

令和元年6月24日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05578

研究課題名(和文)核内受容体LRH-1による転写調節の分子メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism in transcriptional regulation by nuclear receptor LRH-1

研究代表者

湯本 史明(Yumoto, Fumiaki)

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・特任准教授

研究者番号：30360150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)は核内受容体の一種であり、肝臓、膵臓、小腸、卵巣、乳腺等において遺伝子発現を制御している。また、LRH-1は膵臓癌、乳癌との関わりも報告されたことで、創薬ターゲットとして認識されている。本研究では、LRH-1全長分子の発現、精製、DNAレスポンスエレメントとの複合体としてのサンプル調製を行い、結晶化を試みたが、結晶を得ることはできなかった。これはLRH-1全長分子が天然変性領域を含むと考えられるヒンジ領域を含み、結晶化を困難にしていることが考えられる。そこで、X線小角散乱解析を行い、全体として棒状の形状を取ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LRH-1は膵臓癌、乳癌に関わることが報告され、創薬ターゲットとして認識されてきた。特に米国を中心に、リガンド結合ポケットを対象とした低分子薬剤候補化合物のスクリーニングが行われてきている。しかしながらLRH-1は、4つのドメイン構造をもって機能しているが、特にDNA結合ドメインとリガンド結合ドメインが全長分子の中でどのような相対位置関係をもって機能を発現しているのかについての情報は得られていなかった。本研究は、この点において全長分子のサンプル調製法の確率から、構造情報を更新につながるものであり、今後の創薬戦略立案のための基礎情報の一つとなるものである。

研究成果の概要(英文)：Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) is one of the nuclear receptor superfamily. It regulates gene expressions in liver, pancreas, intestine, ovary, and mammary gland. It has also been recognized as a target of drug discovery because of the relations to the pancreatic and breast cancers, etc. In the study, full-length of human LRH-1 has been expressed, purified, and then prepared as a complex with DNA response element. Although the crystallization trial has been done, it was not possible to obtain a single crystal. Then it was suggested that the complex holded a bar shape as the result of a small angle X-ray scattering analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶化 X線結晶構造解析 X線小角散乱解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1, 遺伝子名 NR5A2) は、48 種からなるヒト核内受容体ファミリーの一種であり、肝臓、膵臓、小腸、卵巣、乳腺等の発生における遺伝子発現制御に関わっている。一方、胚性幹細胞においてはその多能性維持に関わる因子として知られる Oct3/4 (遺伝子名 Pou5f1) の発現制御を行うなど、初期発生においても重要な役割を担っていることが明らかとなっている。また、LRH-1 は膵臓癌、乳癌の発生にも関わっていることから、創薬ターゲットとして、主に米国において薬剤候補化合物のスクリーニングが進められてきた。

LRH-1 のドメイン構造としては、N 末端ドメイン、Zn フィンガーと Ftz-F1 モチーフと呼ばれる領域からなる DNA 結合ドメイン (DNA Binding Domain, DBD)、ヒンジ領域とよばれるリンカードメイン、リガンド結合ドメイン (Ligand Binding Domain, LBD) によって構成されている。ヒト LRH-1 の結晶構造解析においては、DBD が DNA との複合体として LBD が共役調節因子に由来するペプチドとの複合体として構造決定がなされてきている。また LRH-1 LBD については、本研究代表者が β カテニンのアルマジロリピート領域との複合体として結晶構造も明らかとなっている。このようにドメインレベルにおいては LRH-1 の複合体構造が知られているが、4 つのドメインをもつ LRH-1 において、各ドメインがどのように協調的にはたらくのか、という点においては明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究においては、ヒト LRH-1 全長分子を用い、DNA レスポンスエレメント 2 重鎖との複合体として、さらには共役調節因子との複合体として立体構造を決定し、LRH-1 による遺伝子発現調節の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究はヒト全長 LRH-1 分子に対し X 線結晶構造解析、X 線小角散乱解析、クライオ電子顕微鏡を適用することで、遺伝子発現調節の分子機構の解明を試みるものである。

4. 研究成果

ヒト LRH-1 をコードする遺伝子を pRSF-2 Ek/LIC に TEV プロテアーゼ消化部位を加えた形で挿入した発現系を用い、大腸菌 BL21(DE3)Star を宿主細胞として、タンパク質生産を行った。目的タンパク質以外の高分子量タンパク質の混入やヒンジ領域での切断と推測される分子内でのタンパク質分解が観察されていたことが問題であった。そこで、複合体の結晶化や X 線溶液散乱解析を適用するために、これらの問題点の解決を試みた。回収した大腸菌ペレットに対し、菌体破碎後の遠心時間、Ni-NTA カラムとのイン

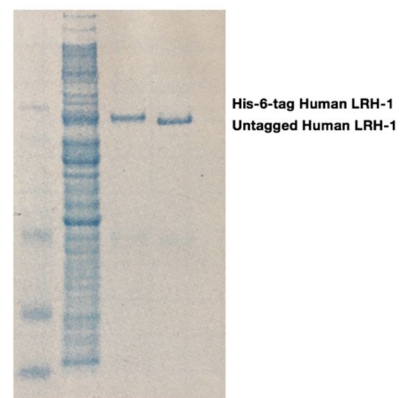


図 1 ヒト全長 LRH-1 の精製

キュベーション時間、カラム洗浄、タンパク質溶出までの時間について可能な範囲で迅速化を図ることで、大腸菌に由来するプロテアーゼによる切断可能性を出来る限り軽減することにした。これまでもタンパク質-DNA 複合体として構造解析用サンプルの調製はできていたものの、それらは全て精製のために導入した His-6 タグおよび TEV プロテアーゼ消化部

