

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24118005

研究課題名(和文) 静的・動的分子構造解析を基盤とした転写サイクル制御機構研究

研究課題名(英文) Regulation mechanism of a transcription cycle by static/dynamic structural analyses

研究代表者

緒方 一博(OGATA, Kazuhiro)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：90260330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 97,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞シグナルはタンパク質の化学修飾を情報伝達手段とし、核内で転写制御情報に変換される。この分子機構を明らかにするため、我々は、転写因子-DNA高次複合体について、X線回折実験による静的構造解析に加え分子シミュレーションによる動的分子構造解析を行い生化学実験で検証した。その結果、転写因子の天然変性領域の化学修飾が、その転写因子にDNA結合抑制型のコンフォーマー(T)の形成を誘導することで転写を抑制すること、一方、エンハンサー上では協調的に結合するパートナー転写因子によって、T以外のコンフォーマー(R)が選択的にDNA上にリクルートされ、化学修飾による影響が打ち消されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Signal transduction transfers cellular environmental information to nucleus via chemical modifications of proteins and finally modulates transcription profile of the cell. To reveal the molecular mechanism of conversion of the information from chemical modification to transcriptional modulation, we employed static and dynamic structural analyses of higher-ordered transcription factors(TF)-DNA complexes. We found that phosphorylation of the intrinsically disordered region of the transcription factor Ets1 induces a non-DNA-binding conformer of Ets1 itself. On the tcr₁ enhancer, the partner TF Runx1 selects the specific Ets1 conformer that is refractory to effect of phosphorylation, resisting the inhibitory effect of phosphorylation of Ets1 and specifically keeping the tcr₁ gene transcription active, while many of other Ets1-target genes turn off. This transcription switch may enable fine regulation responding to cellular environments including development and proliferation signals.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：転写制御 転写因子 化学修飾

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子は、遺伝子発現制御の引き金となるタンパク質で、標的遺伝子のエンハンサー上にエンハンソームと呼ばれる転写因子高次複合体を形成することで、細胞分化誘導を始めとする細胞の機能発現における根源的な役割を果たすと考えられる。標的エンハンサー上に形成されるエンハンソームは、標的遺伝子の発現を制御するのみならず、細胞内情報伝達系としての化学修飾カスケードの終着点でもあり、多様な細胞内情報カスケードの統合の場としても機能していると想定される。すなわち、転写因子は多様な組み合わせでエンハンサー-DNA に結合するとともに、細胞環境に応じた特異的な細胞シグナルにより転写因子が化学修飾を受けることで、エンハンソームの形成が制御されていると考えられる。しかしこの複雑かつ動的な複合体の分子構造-機能相関についての知見は極めて乏しく、がんにおける最大の原因分子と目される転写因子の分子変異による疾患の発症機構などについては、ほとんど解明されていない状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、細胞シグナルの存在下でのエンハンソームの形成・解離の動的な過程を分子構造レベルで解析し、転写因子の化学修飾による遺伝子発現制御機構を分子構造レベルで解明することを目指す。

3. 研究の方法

転写因子の化学修飾による機能変化をエンハンソーム中において原子レベルでとらえるため、X線結晶構造解析による実験的な静的構造解析に加え、中村班との共同研究による分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、動的側面から解析した。分子構造情報を基盤として、ゲルシフトアッセイ、表面プラズモン共鳴法および転写活性化実験、アミノ酸置換変異導入実験により、機能面からも解析した。転写因子の化学修飾による転写プロファイルの変化については、ChIP-qPCR および RT-qPCR によってゲノムワイド解析を行った。遺伝性疾患の原因として同定された新規遺伝子変異が分子構造に及ぼす影響について、ホモロジーモデリング、自由エネルギー計算および MD により解析した (松本班との共同研究)。

4. 研究成果

1) *tcra* エンハンソームにおける転写因子のリン酸化の影響の解析

T 細胞抗原受容体 α 鎖遺伝子 (*tcra*) のエンハンサー上に形成される、Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体を例にとり、Ets1 のリン酸化が、転写因子-DNA 高次複合体形成に与える影響を、分子構造解析と機能

