

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440025

研究課題名(和文) 転写活性化因子Sp1とTAF4の相互作用の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of interaction between transcriptional factors Sp1 and TAF4.

研究代表者

星野 大 (Hoshino, Masaru)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：70304053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの体は数十兆個もの細胞から形成されています。それらの細胞は基本的には全て同じ遺伝子をもっているにもかかわらず、目や筋肉などのさまざまな器官や組織となり、それぞれ特定の役割を果たしています。細胞がこのような異なる役割を果たすためには、遺伝子(DNA)に結合してそのはたらきを調節する「転写活性化因子」と呼ばれるタンパク質が重要であることが知られています。本研究では、Sp1とTAF4という二種類の転写活性化因子がどのように相互作用しているのかを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：The expression of eukaryotic genes is precisely controlled by specific interactions between general transcription initiation factors and gene-specific transcriptional activators. The general transcription factor TFIID plays an essential role in mediating transcriptional activation. On the other hand, biochemical approaches have shown that the promoter-specific transcriptional activator Sp1 interacts with one of the components of TFIID, the TBP-associated factor TAF4.

We herein report the structural details of the glutamine-rich domains (Q-domains) of Sp1 and TAF4. We found that the two Q-domains of Sp1 and four Q-domains of TAF4 were disordered under physiological conditions. We also quantitatively analyzed the interaction between the Q-domains of Sp1 and TAF4 by NMR and surface plasmon resonance, and detected a significant association between them.

研究分野：生物物理学

キーワード：転写因子 分子間相互作用 天然変性蛋白質 核磁気共鳴分光法 グルタミンリッチドメイン

1. 研究開始当初の背景

真核生物の発生や細胞の分化には、様々な遺伝子が適切な時期および部位で発現するように巧みに調節されることが重要である。この調節機構は、様々な転写活性化因子と、RNAポリメラーゼIIを転写開始点にリクルートする基本転写因子群との相互作用による。Sp1はそのような転写活性化因子のひとつであり、100を超える遺伝子の発現を調節している。分子生物学ならびに生化学的解析から、Sp1はホモオリゴマーを形成するとともに、基本転写因子群の一つであるTAF4と相互作用する事により標的遺伝子の転写を活性化すると考えられている。

多くの転写因子にはグルタミン残基を25%以上含む領域が存在することが知られている。これらの領域はグルタミンリッチドメイン(Qドメイン)と呼ばれ、代表的な転写活性化ドメインであると同時に、転写因子同士の相互作用に参与することが報告されている。Sp1とTAF4にはそれぞれ2つないしは4つのQドメインが存在する。これらのQドメインがSp1同士、ならびにSp1-TAF4間の相互作用に参与すると考えられているものの、構造生物学的解析はほとんどなされておらず、その相互作用の分子機構は未解明のままである。

2. 研究の目的

研究代表者によるこれまでの研究により、Sp1のホモオリゴマー化に関して以下の知見が得られている。

- Sp1のQBドメインは生理的条件下において特定の立体構造をもたないIntrinsically Disordered Proteins (IDPs) であること
- Sp1のQBドメイン間に非常に弱い ($K_a \sim 10^3 M^{-1}$) 相互作用が存在すること
- Sp1のQAドメイン間には相互作用は見られないこと
- QBドメインの分子中央からC末端にかけての領域が相互作用部位であること
- QBドメインは特定の立体構造をもたないまま相互作用すること

本研究は、研究代表者によるこれまでの研究をより発展させ、Sp1とTAF4間のヘテロな相互作用の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛋白質の調製

Sp1のQドメインを含む部分蛋白質(Sp1-QA, Sp1-QB, Sp1-QBn, Sp1-QBc)ならびにTAF4のQドメイン領域および保存領域(TAF4-Q12, TAF4-Q34, TAF4-CI)に関しては、ユビキチンとの融合蛋白質として大腸菌による大量発現系を構築した。得られた大量発現系により、 ^{15}N ならびに $^{15}N, ^{13}C$ 標識蛋白質を作製した。

(2) TAF4の構造解析

円二色性スペクトル(CD)を測定することにより、TAF4の二次構造を解析した。また、小角X線溶液散乱(SAXS)により、QBならびにTAF4の慣性半径および分子全体の形状を解析した。さらに、多次元NMR解析によりTAF4の三次構造を解析した。

(3) NMRによる滴定実験

^{15}N 標識したSp1-QA, Sp1-QB, Sp1-QBn, Sp1-QBcのそれぞれに対して、等モル量から3倍モル量の高濃度非標識TAF4蛋白質を添加し、ピーク強度ならびにピーク位置(化学シフト値)の変化によりTAF4との相互作用領域を同定した。同様に、 ^{15}N 標識したTAF4-Q12, TAF4-Q34, TAF4-CI蛋白質のそれぞれに対して等モルから3倍モル量の高濃度非標識Sp1-QB蛋白質を添加することにより、TAF4においてどの領域がSp1との相互作用に参与しているのかを残基レベルの分解能で明らかにした。

(4) 表面プラズモン共鳴による定量解析

Sp1とTAF4の相互作用を表面プラズモン共鳴により定量的に解析した。その際、C末端に付加したヒスチジンタグを利用することにより蛋白質の立体構造に対する影響を最小限に抑えつつ、Sp1-QBをセンサーチップに固定化した。

4. 研究成果

(1) TAF4の立体構造解析

TAF4には4つのQドメイン(Q1-Q4)と、その間に比較的長い保存領域(Conserved region I, CI)が存在する。はじめに、TAF4の4つのQドメインを全て含み、Sp1との相互作用に重要とされる領域(TAF4N/C)の 1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した(図1)。その結果、 1H 軸の分散が非常に悪く、全てのピークが7.5-8.5 ppmの間に集中して存在することが明らかとなった。このことは、アミド水素が水素結合すなわち特定の二次構造

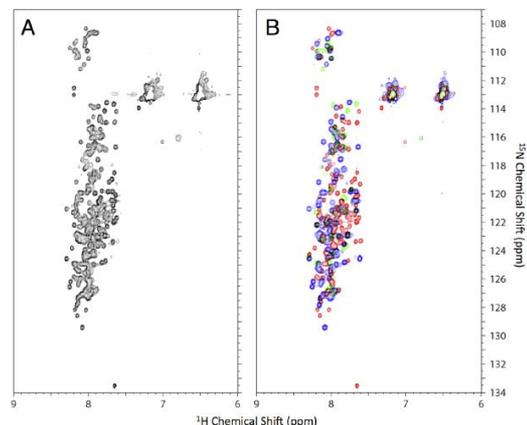


図1 (A) TAF4N/C全長の 1H - ^{15}N HSQC スペクトル (B) Q12(青)、Q34(赤)、CI(緑)の3つの部分蛋白質のスペクトルの重ね書き

を形成していないことを示唆する。更に、全長の蛋白質を3つの部分蛋白質に分断し、個別に測定したスペクトルは、全長のスペクトルとほぼ同一のスペクトルを示したことから、部分蛋白質間の遠距離相互作用が存在しないことが示唆された。これらの結果により、TAF4のQドメインは、生理的条件下において特定の立体構造をもたないIDPsであることが明らかとなった。

(2) 小角X線溶液散乱による解析

Sp1-QA、Sp1-QB、TAF4のそれぞれについて、分子全体の形状を解析するために小角X線溶液散乱実験を行った。GuinierプロットならびにKratkyプロットを図2に示す。