位を含む N 末端領域を残したままレスポンスエレメント DNA との複合体化を行い、最終精製用ゲルろ過カラムに供し、目的タンパク質サンプルとしてきていた。しかしながら、DNA との複合体化を行った後、TEV プロテアーゼによって His-6 タグ(および切断サイト由来配列)を切断することによって、より精製度が高く、余分な配列をもたないタンパク質を調製することができるようになった(図 1)。また、同様に、これまでに LRH-1 の相互作用因子である β -catenin 全長分子 (Yumoto *et al.*, 2012) についても、これまでは His-6 タグ

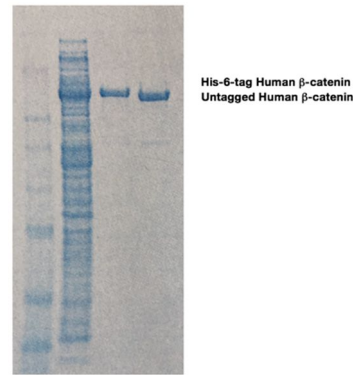


図 2 ヒト全長 β -catenin の精製

グや TEV 切断サイトを残したまま精製を行って最終精製品としてきたが、今回、TEV 消化を行うことで、His-6 タグのない全長分子として単一バンドまで精製する方法を確立することができた(図 2)。

このようにして全長 LRH-1 が得られたものの、残念ながらこれまでに結晶化には成功できていない。さらにクライオ電顕による単粒子解析を試みたが、タンパク質会合が観察され、これまでに、単粒子としての観察までは至っていない。良いグリッド調製を行うための条件スクリーニングが必要であると考えられる。

このように全長分子の構造解析は困難であったことから、これまでも薬剤開発ターゲットドメインと認識されてきている LRH-1 の LBD を対象として構造解析を並行して行うこととした。

これまでに 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (DLPC)やフォスファチジルイノシトールリン酸が LRH-1 のリガンド結合ポケットに結合し、作用することは知られているものの、実際に生体内で作用する LRH-1 の生理的リガンドは同定されていない。このようなリン脂質の LRH-1 LBD への結合については、大腸菌を用いて調製された LBD の結晶構造解析において LBD のリガンド結合ポケット内にフォスファチジルグリセロールの結合が観察されたことをきっかけとして、結晶構造解析と質量分析によって明らかとなってきた。そこで、カリフォルニア大学サンフランシスコ校のロバート フレットリック教授らと共同で、この LRH-1 LBD と阻害化合物との複合体の結晶構造解析を行うべく、サンプル調製と結晶化スクリーニングを行った。LRH-1 LBD の表面の Cys を Ser に変異させた LBD Cys-Lite パージョンを調製し、タンパク質として mg オーダーで調製できる系を確立した。また、上述のように大腸菌で調製した LBD はフォスファチジルグリセロールを結合した状態で精製され、除くことは困難であることから、一旦変性させた後、リフォールディングを試みた。これは EF ハンド型カルシウム結合タンパク質で古くからアポ型タンパク質を調製する方法として適用されてきた TCA 沈殿法を利用したリフォールディング法を利用した。今回、この方法を LRH-1 LBD Cys-lite に適用し、LRH-1 LBD Cys-lite のアポ体の調製を行った。このサンプルに、Dax-1 に由来する LRH-1 LBD 結合ペプチドを結合させ、フレットリックグループで同定された阻害化合物と混合した複合体サンプルを調製し、高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学研究センターの大規模結晶化装置を用いて、共結晶化条件のスクリーニングを行った。LRH-1 LBD Cys-Lite と共役抑制因子である Dax-1 に由来するペプチドと化合物との複合体として結晶化スクリーニング可能な質と量のサンプルが調製できるようになった。これまでに結晶は

得られていないものの、こういった新たなサンプル調製法が確立できたことにより、今後の展開につながる成果となった。

LRH-1 全長には、前述の通り、ヒンジ領域と呼ばれる天然変性領域が存在していることから、複合体全体としてより安定化することが必要である可能性もある。したがって、LRH-1 全長-DNA 複合体をより安定化する複合体形成因子を含む複合体を調製することによって、より構造解析に適したサンプル調製を試みたい。また、このプロセスの中で、安定な複合体調製ができた際には、大規模結晶化装置を用いて、結晶化条件の探索を行い、X 線結晶構造解析を進めるとともに、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を適用することで、LRH-1 による遺伝子発現制御の分子機構を明らかにしていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

湯本史明, サプリン エリーナ, 清水伸隆, 加藤龍一, フレッテリック ロバート, 千田俊哉, 核内受容体 LRH-1 複合体の相関構造解析, 第 31 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば, 2018

Fumiaki Yumoto, Elena Sablin, Nobutaka Shimizu, Toshiya Senda, Robert Fletterick, Hybrid Methods in the Structure of LRH-1-DNA-Coactivator Complex, 生理研研究会, 岡崎, 2017

Fumiaki Yumoto, Elena Sablin, Ryuichi Kato, Nobutaka Shimizu, Robert Fletterick, Toshiya Senda, Structural Biology of the Nuclear Receptor Complexes in the NR5A subfamily. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。