解析の両面から調べた。*tcra* エンハンサーは、転写因子 Runx1 と Ets1 が隣接して協調的に結合する、高度に保存された DNA 配列を含んでいる。Ets1 は、DNA 結合ドメイン近傍に DNA 結合活性制御領域を持ち、この領域がカルシウムシグナル依存的にリン酸化を受けることによって、Ets1 の DNA 結合活性は強く抑制され、標的遺伝子の転写が抑制されることが知られている。

我々は、Ets1 のリン酸化が *tcra* エンハンソームのコアとなる Ets1-Runx1/CBF β -DNA 4 者複合体に及ぼす影響をゲルシフトアッセイおよび転写活性化実験により調べた。その結果、*tcra* エンハンサー上で Ets1 が、Runx1 とともに協調的に DNA に結合してエンハンソームを形成する場合には、リン酸化 Ets1 の DNA 結合が維持されることを見出した。つまり、パートナー転写因子 Runx1 が、Ets1 のリン酸化の効果を打ち消している可能性が考えられた。Ets1 と協調的に DNA に結合するパートナー転写因子として、Runx1 以外には、B 細胞の分化に関わる *mb1* 遺伝子のエンハンサーに結合する転写因子 Pax5 が知られている。また、Ets1 は *stromelysin-1* のエンハンサー-DNA にホモダイマーを形成して協調的に結合するため、Ets1 自身も協調的パートナーと考えられる。これらの複合体においてはパートナー転写因子の存在下にも関わらず、Ets1 の DNA 結合はリン酸化により抑制され、標的遺伝子の転写活性も低下した (図 1)。以上のことより、Ets1 のリン酸化による DNA 結合および転写活性の抑制効果は、標的エンハンサー上で協調的に DNA に結合するパートナー転写因子の種類によって異なることが明らかになった。

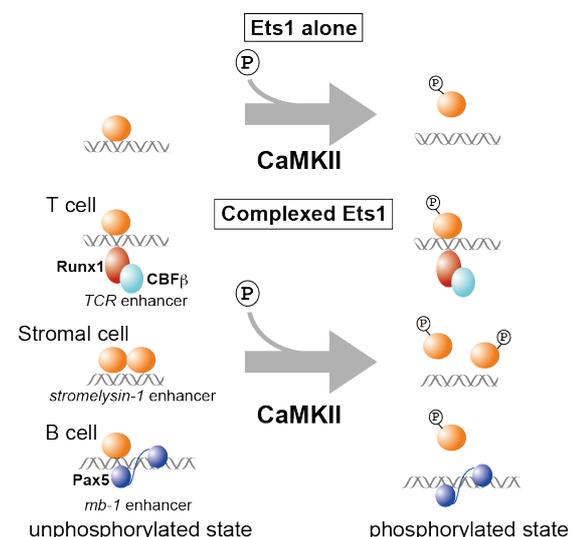


図 1. 転写因子 Ets1 のリン酸化によるエンハンソームの形成と解体の分子機構。Ets1 のリン酸化の効果はパートナー転写因子に依存する。

Runx1 が Ets1 のリン酸化の効果を打ち消す分子機構を解明するため、我々は Ets1-Runx1/CBF β -DNA 4 者複合体の X 線結晶構造を明らかにした(図 2)。すでに他グループによって報告されている Ets1-Pax5-DNA 複合体、あるいは Ets1-Ets1-DNA 複合体中の Ets1 の分子構造と比較したところ、Ets1 の DNA 結合調節領域に Runx1 依存的な特異的構造誘起を認め、この構造誘起が複合体の安定性を強固にしていると考えられた。すなわち Ets1 が、パートナー転写因子依存的にコンフォーメーションをスイッチし、Ets1 自身のリン酸化による効果を制御する可能性が考えられた。この分子機構の詳細に迫るため Ets1 のリン酸化による DNA 結合抑制の分子機構の解明を目指し、次の研究を行った。