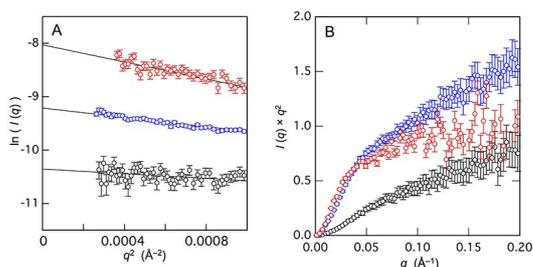


図2 小角X線溶液散乱による解析。(A) Guinierプロットならびに(B) Kratkyプロット。Sp1-QA(黒)、Sp1-QB(青)、TAF4(赤)。

Guinierプロットでは直線領域の傾きが分子の慣性半径の二乗に比例することが知られている。図2を解析することにより、Sp1-QA、Sp1-QB、TAF4の慣性半径はそれぞれ25.6、36.2、49.0 Åと見積もられた。これらの結果は、以前の報告ならびに(1)の結果とよく一致し、Sp1-QA、Sp1-QB、TAF4のいずれもが天然変性蛋白質であることを示唆する。また、Kratkyプロットの形状により、分子全体が水溶液中でほぼランダムコイル状態として存在することが示唆された。この結果も過去の報告ならびに(1)の観察結果とよく一致するものであった。

(3) TAF4とSp1-QA、QBとの相互作用解析

つぎに、¹⁵N標識したSp1-QAおよびSp1-QBに対して、非標識のTAF4を添加し、それぞれのスペクトルの変化を観察した(図3)。その結果、¹⁵N-Sp1-QAにおいては3倍モル量のTAF4を添加してもスペクトルに変化は見られなかった。

一方、¹⁵N-Sp1-QBに対して等モルの非標識TAF4を添加した場合は、いくつかの残基において顕著なピーク強度の減弱が観察された。ある特定の残基のみでピーク強度の減弱が見られたことから、これらの残基が特異的にTAF4との結合に関与していることが示唆された。

これらの結果により、Sp1に2つ存在するQドメインのうち、Sp1-QAではなくSp1-QBがTAF4との相互作用に特異的に関与してい

ることが示唆された。

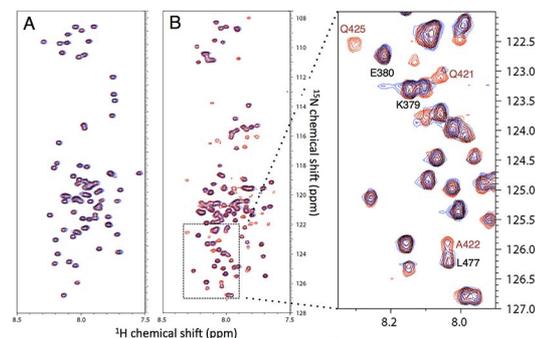


図3 ¹⁵N-Sp1-QA (A) および ¹⁵N-Sp1-QB (B) の¹H-¹⁵N HSQC スペクトル。非標識TAF4非添加(赤)およびTAF4添加時(青)のスペクトルの重ね書き。

(4) 表面プラズモン共鳴による相互作用の定量的解析

Sp1とTAF4の相互作用をより詳細に解析するために、表面プラズモン共鳴(SPR)による定量解析を行った。本手法では、相互作用する化合物のうち的一方を、センサーチップ表面に固定化する必要がある。Sp1とTAF4のように蛋白質間相互作用を解析する場合、固定化による立体構造への影響を考慮する必要がある。そこで、固定化による影響を最小限に抑えるために、精製のためにSp1-QBのC末端に付加したヒスチジンタグを固定化に利用することとした。図3に、センサーチップ表面に固定化したSp1-QBに対して、TAF4をフローセルにアプライした結果を示す。

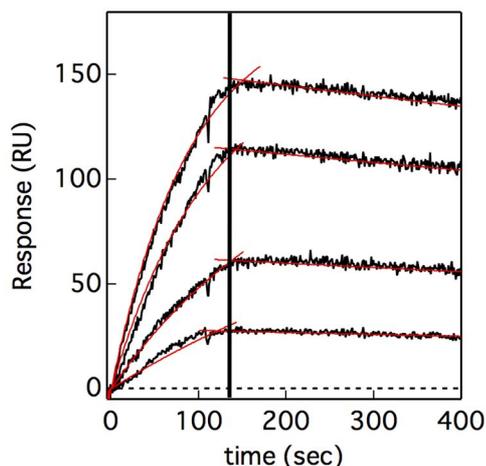


図4 センサーチップに固定化したSp1-QBに対して、様々な濃度のTAF4を添加し、両者の結合を検出した。120秒後に溶出バッファに切り替え、結合したTAF4が解離する反応を観測した。

図4の結果をグローバルフィッティングすることにより、Sp1-QBとTAF4との間の結合定数がおよそ $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であると見積もられた。一方、センサーチップにSp1-QAを

固定化して同様の実験を行った結果、TAF4 の添加によるシグナルの増大は検出されなかった。このことは (3) の NMR による解析と一致しており、Sp1-TAF4 間相互作用において QA ドメインはそれほど重要な役割を担っていないことを示唆する。

(5) TAF4 における Sp1 相互作用部位の同定

TAF4N/C 全長を、3つの領域にわけた断片蛋白質 (図1参照) のそれぞれを ^{15}N で標識し、 ^1H - ^{15}N スペクトルを測定するとともに、等モル~3倍モル量の非標識 Sp1-QB を添加することによりスペクトルに変化が見られるかを観察した (図5)

その結果、最も N 末端に近い断片蛋白質 TAF4-Q12 でのみ等モルの非標識 Sp1-QB の添加によりいくつかの特定のピークが顕著に移動することが明らかとなった。それに対し、C 末端側の TAF4-Q34 ならびに分子中央に存在する保存領域 TAF4-CI では3倍モル量の非標識 Sp1-QB を添加してもピーク強度ならびに化学シフト値 (ピーク位置) に変化は認められなかった。

更に、図5を詳細に解析した結果、非標識 Sp1-QB の添加により化学シフト値 (ピーク位置) が変化した残基は、4つある Q ドメインのうち最も N 末端に位置する Q1 ドメインに集中しており、Sp1 との相互作用において最も重要な領域であることが示唆された

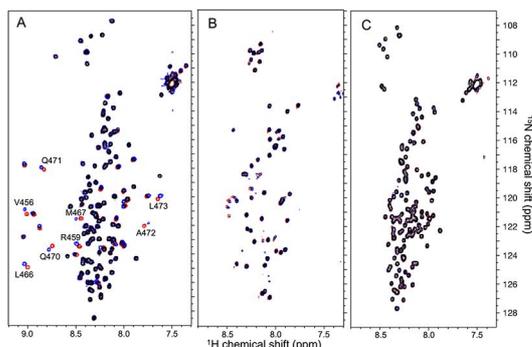


図5 ^{15}N -TAF4-Q12 (A)、 ^{15}N -TAF4-CI (B) および ^{15}N -TAF4-Q34 (C) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。非標識 Sp1-QB 非添加 (赤) および Sp1-QB 添加時 (青) のスペクトルの重ね書き。

(6) 結論

本研究により、Sp1 に2つ存在する Q ドメイン (QA および QB) ならびに TAF4 に4つ存在する Q ドメイン (Q1~Q4) のいずれもが、生理的条件下において特定の立体構造をもたない天然変性蛋白質であることが明らかとなった。

天然変性蛋白質同士であるにも関わらず、Sp1 と TAF4 は特異的に相互作用し、Sp1-QA ではなく Sp1-QB が Sp1-TAF4 間の相互作用に置いて重要な役割を担っていることが明らかとなった。さらに高分解能溶液 NMR による詳細な解析から、相互作用に参与する残基

は、Sp1-QB の中央から C 末端の領域に集中することが明らかとなった。

更に、表面プラズモン共鳴による解析から、Sp1-QB と TAF4 との相互作用はそれほど強固なものではなく、結合定数にしておよそ $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 程度であることが明らかとなった。

^{15}N で標識した TAF4 の断片蛋白質と非標識 Sp1-QB との相互作用を高分解能溶液 NMR で解析した結果、4つある Q ドメインのうち最も N 末端に位置する Q1 ドメインが相互作用部位であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

