

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K07246
研究課題名(和文) 転写メディエーター複合体の転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Structural study of Mediator CDK module

研究代表者

今崎 剛 (IMASAKI, TSUYOSHI)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：60631661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写メディエーター複合体はRNAポリメラーゼII (Pol II)を仲介する転写制御を行う超分子複合体である。転写メディエーター複合体は4つのモジュール、25以上のサブユニットから構成される。そのうち4つのサブユニットから構成されるCDKモジュールは、キナーゼドメインを介してリン酸化による転写活性化、他タンパク質との相互作用による抑制によりメディエーター機能のON/OFFを行う。本研究では超分子複合体調製技術の開発、クライオ電子顕微鏡単粒子解析によるCDKモジュールの構造解析を行い、そのリン酸化機能の一端を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超分子複合体は転写におけるPol II、翻訳におけるRibosome、スプライシングにおけるスプライソソームのよりに、生命活動の重要な役割を担う。組換えタンパク質発現系を用いた超分子複合体の調製方法は、それらの研究には必須であり、本研究により開発された方法を適用可能である。CDKモジュールはPol II転写制御の重要因子であり、その分子メカニズムの解明はメディエーター機能の不全を原因とする疾患研究の土台となる。

研究成果の概要(英文)：The transcription mediator complex is a multi-protein complex that regulates RNA polymerase II (Pol II) transcription. The transcription mediator complex is composed of four modules with more than 25 subunits, of which the CDK module, composed of four subunits, activates transcription by phosphorylation through the kinase domain and also represses through interaction with other proteins. In this study, we developed a new multi-protein complex preparation technique and analyzed the structure of the CDK module by cryo-EM single-particle analysis to elucidate one aspect of its phosphorylation function.

研究分野：構造生物化学

キーワード：転写 クライオ電子顕微鏡単粒子 超分子複合体 難溶性タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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 RNA ポリメラーゼ II (Pol II) を仲介する形で転写制御を行う (図 1A). 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 CDKM 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 CDKM 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 (図 1B).

CDKM 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 リン酸化活性に重要かつ子宮平滑筋肉腫と関連があるヒト Med12 G44 や Ohdo 症候群と関連がある H1729 など疾患関連変異は保存されている. 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 (図 2B), コアメディエーターとの相互作用には Med13 が必要である.

CDKM の転写制御機構解明は CDKM 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 CDKM 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った. この点を解明しない限り CDKM の転写制御機構の解明は不可能であった.

2. 研究の目的

申請者は CDKM の進化的に保存された転写制御機構, 特にリン酸化活性による Pol II 制御機構, コアメディエーターとの相互作用機構を解明するため以下の研究を行う.

- (A) 酵母 CDKM の, CryoEM 電子顕微鏡による高分解能構造解析
- (B) 酵母 CDKM のリン酸化機構の生化学的同定

を目指した. CDKM はメディエーターの転写制御の ON/Off を司っている. リン酸化活性の異常は大腸癌や子宮平滑筋腫と, 相互作用する因子をリクルート機能の異常は X 染色体連鎖性精神遅滞, カボジ肉腫, 軟骨細胞の分化に直接関連しており, 疾患関連変異は酵母からヒトまで保存されている. このように, 酵母メディエーターの転写機構の解明は基礎生物学のみならず, ヒトの転写制御機構解明にも重要である.

3. 研究の方法

- (A) 酵母 CDKM のクライオ電子顕微鏡単粒子解析による構造解析

電子顕微鏡単粒子解析を用いて酵母 CDKM の原子分解能構造解析を目指した. CDKM の組

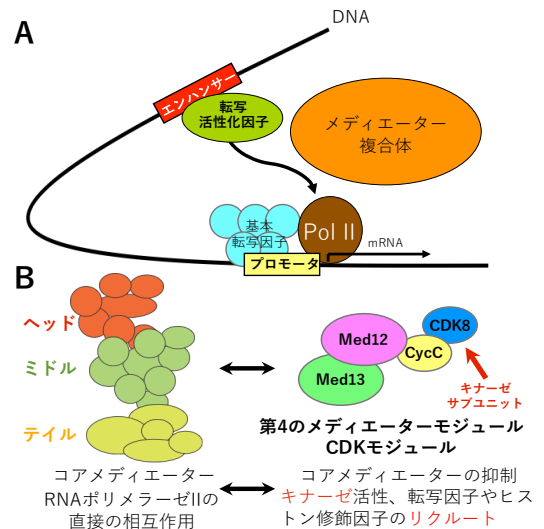


図 1: メディエーターによる転写調節

換えタンパク質発現系を用いた調整は非常に困難であったが、新規の超分子複合体発現方法を開発しこの問題を解決した (Imasaki et al., Plos ONE, 2018). 高分解能構造解析用のデータ取得は, SPring-8 の Thermo Fisher 製クライオ電子顕微鏡 Glaciuous を利用し, (詳細は研究成果に記す), 撮影データの解析は当研究室所有の高速ワークステーションで行った. 解析には申請者の CryoEM 解析の経験を活かした (Shigematsu, Imasaki et al., JCB, 2018). 構造解析し明らかとなったリン酸化活性制御に重要だと思われる部分は, 変異体を作製し, リン酸化の基質である Pol II C 末端ドメインのリン酸化を定量し影響を調べ活性に重要な残基を特定した.

(B) 酵母 CDKM のリン酸化機構の生化学的同定

組換えタンパク質 CDKM とコアメディエーターの直接の相互作用部位をプルダウンアッセイで特定を試みた. さらに, 過去の報告にある低分解能構造解析結果から予想された CDKM とコアメディエーター相互作用する部位の欠失, もしくは点変異体を作製し, 同様の解析を行う.