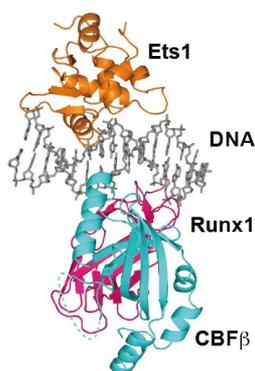


図 2. X 線結晶構造解析により決定された Ets1-Runx1/CBF β -DNA 四者複合体の分子構造

2) Ets1 の天然変性領域のリン酸化による DNA 結合抑制の分子機構

Ets1 のリン酸化による DNA 結合の抑制効果は、Runx1 と協調することにより解除され、この解除の分子メカニズムとして、Runx1 依存的に誘起される Ets1 の特異的なコンフォーマーの関与が想定された。Runx1 によって選択される Ets1 の特異的コンフォーマーが、リン酸化による Ets1 の DNA 結合抑制を免れる機構を明らかにするためには、まず Ets1 のリン酸化が、Ets1 の DNA 結合を抑制する分子機構を分子構造レベルで詳細に解析する必要がある。そこで、リン酸化 Ets1 単体およびリン酸化 Ets1-Runx1/CBF β -DNA 複合体の結晶構造解析を行い、分子構造を明らかにした。しかし、リン酸化部位を含む Ets1 の DNA 結合制御領域の電子密度は観測されなかった。この結果は、リン酸化された制御領域は、分子内あるいは分子間で少なくとも安定な相互作用には関与していないことを示唆している。この例が示すように、動的に不安定な相互作用を分子構造レベルで描出することは従来の実験的な構造解析手法では限界がある。そこで、転写サイクル班員の中村との共同研究により、分子シミュレーションの手法を用いて解析を行った。具体的には、マルチカノニカル分子動力学法 (McMD) により、リン酸化された Ets1 の活性制御領

域のコンフォーメーション空間を探索した。その結果、Ets1 の DNA 結合面にリン酸化領域が相互作用しているコンフォーマーが、高い割合で存在していることが見出された(中村班との共同研究として投稿準備中)。この DNA 結合抑制型ともいえる Ets1 コンフォーマーは、リン酸化されたセリンを巻き込んだヘリックス形成を伴っており、リン酸化依存的であると考えられた。この Ets1 の DNA 結合面に相互作用したリン酸化領域が、DNA に対して拮抗的に作用し、DNA 結合を抑制すると考えられた。興味深いことに、Runx1 と協調的に DNA に結合する Ets1 のコンフォーマーは、McMD で捉えられた DNA 結合抑制型のコンフォーマーとは大きく異なっており、Ets1 のリン酸化領域が DNA 結合面に相互作用することができないために DNA 結合の抑制効果を発揮しないことが想定された。すなわち、Runx1 は、*tcr* エンハンサー上でリン酸化による DNA 結合の抑制効果を免れた Ets1 コンフォーマーを特異的に安定化することにより、*tcr* 遺伝子の発現特異性を確立していると考えられた。

3) ヒトエクソーム解析への分子構造および分子シミュレーションの応用

中村班との共同研究によって、技術交流が進み、本研究室でも分子シミュレーション技術の利用が可能になった。そこで、松本班により遺伝性疾患の原因として新規に同定された遺伝子変異について、分子構造に与える影響を分子シミュレーションにより予想した。具体的な共同研究成果としては、転写関連因子では、Coffin-Siris syndrome の原因となる SWI/SNF 複合体のコンポーネントである BAF の変異、さらにその後見出された Pax6-BAF により転写制御を受ける転写因子 SOX11 の変異の解析がある。すなわち、松本班が新規同定した BAF および SOX11 の遺伝子変異がタンパク質機能に与える影響を分子構造の観点から解析し、BAF および SOX11 により展開されるネットワークが脳の発達に重要であることを示した。また、小児期早期に発症するステロイド抵抗性のネフローゼ症候群の原因遺伝子として松本班により同定された NUP107 の変異解析では、野生型および変異型タンパク質について MD シミュレーションを試み、遺伝子変異によって引き起こされる分子の動的性質への影響を見出した。この研究は、遺伝性疾患によって引き起こされるタンパク質機能異常の解析への MD の有用性を示すものである。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 33 件)

