

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440022

研究課題名(和文) Tup1-Cyc8コリプレッサー複合体の構造機能解析

研究課題名(英文) Structure-function analysis of Tup1-Cyc8 corepressor

研究代表者

松村 浩由 (Matsumura, Hiroyoshi)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：30324809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母Tup1-Cyc8複合体は、Tup1 4分子とCyc8 1分子とが結合した分子量約400kDaの転写抑制因子である。本研究では、Tup1-Cyc8複合体がどのように標的分子と相互作用し、機能を発揮するのかを解明することを目的とする。具体的には、Tup1-Cyc8複合体の立体構造をX線結晶構造解析とX線溶液散乱法とを組み合わせた方法で解明し、さらに立体構造を基盤として酵母を用いた機能解析を行った。さらに、そして、これまで達成することができなかったTup1全長の発現・精製を行って構造機能解析の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：The yeast Cyc8p-Tup1p protein complex is a general transcriptional corepressor of genes involved in many physiological processes. In this study, we analyze the structure and function of Cyc8p-Tup1p protein complex using X-ray crystallography and small angle X-ray scattering. Based on the three-dimensional structure, we mutated Tup1p and characterized the Cyc8p and Tup1p function. Furthermore, we succeeded to express and purify the full-length Tup1p using cold-shock yeast expression system.

研究分野：生物学

キーワード：Tup1-Cyc8 コリプレッサー 構造と機能

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 Tup1-Cyc8 複合体は、Tup1 4 分子と Cyc8 1 分子とが結合した分子量約 400kDa の転写抑制因子である。本複合体は、転写因子の中でも特に医学・生理学的に重要であり (Nature, 369, 758, 1994) 例え、ショウジョウバエの Tup1 ホモログ Groucho は発生と分化の制御に関与し (Gene Dev., 12, 1931, 1998) ヒトの Tup1 ホモログ TLE の機能を失った細胞はガン化する (Gene Dev., 14, 1837, 2000) さら、酵母 Tup1-Cyc8 は、性分化、DNA 損傷、浸透圧ストレス、グルコース、酸素により制御される多様な遺伝子の転写抑制に必須である (EMBO J., 17, 2543, 1998) 。

このように Tup1-Cyc8 複合体は機能解析が積極的に進められてきた蛋白質であるが、一方で Tup1-Cyc8 複合体の立体構造情報が不足しているため、その分子機構の理解は乏しい。

2012 年、申請者らは Tup1 の四量体形成に必要な Tup1 の N 末端ドメイン (Tup1N) の立体構造を世界に先駆けて報告し (J. Biol. Chem., 287, 26528, 2012) Tup1 の四量体がコイルドコイル構造で安定化され、dimer of dimers で機能している可能性を示した。ただし、これらドメインの解析では「Tup1-Cyc8 の転写抑制機能の分子機構」についての明確な知見は得られなかった。

2. 研究の目的

上述のような背景を鑑み、本研究では、Tup1-Cyc8 複合体がどのように標的と相互作用し、機能を発揮するのかを解明することを目的とする。具体的には、Tup1-Cyc8 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱法とを組み合わせた方法での解明、立体構造情報を元にした機能解析、並びに従来達成不可能とされていた Tup1 全長の発現・精製を行った。

3. 研究の方法

Tup1N と Cyc8 の N 末端領域 (Cyc8N) をそれぞれ大腸菌を用いて生産し、カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。その後、Tup1N 四量体と Cyc8 を 1:4 で混合し、蒸気拡散法 (0.6 M Magnesium sulfate, 0.1 M HEPES sodium pH 7.5, 4% (v/v) 2-Methyl-2,4-pentanediol) によって結晶化を行ったところ、結晶が得られ、5Å 分解能の回折強度データを収集した。

さらに Tup1N, Cyc8N, Tup1N-Cyc8N 複合体の構造の性状解析を X 線小角散乱法によって行った。Tup1N の立体構造は X 線結晶構造解析で決定済みであるが、溶液中で重合している様子が確認でき、Cyc8N は Tup1N を取り囲むような構造をしていることが分かった。

Tup1N の構造情報を用いて、74-76 アミノ酸部位を変異した変異体を作製し、RT-PCR によって機能解析を行った。

さらに、Tup1 全長の発現と精製に取り組んだ。Tup1 全長の発現は大腸菌や通常の酵母発

現系では困難であったが、産総研グループが開発してきた低温発現誘導酵母を用いて発現したところ、Tup1 の発現が確認できた。さらに種々のクロマトグラフィーによる精製に取り組んだ。

4. 研究成果

Tup1 の N 末端領域 (Tup1N) と Cyc8 の複合体の結晶化を行った。しかし、構造解析可能な良好な回折強度データが得られなかったため、X 線小角散乱法を用いて低分解能での構造解析に取り組んだ。まず、Cyc8 単体での構造解析に取り組んだところ、Cyc8 は多量体を形成し、Tup1 を取り囲むような構造をしていることが示唆された。厳密に何量体を形成しているかといったストイキオメトリーを決定するためには更なるデータ収集が必要であるが、もし Cyc8 が単体のときと同様な形を保持して Tup1 と結合しているとすれば、私達が以前報告した Tup1 変異体の実験結果と合致している。

機能解析について、Tup1 の N 末端領域 (1-92 アミノ酸) に含まれる 74-76 アミノ酸位の 3 連続グルタミン酸 (EEE) が転写抑制に重要な機能をもつことをアラニン置換変異株を用いて示した。さらに、3 連続グルタミン酸をすべてグルタミン (QQQ) あるいはアスパラギン酸 (DDD) に置換した変異株を作製し、接合型、凝集性および標的遺伝子の転写抑制能を定量化した。tup1-QQQ 変異株は野生型 TUP1 株と同じ転写抑制能を示したのに対して、tup1-DDD 変異株は tup1-AAA 変異株と同様に tup1 遺伝子破壊株と野生型株の中間程度の転写抑制能を示した。従って、Tup1N の 3 連続グルタミン酸はその負電荷ではなく、その側鎖長が転写抑制に重要であると結論した。ヒストンと相互作用すると報告されている中央領域 (93-281 アミノ酸) を欠失させた tup1 変異株が、意外なことに野生型株と同様にプロモーター領域をヘテロクロマチン状態に維持することを明らかにした。この結果は、Tup1 がヒストンとの相互作用と介せず転写抑制するのか、あるいは Tup1 が中央領域以外の領域でヒストンと相互作用するのかを示唆した。

さらに、Tup1 全長の発現・精製については、低温発現誘導酵母を用いて発現し、その後、Ni アフィニティークロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーの精製ステップを経ることによって、高純度 Tup1 を mg オーダーで得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