1. M. Hoshino (2016) Fibril formation from the amyloid-beta peptide is governed by a dynamic equilibrium involving association and dissociation of the monomer. *Biophys. Rev.* 1-8. (doi: 10.1007/s12551-016-0217-7)
2. E. Hibino, R. Inoue, M. Sugiyama, J. Kuwahara, K. Matsuzaki & M. Hoshino (2016) Interaction between intrinsically disordered regions in transcription factors Sp1 and TAF4. *25 (11) 2006-2017*. 査読有 (doi: 10.1002/pro.3013)
3. S. Ishino, Y. Kawata, H. Taguchi, N. Kajimura, K. Matsuzaki & M. Hoshino (2015) Effects of C-terminal Truncation of Chaperonin GroEL on the Yield of In-cage Folding of the Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* 290 (24) 15042-15051. 査読有 (doi: 10.1074/jbc.M114.633636)
4. D. Morimoto, E. Walinda, H. Fukada, Y. Sou, S. Kageyama, M. Hoshino, T. Fujii, H. Tsuchiya, Y. Saeki, K. Arita, M. Ariyoshi, H. Tochio, K. Iwai, K. Namba, M. Komatsu, K. Tanaka & M. Shirakawa (2015) The unexpected role of polyubiquitin chains in the formation of fibrillar aggregates. *Nat. Commun.* 6 (6116) 査読有 (doi: 10.1038/ncomms7116)
5. H. Ueno, T. Yamaguchi, S. Fukunaga, Y. Okada, Y. Yano, M. Hoshino & K. Matsuzaki (2014) Comparison between the Aggregation of Human and Rodent Amyloid beta-Proteins in GM1 Ganglioside Clusters. *Biochemistry* 53 (48) 7523-7530. 査読有 (DOI: 10.1021/bi501239q)

[学会発表] (計8件)

1. E. Hibino, J. Kuwahara, K. Matsuzaki & M. Hoshino, Interaction between intrinsically disordered regions in

transcription factors Sp1 and TAF4., XXVIIth Internatinal Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016 Aug. 21-26, Kyoto International Conference Center (京都府京都市)

2. 井濱 太、山本 麻実、宮田 愛彦、松崎 勝巳、星野 大、分子シャペロン Cdc37 のリン酸化による構造転移機構、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016年6月7日～9日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
3. Masaru Hoshino, The interaction between transcription factors Sp1 and TAF4 via the intrinsically disordered regions., Protein Structure and Function (IPR x RSC Joint Symposium), 2015 Nov. 14-16, Australian National University, (Camberra ACT, Australia)
4. 日比野 絵美、井上 倫太郎、杉山 正明、桑原 淳、松崎 勝巳、星野 大、Sp1 と TAF4 の天然変性領域を介した相互作用の解析、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24日～26日、あわぎんホール(徳島県徳島市)
5. Masaru Hoshino, New Insights into the Reaction Mechanism of Molecular Chaperone GroE., IPR symposium - Molecular Crowding and Macromolecular Association, 2015 Feb. 5, Institute for Protein Research, Osaka University (大阪府吹田市)
6. Masaru Hoshino, Aggregation mechanism of amyloid-beta peptide revealed by solution state NMR., JSPS Japan Hungary Joint Seminar, 2014 Nov. 17 ~ 21, Institute for Protein Research, Osaka University (大阪府吹田市)
7. 日比野 絵美、井上 倫太郎、杉山 正明、桑原 淳、松崎 勝巳、星野 大、転写因子 Sp1 と TAF4 の天然変性領域を介した相互作用、第 52 回日本生物物理学会年会、2014年9月25日～27日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
8. So Ishino, Yasushi Kawata, Hideki Taguchi, Katsumi Matsuzaki & Masaru Hoshino, Effect of C-terminal truncation of chaperonin GroEL on the yield of an in-cage folding of GFP., 第 52 回日本生物物理学会年会 2014年9月25日～27日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 大 (HOSHINO, Masaru)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号： 70304053

(4) 研究協力者

日比野 絵美 (HIBINO, Emi)

京都大学大学院薬学研究科・博士後期課程

(計 2 名)