1. A novel GFI1B mutation at the first zinc finger domain causes congenital macrothrombocytopenia. Uchiyama Y, Ogawa

- Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (15 人中、4 番目), *Br J Haematol* doi: 10.1111/bjh.14710 (2017)
2. Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Ogata K, (5 人中、2 番目), *PLoS One* 12, 査読有, e0172654 (2017). doi 10.1371/journal.pone.0172654
 3. Biallelic mutations in the 3' exonuclease TOE1 cause pontocerebellar hypoplasia and uncover a role in snRNA processing. Lardelli RM, Schaffer AE, Matsumoto N, Shiina M, Ogata K, (59 人中、43 番目), *Nat Genet* 49, 査読有, 457-464 (2017). doi 10.1038/ng.3762
 4. PARS2 and NARS2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder. Mizuguchi T, Nakashima M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (17 人中、12 番目), *J Hum Genet* 62, 査読有, 525-529 (2017). doi 10.1038/jhg.2016.163
 5. Biallelic Mutations in MYPN, Encoding Myopalladin, Are Associated with Childhood-Onset, Slowly Progressive Nemaline Myopathy. Miyatake S, Mitsuhashi S, Ogata K, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (23 人中、12 番目), *Am J Hum Genet* 100, 査読有, 169-178 (2017). doi 10.1016/j.ajhg.2016.11.017
 6. Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. Miyake N, Fukai R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (33 人中、9 番目), *Am J Hum Genet* 99, 査読有, 950-961 (2016). doi 10.1016/j.ajhg.2016.08.005
 7. De novo DNMT1 mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Nakashima M, Kouga T, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (12 人中、4 番目), *Epilepsia* 57, 査読有, e18-23 (2016). doi 10.1111/epi.13257
 8. Identification of HOXD4 Mutations in Spinal Extradural Arachnoid Cyst. Ogura Y, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (18 人中、8 番目), *PLoS One* 10, 査読有, e0142126 (2015). doi 10.1371/journal.pone.0142126
 9. A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome. Miyamoto T, Bando Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (11 人中、8 番目), *Andrology* 4, 査読有, 75-81 (2016). doi 10.1111/andr.12113
 10. Biallelic Mutations in Nuclear Pore Complex Subunit NUP107 Cause Early-Childhood-Onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. Miyake N, Tsukaguchi H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (29 人中、6 番目), *Am J Hum Genet* 97, 査読有, 555-66 (2015). doi 10.1016/j.ajhg.2015.08.013
 11. Novel compound heterozygous LIAS mutations cause glycine encephalopathy. Tsurusaki Y, Tanaka R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (11 人中、5 番目), *J Hum Genet* 60, 査読有, 631-5 (2015). doi 10.1038/jhg.2015.72
 12. Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Nakashima M, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (20 人中、7 番目), *Ann Neurol* 78, 査読有, 375-86 (2015). doi 10.1002/ana.24444
 13. Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. Saitsu H, Fukai R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (22 人中、20 番目), *Eur J Hum Genet* 24, 査読有, 129-34 (2016). doi 10.1038/ejhg.2015.92
 14. Short-lasting unilateral neuralgiform headache attacks with ipsilateral facial flushing is a new variant of paroxysmal extreme pain disorder. Imai N, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (9 人中、7 番目), *J Headache Pain* 16, 査読有, 519 (2015). doi 10.1186/s10194-015-0519-3
 15. GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Ohba C, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (21 人中、2 番目), *Epilepsia* 56, 査読有, 841-8 (2015). doi 10.1111/epi.12987
 16. Late-onset spastic ataxia phenotype in a patient with a homozygous DDHD2 mutation. Doi H, Ushiyama M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (17 人中、5 番目), *Sci Rep* 4, 査読有, 7132 (2014). doi 10.1038/srep07132
 17. Crystallization of the Ets1-Runx1-CBF β -DNA complex formed on the TCR α gene enhancer. Shiina M, Hamada K, Ogata K, (7 人中、1 番目), *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70, 査読有, 1380-4 (2014). doi 10.1107/S2053230X14018470
 18. A novel allosteric mechanism on protein-DNA interactions underlying the phosphorylation-dependent regulation of Ets1 target gene expressions. Shiina M, Hamada K, Ogata K, (9 人中、1 番目), *J Mol Biol* 427, 査読有, 1655-69 (2015). doi 10.1016/j.jmb.2014.07.020
 19. De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (20 人中、6 番目), *Nat Commun* 5, 査読有, 4011 (2014). doi 10.1038/ncomms5011
 20. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. Miyatake S, Osaka H,

- Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (16 人中、3 番目), *Neurology* 82, 査読有, 2230-7 (2014). doi 10.1212/WNL.0000000000000535
21. FOXC2 mutations in familial and sporadic spinal extradural arachnoid cyst. Ogura Y, Yabuki S, Shiina M, Ogata K, (13 人中、7 番目), *PLoS One* 8, 査読有, e80548 (2013). doi 10.1371/journal.pone.0080548
22. Identification of KLHL41 Mutations Implicates BTB-Kelch-Mediated Ubiquitination as an Alternate Pathway to Myofibrillar Disruption in Nemaline Myopathy. Gupta VA, Ravenscroft G, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (30 人中、6 番目), *Am J Hum Genet* 93, 査読有, 1108-17 (2013). doi 10.1016/j.ajhg.2013.10.020
23. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Imagawa E, Osaka H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (12 人中、4 番目), *Hum Genet* 133, 査読有, 225-34 (2014). doi 10.1007/s00439-013-1372-6
24. De Novo mutations in GNAO1, encoding a Gao subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. Nakamura K, Kodera H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (26 人中、4 番目), *Am J Hum Genet* 93, 査読有, 496-505 (2013). doi 10.1016/j.ajhg.2013.07.014
25. Mutations in KLHL40 are a frequent cause of severe autosomal-recessive nemaline myopathy. Ravenscroft G, Miyatake S, Ogata K, Shiina M, Matsumoto N, (55 人中、20 番目), *Am J Hum Genet* 93, 査読有, 6-18 (2013). doi 10.1016/j.ajhg.2013.05.004
26. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. Iida A, Okamoto N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (15 人中、10 番目), *J Hum Genet* 58, 査読有, 391-4 (2013). doi 10.1038/jhg.2013.25
27. Mitochondrial complex III deficiency caused by a homozygous UQCRC2 mutation presenting with neonatal-onset recurrent metabolic decompensation. Miyake N, Yano S, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (18 人中、6 番目), *Hum Mutat* 34, 査読有, 446-52 (2013). doi 10.1002/humu.22257
28. KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. Miyake N, Mizuno S, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (11 人中、5 番目), *Hum Mutat* 34, 査読有, 108-10 (2013). doi 10.1002/humu.22229
29. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Okamoto N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (31 人中、21 番目), *Nat Genet* 44, 査読有, 376-8 (2012). doi 10.1038/ng.2219

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Search for anti-leukemic drugs targeting the transcription factor Runx1 by INTEND, The 137th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, 3rd International Symposium for Medical Science, 2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
2. Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Molecular behavior of a higher-order complex of multiple transcription factors on enhancer site upon phosphorylation, 6th International Conference on Structural Biology, 2016 年 8 月 22 日、Hilton New Orleans Airport Hotel (New Orleans, USA)
3. Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Molecular mechanism for modulation of a multiple transcription factor complex formed on enhancer site upon phosphorylation, 5th International Conference and Exhibition on Metabolomics, 2016 年 05 月 18、Hyatt Regency Osaka (Osaka, Japan)
4. Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Regulation of DNA binding of Ets1 by phosphorylation in an intrinsic disordered region, 第 14 回日本蛋白質科学会, 2014 年 6 月 25 日、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

椎名 政昭, 緒方 一博 他、化学同人、見て分かる構造生物科学、2014、133-160

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 一博 (OGATA, