

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 7 日現在

機関番号：82118

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882050

研究課題名(和文)LRH-1の  $\beta$ -カテニンによる転写活性化機構の分子メカニズム解析研究課題名(英文)Analysis in molecular mechanism of transcriptional activation of LRH-1 by  $\beta$ -catenin

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：LRH-1は初期発生で重要な役割を担い、また肝臓、膵臓、卵巣、などで遺伝子発現制御を担っている核内受容体の1つの転写因子である。また、癌との関連も指摘されている。これまでに大腸菌を用いた大量発現系を用い、ヒトLRH-1の全長タンパク質(4ドメイン)とN末端ドメインを削ったタンパク質の調製を行って、2重鎖DNAとの複合体を調製した。2重鎖DNAと混合し、複合体形成を行うことによって、結晶化やX線溶液散乱解析が可能なサンプルとして調製することが可能である。SAXS解析の結果、N末端ドメインがある場合、ない場合、共に全体として細長い分子形状をもつことが示唆された。これまでに結晶は得られていない。

研究成果の概要(英文)：LRH-1 plays an essential role in early development as it is expressed in embryonic stem cells. It is a transcription factor expressed in liver, pancreas, and ovary to regulate gene expressions. In addition to the biological aspect, it has been recognized as a drug target because the receptor is involved in multiple cancer developments. Full-length LRH-1 and N-terminal region-truncated LRH-1 were produced in *E. coli* and complexes of the protein-DNA duplex were further purified by gel filtration after elution from Ni-NTA column. The complex formation with DNA was critical to handle the sample for structural study and for biochemical characterization. LRH-1-DNA-peptide ternary complex was also prepared. The samples have been tested in small angle X-ray scattering and crystallization with the samples. The results suggested that the both LRH-1 molecules such as full-length and N-terminal truncated version had "bar" type shape.

研究分野：構造生物学

キーワード：LRH-1 X線結晶構造解析 X線小角散乱解析

## 1. 研究開始当初の背景

Liver receptor Homologue-1 (LRH-1, NR5A2) は初期発生で重要な役割を担い、また肝臓、膵臓、卵巣、などで遺伝子発現制御を担っている核内受容体 (Nuclear Hormone Receptor) の 1 つの転写因子である。胚性幹細胞 (ES 細胞) において、Oct4 の発現制御も行っていることが示されており、また人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の誘導の因子にも成りうることを示されるなど、幹細胞との関わりも深いタンパク質である。この転写因子はステロイドの代謝やコレステロール、胆汁酸のホメオスタシスにも関わっていることが知られている。さらに、乳癌、すい臓癌といった様々な癌との関連も報告されており、LRH-1 をターゲットにした低分子化合物・薬剤スクリーニングも行われるなど、基礎生物学としてのみならず、医学や薬学の観点からも注目されている分子であると言える。LRH-1 は N 末端ドメイン、Zinc-finger と Ftz-F1 モチーフからなる DNA binding domain (DBD)、ヒンジ領域、Ligand Binding Domain (LBD) の 4 つのドメインから構成されている。また、Wnt シグナルに応答し、核内に移行した  $\beta$ -カテニンによって LRH-1 は転写調節能の活性化を受ける。この LRH-1 と  $\beta$ -カテニンの相互作用の詳細について調べるために、LRH-1 LBD と  $\beta$ -カテニンのアルマジロリピート領域との複合体として、X 線結晶構造解析を行い、相互作用に重要となるアミノ酸を明らかにした。さらに、それらの同定された相互作用界面についてさらにそれぞれのアミノ酸残基の役割について調べるために、プルダウンアッセイや培養細胞を使ったレポーターアッセイを行った (Yumoto *et al.* and Fletterick, PNAS, 2012)。しかしながら、これらはそれぞれ 1 つずつのドメインの相互作用様式を明らかにしたものであり、DNA 上でどのように LRH-1 が  $\beta$ -カテニンによって活性化を受けるのか、など不明な点も多く残されている。

## 2. 研究の目的

LRH-1 は  $\beta$ -カテニンによって転写活性化作用を受けることが知られており (Botrugno *et al.*, Molecular Cell, 2004)、その分子機構としてはこれまでに LRH-1 の LBD と  $\beta$ -カテニンのアルマジロリピート領域との相互作用について原子レベルで相互作用様式を明らかになっている (Yumoto *et al.*, PNAS, 2012)。しかしながら、LRH-1 は本来、N 末端ドメイン、DNA 結合ドメイン、ヒンジ領域、そして LBD から構成されるマルチドメインタンパク質であり、DBD を介して DNA に結合し、転写因子としてはたらいっている。現時点では、これまでに DBD や LBD 単独での結晶構造は明らかにされてきているが (Fig. 1A)、全長としての報告はされてきて

いない。これらの情報に基づくと、Fig. 1B に示されたようにしたがって、これまでのようにドメインレベルではなく全長 LRH-1 がレスポンスエレメントを含む DNA 重鎖との複合体として調製し、その複合体に対してコアクティベーターとして知られる  $\beta$ -カテニンを加えた、3 成分複合体の立体構造を明らかにすることによって、 $\beta$ -カテニンによる転写活性化の分子メカニズムの詳細を解明することを目的とする。

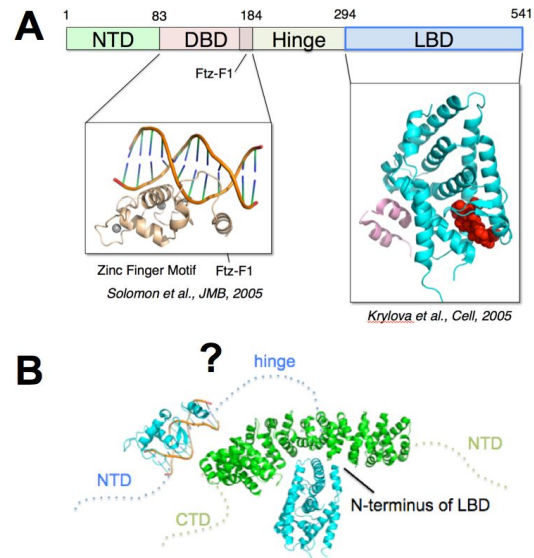


Fig. 1 (A) 全長 LRH-1 のドメイン構造と DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインの結晶構造解析 (B) ドメインレベルでの結晶構造に基づいた全長 LRH-1 と全長  $\beta$ -カテニンの複合体の想像図

さらに、核内受容体の転写活性化因子として知られ、また LRH-1 に結合することが明らかになっている SRC2 (Steroid Receptor Coactivator-2) に由来する LRH-1 結合領域 (ペプチド) もサンプル調製の際に導入する。

## 3. 研究の方法

ヒト全長 LRH-1 (541 アミノ酸残基、64 kDa) は既に大量調製系が構築されており、それを用いてタンパク質を調製する。宿主大腸菌として BL21(DE3) Star とヒト LRH-1 を導入した pRSF-2 Ek/LIC ベクターとの組み合わせにより、タンパク質調製を行う。またヒト  $\beta$ -カテニン (781 アミノ酸残基、85 kDa) は、大腸菌と pET46b Ek/LIC の組み合わせにより大量調製を行う。これらの分子は、N 末端に His6 タグをもち、このタグは TEV プロテアーゼにより切断することができる。大腸菌培養時には 37 °C で 4 時間ほど培養した後、16 °C に変更し、50 - 100  $\mu$ M イソプロピルチオ  $\beta$ -ガラクトピラノシド (IPTG) を使って目的タンパク質の発現誘導を行う。

