

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06041・19K21175

研究課題名(和文)クロマチン構造依存的な転写活性化機構の解明

研究課題名(英文)Structural bases of transcriptional regulation by chromatin conformation

研究代表者

野澤 佳世 (Nozawa, Kayo)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：10808554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写メディエーター(Med)はRNAポリメラーゼIIのC末端領域(Pol II CTD)を介してプロモーターに結合し、そのCTDをTFIIHキナーゼに提示することで転写を誘起する。本研究では転写開始時に起こるMedの構造変換を再現するためにMedとCTDを融合させた複合体を作成し、X線小角散乱解析を行った。その結果、リン酸化によってMedがCTDから外れる瞬間を可視化することができた。また、Pol IIの精製系とTFIIHキナーゼの発現系を樹立し、MedがPol IIのリン酸化に与える影響を評価したところ、リコンビナントに調製したMedでもリン酸化効率を10倍程度上昇させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを構成する約2万種類のタンパク質の情報はDNAに保存され、Pol IIの働きでmRNAに転写されることで初めて、その設計図として機能する。しかし、設計図は必要な時に作られなければ細胞の秩序が壊れ、生命活動を維持することはできない。このPol IIの機能の「オン」、「オフ」を制御しているのが、Medによって誘起されるクロマチンの構造変換やPol II CTDのリン酸化パターンである。本研究で得られた成果をさらに生化学実験にフィードバックすることで、転写に関わる細胞分裂の異常や癌化についても、新たな知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mediator binds to the promoter through the C-terminal region of RNA polymerase II (Pol II CTD) and presents the CTD to TFIIH kinase to induce transcription. In this study, we constructed a fusion protein of Med-complex and CTD and performed small-angle X-ray scattering analysis to visualize the structural transformation of Mediator that occurred at the initiation of transcription. It was observed that CTD detach from Mediator upon phosphorylation. Furthermore, to test if Mediator stimulates Pol II CTD phosphorylation by TFIIH kinase, Pol II and TFIIH kinase were successfully expressed, purified, and subjected to the kinase assay. It was observed that the recombinantly prepared Mediator protein increased the phosphorylation efficiency by 10-fold.

研究分野：構造生物学

キーワード：クロマチン 転写 RNAポリメラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命の部品であるタンパク質の情報は、遺伝子 DNA に保存され、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) の働きによって、設計図となる mRNA へと抽出される。mRNA や遺伝子発現のオン・オフを切り替える small RNA の合成は、Pol II が種々の転写因子と共同しながら、開始・伸長・終結の転写サイクルで働くことで可能となる。しかし、Pol II や転写因子だけでは、細胞の分化や生育、発生状態に応じた転写制御を行うことはできない。転写メディエーター (Med) は、転写開始領域から数千 bp も離れた、アクチベーター DNA (高等生物におけるエンハンサー) と転写マシーナリーを直接繋ぐことによって、ほとんどすべての遺伝子を活性化する重要な転写コファクターである。出芽酵母において、Med は 1.4 MDa、25 サブユニットから構成される超分子複合体であり、ヘッド、ミドル、テール、キナーゼの 4 つのモジュールからなる、その構造のほとんどが、菌類、植物、動物で高度に保存されている。近年の生化学的、構造生物学的アプローチにより、Med のモジュールのうち、ヘッドとミドルは、Pol II と基本転写因子 TFIID、TFIIB、TFIIE、TBP に直接作用して、転写開始前複合体 (PIC) をプロモーター領域ヘリクルートする機構が明らかになってきた。さらに Med は、PIC のアッセムブリーが完了すると、TFIIH キナーゼによる Pol II Rbp1 サブユニットの C 端ドメイン (CTD) のリン酸化活性を促進して、Pol II のプロモーターからの遊離と、伸長状態への変換をもたらす。これまでに多くの研究室が Med の構造・機能解析に取り組んできたが、その巨大な複雑さ故に研究は難航しており、Med がどのようにして、転写システムの綿密な制御を行っているかは、長い間不明だった。

2. 研究の目的

本研究では構造生物学的アプローチと生化学解析を組み合わせることにより、Med の機能メカニズムを理解することを目指す。また近年、PIC の転写開始領域へのリクルートには、Med とその上流のヌクレオソームの構造が関係していることが示唆されている。これを受けて本研究では、Med とヒストンの相互作用や Med 依存的なクロマチン構造変換機構についても解析したいと考えている。この研究が実現すれば、未だ謎の多いクロマチン構造依存的な転写制御機構が明らかになるとともに、Med の異常が引き起こす、細胞分裂の異常や癌化に関しても新たな知見がもたらされることが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、(1) Med がどのようにして、TFIIH キナーゼによる Pol II CTD のリン酸化活性を促進するのかを明らかにするとともに、(2) Med によってもたらされるクロマチン構造変換が Pol II の転写に与える影響を評価したいと考えている。(1) では Pol II CTD の Med 上の正確な結合位置を明らかにするために、Med の機能最小単位である cMed のサブユニットに Pol II CTD を直接フュージョンさせた複合体を調製し、Med 上に CTD を固定した状態で構造機能解析を行う。cMed は分裂酵母由来のものを大腸菌で発現させて用いる。Pol II CTD と Med の複合体が可視化されれば、この構造を PIC の電子顕微鏡像にフィッティングすることによって、TFIIH キナーゼの促進メカニズムを明らかにする。提唱されたモデルを検証するために、構造をベースに Med 変異体を作成し、CTD のリン酸化効率も測定する。リン酸化アッセイには、TFIIH キナーゼも必要であるため、その発現系の構築も行う。(2) では、Pol II の結合の足場となる DNA リンカーを含むヌクレオソームの調製法を確立するとともに、出芽酵母から内因性の Pol II を精製する方法を確立し、転写実験を行いたいと考えている。Pol II とヌクレオソームテンプレートが調製できれば、出芽酵母由来の cMed も調製し、転写アッセイに加えることで、cMed が転写に与える影響を評価できると考えている。Pol II から転写された産物はプライマーに結合させた蛍光色素 Cy5 で定量的に検出する。cMed が Pol II、ヌクレオソームと安定な複合体を形成するようであれば、構造解析も試みたいと考えている。

