

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：82118

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07321

研究課題名(和文) 分子進化の新しい指標に基づく転写基本因子TFIIDを含む巨大複合体の立体構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of large protein complexes based on the novel evolutionary indicator

研究代表者

安達 成彦 (ADACHI, NARUHIKO)

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：70707489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：転写基本因子TFIIDは全遺伝子の9割の発現制御に関わり、転写開始において中心的な役割を果たす因子である。しかし、15種類のサブユニットから構成される分子量1MDaの複合体であるため、高分解能の立体構造は未だ解析されていない。研究代表者はこれまでにTFIIDと5種類の相互作用因子の大量精製法を確立してきた。次の問題は因子の混合順序であるが、我々は近年開発した分子進化の新しい指標に基づき、進化の過程で誕生した順に混合するという着想に至った。本研究では、A. TFIIDの結晶化と結晶構造解析、B. 分子進化的解析、C. TFIIDを含む複合体の再構成と立体構造解析、を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内において、タンパク質などの生体分子は複合体を形成して働いている。したがって、生体分子の機能解明には、複合体の状態での立体構造を解析することが重要である。しかし、複合体の立体構造解析を行うためには、溶液中で複合体を安定に維持する条件と、複合体を結晶化する(もしくは良好なクライオグリッドを作製する)条件を一致させる必要があるため、一般的に、複合体の立体構造解析は極めて困難であることが知られている。今回の研究は、現代の生命科学において必要不可欠であるものの、いまだに困難とされる複合体の立体構造解析に対して、一般的な解を与えるといった学術的な意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The general transcription factor TFIID is involved in the regulation of 90% of the expression of all genes and plays a central role in transcriptional initiation. However, since it is a complex of 15 subunits with a molecular weight of 1 MDa, its high-resolution three-dimensional structure has not yet been analyzed. We have established a large scale purification method for TFIID and its five interacting factors. The next problem is the mixing order of factors. Based on a new index of molecular evolution developed recently, we have come up with the idea of mixing factors in the order in which they were born during evolution. In this study, we performed A. Crystallization and crystal structure analysis of TFIID, B. Molecular evolutionary analysis, and C. Reconstruction and three-dimensional structure analysis of TFIID-containing complexes.

研究分野：構造生物学

キーワード：分子進化 構造生物学 転写 複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

転写開始反応はゲノム DNA からの遺伝情報の読み出しにおける最初の反応である。転写基本因子 TFIID は全遺伝子の 9 割の発現制御に関わり、転写開始において中心的な役割を果たす因子であるが、15 種類のサブユニットから構成される分子量 1MDa の複合体であるため、高分解能の立体構造は未だ解析されていない。応募者はこれまでに TFIID の大量精製法を確立してきたが、TFIID 単独では形状が不安定なため、さらに 5 種類の相互作用因子を精製した。次の問題は因子を混合する順序だが、我々は近年開発した分子進化の新しい指標に基づき、進化の過程で誕生した順に混合するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

TFIID を含む複合体の立体構造解析を目指して、下記 3 点を目標とする。

- A. TFIID の結晶化と結晶構造解析、
- B. 分子進化の新しい指標を利用して、TFIID を含む複合体の集合順序を予測
- C. TFIID を含む複合体の再構成と立体構造解析

### 3. 研究の方法

2017 年度：TFIID の大量精製法は既に確立しているので、320L 培養菌体からの大量精製と結晶化を繰り返して行う。また、分子進化の解析を網羅的に行い、各因子が進化の過程で誕生した順序に関する情報の精度を上げる。

2018 年度以降：TFIID の結晶化を引き続き行う。結晶が得られ次第、結晶の質を改善し、回折データの収集と結晶構造解析を行う。TFIID を含む複合体の再構成については、平成 29 年度に得られた分子進化的解析に基づいて行う。同時に安定な相互作用条件を探索しつつ、その結果を反映させて共結晶化を行う。TFIID を含む複合体については、結晶が生じたとしても大きくは育たないことが想定されるため、電子顕微鏡による単粒子解析にも力を入れて進める。