このようにして得られた目的タンパク質を発現誘導した大腸菌ペレットを約 35 mL のバッファー（バッファー条件：20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Imidazole, 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM beta-mercaptoethanol, 1 mM CHAPS）を用いて菌体を懸濁し、ソニケーターを用いて、1分ずつ2回、合計2分間、細胞破碎を行う。その後、遠心により上清を確保し、Ni-NTA カラム (Qiagen) を用いて、アフィニティー精製を行う。この全長 LRH-1 タンパク質は Ni カラムで精製すると、カラムから溶出した際に、しだいに自己会合を起こし、白濁して沈殿してしまうことがわかっていることから、これを防ぐためにも、溶出し次第、LRH-1 のレスポンスエレメントを含む DNA2 重鎖のフラグメント (inhibin alpha プロモーターもしくは Cyp7A プロモーター) と混合し、複合体形成を行わせることによって、全長 LRH-1 サンプルを安定化し、AKTA システム (GE healthcare) を用い、ゲルろ過カラムによって LRH-1-DNA 複合体を精製していく。また、LRH-1 はコアクティベーターの SRC2 を結合し、転写活性化が引き起こされることが知られていることから、LRH-1 の LBD を介して結合することが知られている SRC2 由来のペプチドとの複合体形成も試みる。

また、このようにして得られた精製タンパク質サンプルを用い、高エネルギー加速器研究機構・構造生物実験準備棟内に設置されている大型自動結晶化装置を用いて、結晶化を試みる。

さらに、タンパク質-DNA 複合体サンプルについては、同じく高エネルギー加速器研究機構内の放射光施設 Photon Factory の BL-10C でタンパク質小角散乱解析 (SAXS) 実験を行い、散乱データを用いて、全長 LRH-1 と DNA からなる分子複合体の溶液構造のモデル化を試みる。

#### 4. 研究成果

大腸菌 BL21(DE3)Star 株、pRSF-2 Ek/LIC ベクターに TEV プロテアーゼ消化サイトを含むようにして構築した大量発現系を使って、ヒト LRH-1 の全長タンパク質 (4 ドメイン) と N 末端ドメイン (N ドメイン) を削ったタンパク質 (DBD + hinge + LBD, DhL と呼ぶ) についてタンパク質の大量調製を試みた。Ni-NTA カラムを使って精製した後、DNA2 重鎖と混合し、ゲルろ過カラム (Superdex200 10/30 (GE Healthcare)) により精製を行った (Fig. 1)。DNA としては Inhibin alpha のプロモーター領域から LRH-1 レスポンスエレメントを含む、24bp からなる 2 重鎖を調製し、この DNA 溶液を使って、Ni-NTA カラムから溶出後、直ちに、タンパク質溶液と DNA 溶液を混合し、複合体形成を行った。そして、そのサンプルについて、遠心式の限外濾過膜

(Amicon Ultra-15, 10 kDa カットオフ) を用いて、約 1 mL まで濃縮し、AKTA システム (GE healthcare) につないだ Superdex 200 (10/30) カラムに通し、Fig. 2 に示されたように、ゲルろ過のプロファイルを得て、それぞれのフラクションについて SDS-PAGE でサンプルの質を確認した。全長タンパク質が切断されたと考えられる LRH-1/DNA 複合体のピークに相当するフラクションの内、デグラデーションが観察されているものは除き、前半のフラクションについて回収して、以降の実験に用いている。