(1) Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient

- interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins
Takaaki Sato, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa, Makoto Emura, Shigeyoshi Itoharu, Takashi Kawasaki, Akio Tsuboi, Hiroyoshi Matsumura
Receptors Clin. Invest., 3, e1117, (2016)
DOI: 10.14800/rci.1117. 査読有
- (2) Epiregulin recognition mechanisms by anti-epiregulin antibody 9E5: Structural, functional and molecular dynamics simulation analyses
Yuji Kado, Eiichi Mizohata, Satoru Nagatoishi, Mariko Iijima, Keiko Shinoda, Takamitsu Miyafusa, Taisuke Nakayama, Takuma Yoshizumi, Akira Sugiyama, Takeshi Kawamura, Young-Hun Lee, Hiroyoshi Matsumura, Hirofumi Doi, Hideaki Fujitani, Tatsuhiko Kodama, Yoshikazu Shibasaki, Kouhei Tsumoto and Tsuyoshi Inoue
J. Biol. Chem., 291, 2319-2330 (2016).
DOI: 10.1074/jbc.M115.656009. 査読有
- (3) Yeast Cyc8p and Tup1p proteins function as coactivators for transcription of Stp1/2p-dependent amino acid transporter genes
Naoko Tanaka, Yukio Mukai
Biochem. Biophys. Res. Commun., 468, 32-38 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.001. 査読有
- (4) Insights into unknown foreign ligand in copper nitrite reductase
Yohta Fukuda, Tse Ka Man, Yuji Kado, Eiichi Mizohata, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue
Biochem. Biophys. Res. Commun., 464, 622-628 (2015). DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.025. 査読有
- (5) Development of protein seed crystals reinforced by high-strength hydrogels
Shigeru Sugiyama, Noriko Shimizu, Keisuke Kakinouchi, Osamu Hiraoka, Hiroyoshi Matsumura, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoshinori Takahashi, Mihoko Maruyama, Masashi Yoshimura, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Michio Murata, and Yusuke Mori 査読有
CrystEngComm, 17, 8064-8071 (2015).
DOI: 10.1039/C5CE00844A
- (6) Selective crystallization of metastable phase of acetaminophen by ultrasonic irradiation
Yoichiro Mori, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Kenji Ikeda, Suguru Fukukita, Hiroshi Y. Yoshikawa, Shino Okada, Hiroaki Adachi, Shigeru Sugiyama, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Masashi Yoshimura, and Yusuke Mori
Appl. Phys. Express, 8, 065501 (2015).
DOI: 10.7567/APEX.8.065501 査読有
- (7) Structure-based design of a streptavidin mutant specific for an artificial biotin analogue
Tatsuya Kawato, Eiichi Mizohata, Yohei Shimizu, Tomohiro Meshizuka, Tomohiro Yamamoto, Noriaki Takasu, Masahiro Matsuoka, Hiroyoshi Matsumura, Tatsuhiko Kodama, Motomu Kanai, Hirofumi Doi, Tsuyoshi Inoue, and Akira Sugiyama
J. Biochem., 157, 467-475 (2015). DOI: 10.1093/jb/mvv004 査読有
- (8) Structure-based design and synthesis of a bivalent iminobiotin analogue showing strong affinity toward a low immunogenic streptavidin mutant
Tatsuya Kawato, Eiichi Mizohata, Yohei Shimizu, Tomohiro Meshizuka, Tomohiro Yamamoto, Noriaki Takasu, Masahiro Matsuoka, Hiroyoshi Matsumura, Tatsuhiko Kodama, Motomu Kanai, Hirofumi Doi, Tsuyoshi Inoue, and Akira Sugiyama
Biosci. Biotechnol. Biochem., 79, 640-642 (2015). DOI: 10.1080/09168451.2014.991692. 査読有
- (9) The N-terminal acidic residue of the cytosolic helix 8 of an odorant receptor is responsible for different response dynamics via G-protein
Takashi Kawasaki, Takahiro Saka, Shouhei Mine, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Hiroyoshi Matsumura, and Takaaki Sato
FEBS Lett., 589, 1136-1142 (2015). DOI: 10.1016/j.febslet.2015.03.025. 査読有
- (10) Excimer emission properties on pyrene-labeled protein surface: Correlation between emission spectra, ring stacking modes, and flexibilities of pyrene probes
Akira Fujii, Yutaka Sekiguchi, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Wen-Sheng Chung, Shun Hirota, and Takashi Matsuo
Bioconjugate Chem., 26, 537-548 (2015). DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00026. 査読有
- (11) A comparative analysis of microgravity and earth grown thermostable T1 Lipase crystals using HDPCG apparatus
Raja Noor Zaliha Raja Abd Rahman*, Mohd. Shukuri Mohamad Ali, Shigeru Sugiyama, Adam Thean Chor Leow, Tsuyoshi Inoue, Mahiran Basri, Abu Bakar Salleh, and Hiroyoshi Matsumura
Protein Pept. Lett., 22, 173-179 (2015). DOI: 10.2174/0929866521666141019193604 査読有
- (12) Structural basis for the recognition-evasion arms race between Tomato mosaic virus and the resistance gene Tm-1
Kazuhiro Ishibashi, Yuichiro Kezuka,

