調製をさらに行う必要がある。

酵母 CDK モジュールの Cryo 電子顕微鏡解析に向けた条件検討を行った。Cryo 電子顕微鏡単粒子解析を行う際は解析に適したグリッドを作成する必要がある。そのためには1. データ収集の効率を上げるためにタンパク質粒子が重なり合わないが、グリッド上にまんべんなく存在するようにするためのタンパク質濃度条件の検討、2. 氷の厚みが薄い方が氷由来のバックグラウンドが下がりコントラストが上がるがタンパク質は汽水面と接すると壊れる、というバランスをとる為のグリッドの氷の厚み

の条件検討が必要である(前述の Glycerol の問題は適切な氷の厚みを作製することを困難とする)。条件検討の結果タンパク質濃度は700-800nM程度、厚み作製の際のプロット条件はプランジ凍結用の自動ガラス化装置(Vitrobot)による条件を Blot time: 1.5、force: -5 とした(図 3B-D)。

現在は Cryo 条件下で Tecnai Actica と K2 検出器を用いてデータ収集を行っている。プログラム Relion2.1 を用いた 2D classification の結果 Negative 染色の際に見られた粒子と同程度のサイズの像の再構成に成功している。粒子数が足りないので更に測定を行い粒子数を増やし更なる解析を行う必要がある。

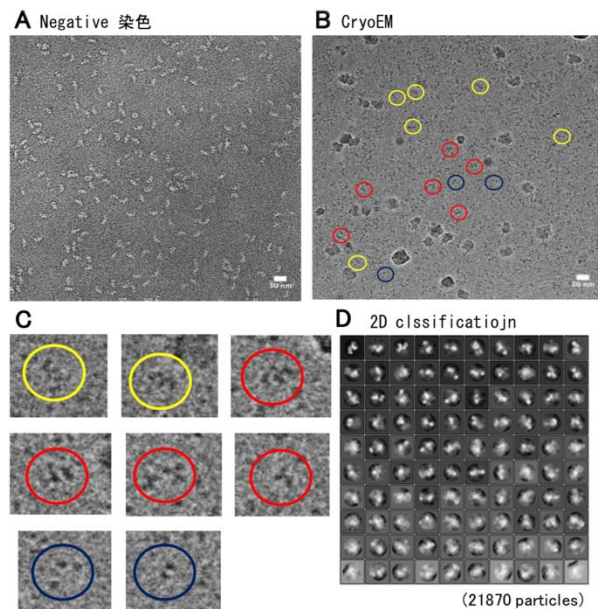


図 3: 酵母 CDK モジュールの電子顕微鏡解析
A: 酵母 CDK モジュールの Negative 染色像 B: 酵母 CDK モジュールの cryoEM 像。C: 酵母 CDK モジュールの代表的な粒子。黄色、赤、紺色の円は B の円と対応。D: CryoEM 像の 2D Classification。

3. 今後の展開

本研究成果より CDK モジュールのリン酸化メカニズムの一端が明らかとなった。さらに現在も解析中である CryoEM による高分解能構造解析によりその全体構造が明らかとなれば、リン酸化メカニズムの詳細が明らかとなりこれを標的とした創薬などの応用も考えられる。

本研究での対象は主に CDK モジュールのリン酸化による転写活性化メカニズムにスポットを当てて研究を行ったが、CDK モジュールは他の転写因子のリクルートによる転写の活性化、さらにはコアメディエーターの抑制という負の制御も行うため、CDK モジュールによる転写制御機構

解明にはこれらの研究も必要である。今後は転写因子と CDK モジュール、コアメディエーターと CDK モジュールの相互作用による転写制御機構を明らかにしたい。それには CryoEM による原子レベルでの構造解析と機能解析を併せることが必要であると考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は、メディエーター複合体という生体内で RNA polymerase II の制御という必須の役割をしているが、その機能が分かっていない超分子複合体の制御メカニズムを何とかして明らかにしようとして開始した。メディエーター複合体は 4 つのモジュールから構成されるが、そのなかでもメディエーター複合体から着脱しながら転写の活性化、抑制、両方を行う特殊な CDK モジュールに興味を持ちこれを研究対象とした。

CDK モジュールは、はじめは X 線結晶構造解析により原子レベルでの構造を明らかにしようとして計画していた。しかし 2013 年頃に始まった CryoEM の高分解能革命があり、超分子複合体の構造研究にはこれは必須であると直感し、この波を上手く取り入れるために、研究開始時のアメリカ、インディアナ大学高木研究室から日本でクライオ電子顕微鏡単粒子解析の最新設備をそろえておりかつ受け入れ許可をくださった横浜理研の CLST、構造合成生物学部門白水部門長のもとで研究を行う体制の再編を行った。実際アメリカでは電子顕微鏡が近くになく、サンプル評価まで非常に時間がかかっていたところ、白水研究室では同じ建物内に電子顕微鏡施設を持っていたため、研究スピードは加速した。この移動を許可してくださった高木博士、白水博士には心から感謝している。研究費は AKTA pure や電子顕微鏡単粒子解析用のワークステーションの導入、さらには横浜理研での研究補助員の雇用など、本研究を遂行するために非常に有効に使われたと考えている。

本研究は立ち上げ部分、さらに予想できなかった超分子複合体ならではのタンパク質調製の困難さのせいで、予定より高分解能構造解析の部分が遅れている。しかしサンプル調製、またデータ収集の条件はかなり固まっております近い将来 CDK モジュールの高分解能構造解析は達成できると考えている。さきがけ研究終了後も、本研究を完遂できるよう更なる研究を行っていく。本成果は基礎生物学のみならず、疾病の発症原理の解明および分子標的治療にもつながることが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

転写のメディエーター複合体のうち、CDK モジュールに着目して、酵母とヒトの CDK モジュールで結晶構造解析、クライオ電顕単粒子解析を試みている。まず、両生物種の CDK モジュールの再構成に成功している。結晶化はまだ成功していないが、酵母の CDK モジュールが濃縮できないと言う致命的な問題を、調製法の工夫により解決し、単粒子解析の目途を立てたことは評価できる。ヒト CDK モジュールはクライオ電顕解析も難しそうであるが、機能解析で成果を出すことができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Rogers CM, Wang JC, Noguchi H, Imasaki T, Takagi Y, Bochman ML. Yeast Hrq1 shares structural and functional homology with the disease-linked human RecQ4 helicase. *Nucleic Acids Res.* 2017, 45(9), 5217-5230.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) 25サブユニットからなる転写メディエーター複合体の再構成」今崎 剛. 第53回日本生物物理学会年会シンポジウム:細胞に近づく構造生命科学の最前線. 2015
- 2) 組換えタンパク質技術で調製したマルチサブユニット複合体の構造研究. 今崎 剛. 第 39 回日本分子生物学会年会: 多様な機能を有するマルチサブユニット複合体の構造・機能および機構進化の解析. 2016