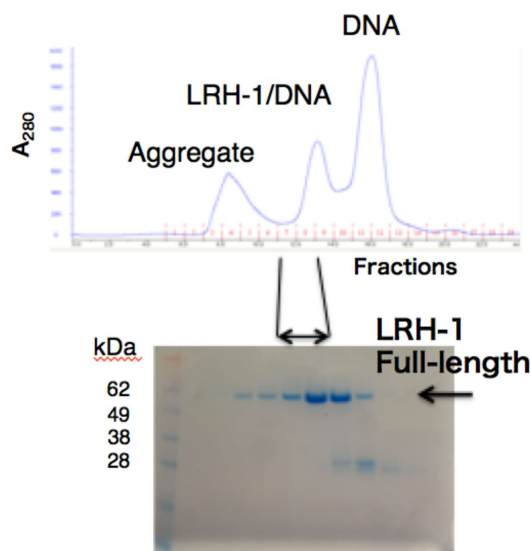


Fig. 2 ゲルろ過カラムによって精製された全長 LRH-1-DNA 複合体サンプルの SDS-PAGE 解析

また、全長 LRH-1 は DNA との複合体として調製した後、さらに SRC2 ペプチドを加えることで、3 成分複合体として、構造生物学研究センター内の大規模結晶化装置を用いて、結晶化条件のスクリーニングを行った。しかしながら、これまでのところタンパク質複合体の結晶は得られていない。

さらに、全長 LRH-1 分子と DNA との複合体について Photon Factory 内の BL-10C において、カメラ長 (1482 mm)、測定波長 1.488 Å、試料温度 20 °C、検出器、PILATUS 300 KW、露光時間 30 秒、測定枚数 10 枚として、また濃度条件 4 点について SAXS データの取得を行ったところ、プリリミナリーではあるが、現時点では、DNA を結合した全長 LRH-1 は細長い分子形状をもつことが示唆された。SAXS 解析によって得られたデータに基づいて、DAMMIN による Ab initio での形状推定も試みているところである。また全長 -カテニンについてはこれまでに精製は行うことができてきているが、全長 LRH-1 との複合体としての結晶化実験や SAXS 実験などは前述のような LRH-1 単独と DNA との複合体の実験に注力していた

こともあり、今後の課題として残っている。

また本全長 LRH-1 と DNA との複合体の構造解析としては、本課題代表者がカリフォルニア大学サンフランシスコ校 (UCSF) のロバート・フレッターリック研究室に在籍中に開始した仕事であり、ロバート・フレッターリック教授、エリーナ・サブリン博士、ローラ・カボニ博士、さらに、Joint Center for Structural Genomics (JCSG) のデバヌ・ダス博士、アシュリー・ディーコン博士 (SLAC National Accelerator Laboratory)、イアン・ウィルソン博士 (Scripps 研究所) との共同研究として、本研究課題代表者が確立したプロトコルに基づいてサンプル調製が行われ、SLAC National Accelerator Laboratory における放射光施設である Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL) での SAXS 実験や、Scripps 研究所との間で抗体も利用した電子顕微鏡解析も進められてきており、特に SAXS データに関しては、細長い分子形状をもつことが推定されており、Photon Factory で行った実験結果とも良い相関があることがわかった。

今後の方針としてはこれまでに確立してきたサンプル調製プロトコルを用い、LRH-1 全長とレスポンスエレメント DNA2 重鎖、さらには全長  $\beta$ -カテニンを調製し、これらの複合体形成を行い、さらにコアクティベーター SRC2 に由来するペプチドも含めて安定化した (LRH-1 は SRC2 由来のペプチドと相互作用することにより AF2 サイトが覆われることで全体として安定化することが知られている) これらの複合体として結晶化スクリーニング実験を行っていく予定である。また、同様にして調製したサンプルを用いて、SAXS 解析を行って、溶液構造の推定につなげていきたいと考えている。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計3件)

Fumiaki Yumoto, Linking Structure to Biological Function, Wakate International Symposium Discovery of Medical Science - WISDoMS - Invited talk, 2014.11.6, University of Tsukuba

Fumiaki Yumoto, Robert Fletterick  
Structural basis of transcriptional regulation by liver receptor homologue-1  
The 87th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, 2014.10.17, Kyoto International Conference Center

Fumiaki Yumoto, Robert Fletterick  
Structural basis of transcriptional co-activation of LRH-1 by beta-catenin  
The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2013.10.30, Kyoto International Conference Center

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織 (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・構造生物学  
センター・特任准教授