### 4. 研究成果

2017 年度は、B. に注目して研究を進めた。分子内ダイレクトリピート間の相同性の崩れは、重複直後の共通祖先と、現在の子孫遺伝子の進化的な距離を反映すると考えられる。私たちはこの値を dDR と名付けた。TFIID の DNA 結合サブユニットである TBP や、TFIIB は分子内にダイレクトリピートを持つので、様々な生物種の TBP、TFIIB の dDR 値を計算して相関を調べたところ、TBP がゼロの時点で、既に TFIIB は正の値を持っており、TFIIB が TBP よりも先に生まれたことが示された。前回の報告は 34 種と少ないサンプル数で dDR を計算していたので、平成 29 年度は入手可能な全ての公共データベース(真核と古細菌の 450 種)を使って計算を行い、TBP の対称性の崩れが、真核生物の転写反応の複雑化を導いたという分子進化モデルを発表した(Figure 1)。

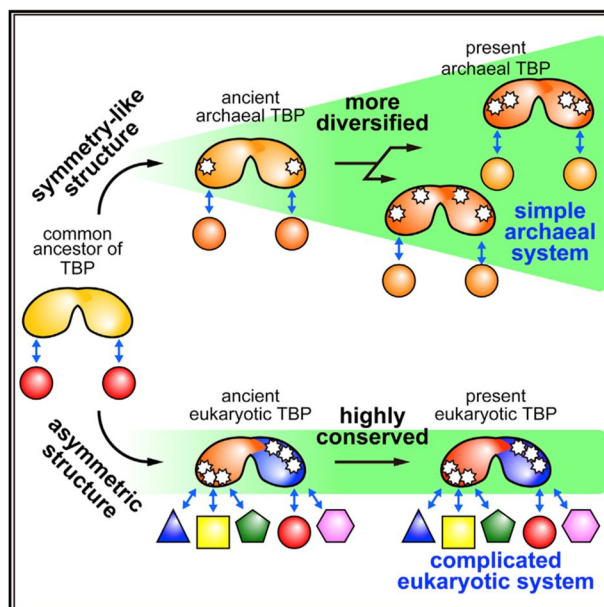
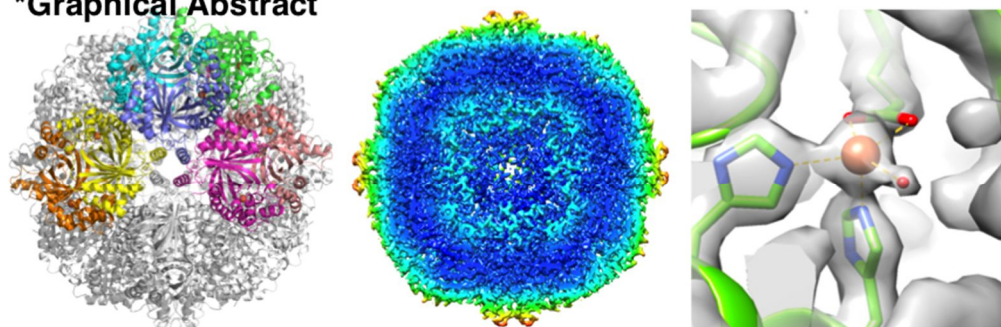


Figure 1. 新しい分子進化の指標に基づいて予想した TBP の分子進化モデル

2018年度は、A.C.に注目して研究を進めた。TFIIDは分子量が巨大でサブユニット数も多い複雑な複合体であるため、結晶化だけでなく、クライオ電子顕微鏡による解析も進めた。平成30年4月に、200kVのクライオ電子顕微鏡(Talos Arctica, Falcon3)がKEKに導入されたことを受けて、まずはその立ち上げを行なった。12月には110kDaのタンパク質を2.85Å分解能で決定することに成功し、立ち上げが完了したと考えている。現在、KEKクライオ電顕の装置責任者として共同利用を推進しつつ、TFIIDと相互作用して形状を安定化するRNA polymerase IIのクライオ電顕解析を行い、現在、8Å分解能での単粒子解析に成功している。

2019年度は、A.C.に注目して研究を進めた。TFIIDは分子量が大きくサブユニット数も多い複雑な複合体であるため、結晶化だけでなく、クライオ電子顕微鏡による解析も進めた。2018年3月に、200kVのクライオ電子顕微鏡(Talos Arctica, Falcon3EC)がKEKに導入されたことを受けて、まずはその立ち上げを行なった。2018年12月には110kDaのタンパク質を2.85Å分解能で決定することに成功し、論文投稿準備中である。また、TFIIDのように分子量の大きな対象を扱う準備として、860kDaの酵素についても2.24Å分解能でクライオ電顕構造を決定し、論文投稿し revise 中である (Figure 2)。現在、KEKクライオ電顕の装置責任者として共同利用を推進しつつ、TFIIDに相互作用する pol II についての単粒子解析を進めている。