4. 研究成果

CDKM の組換えタンパク質発現系を用いた調整は非常に困難であったが、新規の超分子複合体発現方法の確立しこの問題を解決した. これらの方法については巨大超分子複合体の昆虫細胞バキュロウイルス発現系を用いた発現最適化法の開発した方法を適用 (Imasaki et al., Plos ONE, 2018), X 線結晶構造解析に必須なセレノメチオニン誘導体導入法の開発 (Wenzel, Imasaki et al., Protein Sci. 2019) として成果をまとめた. 酵母, ヒトともに高純度の精製蛋白質複合体の調整に成功して特許申請中である (PCT/US2018/047193).

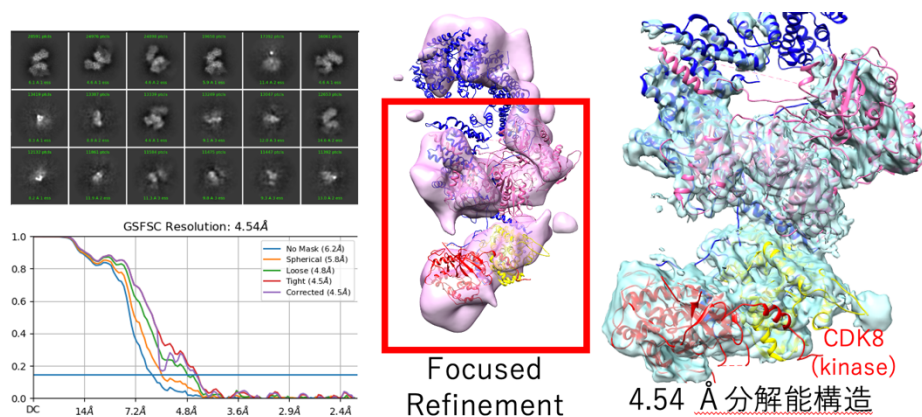


図 2: CDKM の構造解析

A. 組換えタンパク質発現系で調整した酵母 CDKM のクライオ電子線顕微鏡単粒子解析. 現在キナーゼドメイン(赤)を含む領域に焦点を当てた解析 (Focused Refinement) で 4.54 Å 分解能の解析に成功している (図右 シアン密度). 最近報告された酵母から精製された CDKM 構造を当てはめて見たところ, 非常にうまく当てはまる.

このように調製した CDKM を用いて SPring-8 の Thermo Fisher 製クライオ電子顕微鏡 Glaciuous を用い、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を行った。測定条件, Relion や CryoSPARC といった単粒子解析による解析条件の最適化を進め, 現在までに 4.54 Å 分解能の構造解析に成功している (図 2). これにより Med12 が CDKM 全サブユニットと相互作用し, 複合体を制御していること, さらに Med12 N 末端領域がキナーゼサブユニット CDK8 に相互作用し, キナーゼ構造を不活性型から活性型に変えている事が明らかにした (論文執筆中) CDKM の構造研究は, 熾烈で 2021 年 1 月に酵母のコアメディエーターについて全体構造が報告された (Li et al., Sci. Advance, 2021). この内容も踏まえ、タンパク質調整法の開発、構造解析について急ぎ論文文化を行っている。

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 2件）

1. 著者名 Wenzel Sabine, Imasaki Tsuyoshi, Takagi Yuichiro	4. 巻 28
2. 論文標題 A practical method for efficient and optimal production of Seleno methionine labeled recombinant protein complexes in the insect cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 808 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3575	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 Imasaki Tsuyoshi, Kikkawa S, Niwa S, Saijo-Hamano Y, Shigematsu H, Aoyama K, Mitsuoka K, Aoki M, Sakamoto A, Tomabechi Y, Sakai N, S M, Taguchi S, Yamagishi Y, Setsu T, Sakihama Y, Shimizu T, Nitta E, Takeichi M, Nitta R	4. 巻 0
2. 論文標題 CAMSAP2 organizes a γ -tubulin-independent microtubule nucleation centre	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife in press	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.03.01.433304	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 Taguchi Shinya, Nakano Juri, Imasaki Tsuyoshi, Kita Tomoki, Saijo-Hamano Yumiko, Sakai Naoki, Shigematsu Hideki, Okuma Hiromichi, Shimizu Takahiro, Nitta Eriko, Kikkawa Satoshi, Mizobuchi Satoshi, Niwa Shinsuke, Nitta Ryo	4. 巻 0
2. 論文標題 Structural model of microtubule dynamics inhibition by Kinesin-4 from the crystal structure of KLP-12 tubulin complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.02.14.480441	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今崎剛
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた In Situ 観察の生物学、医学への応用
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第 64 回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今崎剛
2. 発表標題 関西共創の場 第4回若手人材育成セミナー
3. 学会等名 微小管を軸とした細胞極性形成機構の解明に向けて
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今崎剛
2. 発表標題 Structural basis of microtubule dynamics inhibition by Kinesin-4
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今崎剛
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた In Situ 観察の生物学、医学への応用 ~実際の実験するとき気をつけていること~
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 生体解析分科会研究会 on-lineミニシンポジウム (Live) 「バイオ向けクライオ透過電子顕微鏡の多様性の最前線2」
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田中 啓二、若槻 壮市 編集、 仁田亮、今崎剛 著	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 248
3. 書名 イメージング時代の構造生命科学	

1. 著者名 小室一成編集, 今崎剛, 仁田英里子, 仁田亮 著	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 210
3. 書名 Cutting Edge of Molecular Cardiology 新しい臨床を開拓するための分子循環器病学, chapter2, 分子構造解析で何が見えるか	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------