- Chihoko Kobayashi, Masahiko Kato, Tsuyoshi Inoue, Takamasa Nonaka, Masayuki Ishikawa, Hiroyoshi Matsumura, and Etsuko Katoh
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111, E3486-E3495 (2014). DOI: 10.1073/pnas.1407888111 査読有
- (13) Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*
Junso Fujita, Yoko Maeda, Chioko Nagao, Yuko Tsuchiya, Yuma Miyazaki, Mika Hirose, Eiichi Mizohata, Yoshimi Matsumoto, Tsuyoshi Inoue, Kenji Mizuguchi, and Hiroyoshi Matsumura
FEBS Lett., 588, 1879-1885 (2014). DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.008. 査読有
- (14) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of FtsA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
Junso Fujita, Yuma Miyazaki, Mika Hirose, Chioko Nagao, Eiichi Mizohata, Yoshimi Matsumoto, Kenji Mizuguchi, Tsuyoshi Inoue, and Hiroyoshi Matsumura
Acta Cryst., F69, 895-898 (2013). DOI: 10.1107/S1744309113017727. 査読有
- 〔学会発表〕(計 18 件)
- (1) 松村 浩由
融合集散する柔らかいタンパク質の構造機能解析
蛋白研セミナー、東京大学先端科学技術研究センター(東京都、目黒区) 2016.3.1
- (2) 田中直子、向由起夫
出芽酵母コリプレッサーTup1pのヒストン結合領域がもつ新たな役割
日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015.12.1
- (3) 竹下将平、田中直子、向由起夫
コリプレッサーTup1pの4-ヘリックスバンドル領域における3連続グルタミン酸の機能解析
Yeast Workshop、せとうち児島ホテル(岡山研倉敷市) 2015.11.13
- (4) 藤田純三、前田陽子、斎藤有紀、溝端栄一、井上豪、松村浩由
黄色ブドウ球菌由来細胞分裂タンパク質 FtsZ の構造変化機構
日本結晶学会年会、大阪府立大学(大阪府堺市) 2015.10.17
- (5) 田中直子、布施智博、清水光弘、向由起夫
出芽酵母コリプレッサーTup1 によるヒストン結合を必要としない転写抑制機構
日本分子生物学会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014.11.26
- (6) 竹下将平、田中直子、向由起夫
出芽酵母コリプレッサーTup1 の 4 ヘリックスバンドル領域における3連続グルタミン酸の機能解析
日本分子生物学会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014.11.26
- (7) 竹下将平、向由起夫
コリプレッサーTup1pの4-ヘリックスバンドル領域における3連続グルタミン酸の機能解析
Yeast Workshop、ビューポートくれ(広島県呉市) 2014.11.14
- (8) 藤田純三、前田陽子、斎藤有紀、清水伸隆、野田勝紀、長尾知生子、土屋裕子、溝端栄一、内山進、松本佳巳、水口賢司、井上豪、松村浩由
MRSA 由来細胞分裂タンパク質 FtsA の構造 - 機能相関解析
日本結晶学会、東京大学農学部(東京都文京区) 2014.11.1
- (9) 田中直子、田井晶子、向由起夫
出芽酵母コリプレッサー複合体 Cyc8-Tup1 はトリプトファン取込み酵素遺伝子 TAT1 と TAT2 の転写活性化に必要である
日本遺伝学会、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市) 2014.9.19.
- (10) 田中直子、布施智博、清水光弘、向由起夫
ヒストン結合領域を欠失したコリプレッサーTup1の機能解析
酵母遺伝学フォーラム、東京大学弥生講堂(東京都文京区) 2014.9.1
- (11) 藤田純三、前田陽子、宮崎裕満、廣瀬未果、溝端栄一、井上豪、松村浩由
MRSA 由来細胞分裂タンパク質 FtsA の X線結晶構造解析
日本蛋白質科学会、ワークピア横浜(神奈川県横浜市) 2014.6.25
- (12) 松村浩由
結晶解析と溶液散乱による相関解析
タンパク質 X線溶液散乱講習会、高エネルギー加速器研究機構(茨城県つくば市) 2014.5.22
- (13) 松村浩由、清水伸隆、木津奈津子、吉田将康、荒武将弘、溝端栄一、田茂井政弘、和田野晃、重岡成、井上豪
CP12-GAPDH-PRK 複合体形成によるカルビン回路調節機構の解明
日本農芸化学会大会、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市) 2014.3.28
- (14) 松村浩由、清水伸隆、木津奈津子、吉田将康、荒武将弘、溝端栄一、田茂井政弘、和田野晃、重岡成、井上豪
CP12-GAPDH-PRK 複合体形成によるカルビン回路制御の構造的基盤
日本植物生理学会年会、富山大学五福キャンパス(富山県富山市)、2014.3.18
- (15) 田中直子、向由起夫
酵母コリプレッサーTup1 ヒストン結合領域の機能解析
日本分子生物学会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2013.12.4

- (16) 松村浩由
カルビン回路調節システムの構造基盤
アグリバイオシンポジウム 2013、近畿大
学農学部（奈良県奈良市）、2013.11.30
- (17) Hiroyoshi Matsumura, Nobutaka Shimizu,
Tsuyoshi Inoue
SAXS and XRD analysis of the Calvin
cycle regulatory complexes
日本生物物理学会年会、国立京都国際会
館（京都府京都市）、2013.10.28
- (18) 田中直子、向由起夫
Candida albicans Tup1 コリプレッサーの
機能解析
酵母遺伝学フォーラム、東北学院大学土
樋キャンパス（宮城県仙台市）、2013.9.8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 浩由 (MATSUMURA HIROYOSHI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：30324809

(2) 研究分担者

向 由起夫 (MUKAI YUKIO)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授
研究者番号：60252615

佐原 健彦 (SAHARA TAKEHIKO)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部
門・主任研究員
研究者番号：40357166

森田 直樹 (MORITA NAOKI)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部
門・研究グループ長
研究者番号：60371085