**\*Graphical Abstract**



**Figure 2. 2.24Å分解能で解析した860kDaの酵素のクライオ電顕構造**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koentjoro MP, Adachi N, Senda M, Ogawa N, Senda T.	4. 巻 285(5)
2. 論文標題 Crystal structure of the DNA-binding domain of the LysR-type transcriptional regulator CbnR in complex with a DNA fragment of the recognition-binding site in the promoter region.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 977-989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14380	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami E, Adachi N, Senda T, Horikoshi M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Leading role of TBP in the Establishment of Complexity in Eukaryotic Transcription Initiation Systems.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3941-3956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.12.034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuta Sato, Takashi Yabuki, Naruhiko Adachi, Toshio Moriya, Takatoshi Arakawa, Masato Kawasaki, Chihaya Yamada, Toshiya Senda, Shinya Fushinobu, Takayoshi Wakagi	4. 巻 -
2. 論文標題 Crystallographic and cryogenic electron microscopic structures and enzymatic characterization of sulfur oxygenase reductase from Sulfurisphaera tokodaii	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1101/2020.05.03.074773">https://doi.org/10.1101/2020.05.03.074773</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 14件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 遺伝子発現制御に関わるタンパク質巨大複合体の構造・機能・進化
3. 学会等名 第3回CUBSSミーティング（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi
2. 発表標題 Leading role of TBP in the establishment of complexity in eukaryotic transcription initiation systems
3. 学会等名 The 18th Annual meeting of PSSJ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Eiryo Kawakami, Toshiya Senda, Masami Horikoshi
2. 発表標題 Leading role of TBP in the establishment of complexity in eukaryotic transcription initiation systems
3. 学会等名 The 32th Annual meeting of Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 KEKのクライオ電子顕微鏡の現状
3. 学会等名 BINDS測定技術交流会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 タンパク質複合体サンプルの調製とスクリーニング
3. 学会等名 PF研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Eiryu Kawakami, Toshiya Senda, Masami Horikoshi
2. 発表標題 Leading role of TBP in the establishment of complexity in eukaryotic transcription initiation systems
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 マルチサブユニット複合体の研究とKEKクライオ電子顕微鏡の現状
3. 学会等名 蛋白研セミナー (第1回構造生命科学研究会) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 遺伝子発現制御に関わるマルチサブユニット複合体の構造・機能・進化
3. 学会等名 第1回ゲノム・進化・構造の会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 試料調製、測定、解析で困ったこととその解決方法の紹介@KEK
3. 学会等名 第1回クライオEMネットワーク・ユーザーグループミーティング (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 KEKにおけるクライオ電顕施設の立ち上げと共同利用
3. 学会等名 第5回筑波大-KEK連携セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Kyohei Aizawa, Yuka Kratzer, Shinya Saijo, Nobutaka Shimizu, Toshiya Senda.
2. 発表標題 Improved method for soluble expression and rapid purification of yeast TFIIA
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Lab Meeting: MECHANISMS OF EUKARYOTIC TRANSCRIPTION (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡: 気になっていること・困っていること@KEK
3. 学会等名 日本顕微鏡学会・第75回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡で生体分子の形を明らかにする
3. 学会等名 KEK公開講座「生物学におけるクライオ電子顕微鏡」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Toshio Moriya, Fumiaki Yumoto, Kotaro Koiwai, Akira Shinoda, Yusuke Yamada, Toshiya Senda
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 The 2019 American Crystallographic Association Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達成彦
2. 発表標題 単粒子解析の原理と実際:KEKにおける共同利用型クライオ電子顕微鏡の立ち上げを例として
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naruhiko Adachi, Masato Kawasaki, Toshio Moriya, Fumiaki Yumoto, Kotaro Koiwai, Akira Shinoda, Yusuke Yamada, Toshiya Senda
2. 発表標題 Structure analysis of transcription related complexes and installation of cryo-EM in KEK
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Mechanisms of eukaryotic transcription (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 千田俊哉・安達成彦・川崎政人・守屋俊夫・山田悠介・篠田晃・小祝孝太郎
2. 発表標題 KEKクライオ電顕の現状
3. 学会等名 生理研研究会「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造解析」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千田俊哉・安達成彦・川崎政人・守屋俊夫・山田悠介・篠田晃・小祝孝太郎
2. 発表標題 KEKにおけるクライオ電顕施設の紹介
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安達成彦、千田俊哉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学増刊・イメージング時代の構造生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 <a href="http://www2.kek.jp/imss/sbrc/">http://www2.kek.jp/imss/sbrc/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----