4. 研究成果

初年度は、Pol II CTD を Med 上に固定するために Pol II CTD を Med サブユニットの C 末端に直接融合させたコンストラクトを作成し、発現させることに成功した。先行研究の転写開始複合体の電子顕微鏡像を指標に Pol II の C 末端と近接している Med サブユニットを同定し、そのうち Med6 全長、Med6 C、Med8 全長に遺伝子全合成で作製した Pol II CTD の遺伝子 (YSPTSPS の 8 回リピート) をタンパク質の C 末端領域に挿入した。この 3 つのフュージョンタンパク質遺伝子それぞれを、これまでに構築した 16 サブユニットの分裂酵母 cMed 複合体の発現ベクターに導入し、大腸菌での大量発現を行った。発現条件の検討の結果、10 L の培養液から 2 mg 程度の変異複合体タンパク質を精製することができた。また、クロマチン構造と転写開始機構の関係性を解析するために、ヌクレオソームの再構成技術を習得した。大腸菌で発現させた 4 種類のヒストンタンパク質を等モル比で混合し、ゲルろ過クロマトグラフィーで 8 量体複合体を単離したのち、ヌクレオソーム 1 個分に相当する 145 bp の Widom601 DNA 配列と複合体を形成させ、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。最終精製産物について、SDS PAGE と Native PAGE でクオリティーチェックを行った結果、DNA、1 分子に対して、

H2A、H2B、H3、H4 ヒストンタンパク質を 2 分子ずつ含むヌクレオソーム複合体であることが確認され、1 mg の再構成系から 100 μg の高純度複合体を得ることができた。

最終年度では cMed と Pol II の相互作用領域を可視化するために、cMed に CTD と GST を融合させたタンパク質の構造機能解析を行った。初年度で分裂酵母由来 cMed-CTD 融合タンパク質を大腸菌で発現させることに成功したが、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析を試みても、残念ながら構造解析に至ることができなかった。そこで Med6 C 変異体に CTD-GST 融合させた cMed タンパク質を新たに調製し、CTD のリン酸化処理 (Med 非結合型)・非リン酸化処理 (Med 結合型)の試料を行い、X 線小角散乱解析を行った。その結果、CTD にリン酸化を受けた cMed-CTD は理論値に近い値を示すのに対し、非リン酸化状態の cMed-CTD は、大きな慣性半径を持つことが示された。本実験を通じて、CTD のリン酸化によって Med が Pol II から外れる転写開始制御を試験管内で再現することができたため、今後はこの構造変化を詳細に明らかにするための解析サンプルの最適化を行いとと考えている。また、Med と転写開始機構の関係性を解析するために、出芽酵母由来の内因性 Pol II の精製系を樹立した。ゲノム上の Pol II サブユニット Rpb3 遺伝子に TAP タグを導入した出芽酵母株を培養し、10 L 培養液から 50 μg の高純度タンパク質を獲得した。これに加え、昆虫細胞を用いて出芽酵母由来 TFIIH キナーゼ (Cdk7/cyclin H/MNAT1) についても発現系を樹立することができたため、大腸菌からリコンビナントタンパク質として精製した出芽酵母由来 cMed が Pol II のリン酸化を促進できるかどうかを評価した。Pol II CTD のリン酸化を Ser5 抗体で検出したところ、cMed を構成する Head モジュールや Middle モジュール単独ではリン酸化を促進しないのに対して、cMed を添加した場合は CTD のリン酸化が 10 倍も上昇することが明らかになった。この結果は cMed が TFIIH キナーゼのリン酸化を促進できる機能最小単位であることを示すと同時に、リコンビナントに発現させた cMed でも生体内で起こる転写開始反応を再現できることを示した最初の結果である。この成果については、昨年度の生物物理学会、タンパク質科学会、アジア結晶学会でも発表を行った。今後はクロマチン構造と転写開始機構の関係性を解析するために、ヌクレオソームをテンプレートとして Pol II の転写実験を行い cMed やリン酸化が与える影響を構造生物学的に解明していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura Masahiro, Nozawa Kayo, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Crystallographic analysis of the overlapping dinucleosome as a novel chromatin unit	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.15.0_251	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 胡桃坂 仁志、有村 泰宏（2章4節を申請者が担当）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 186
3. 書名 あなたのタンパク質精製、大丈夫ですか？	

〔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
---------------------------	-----------------------	----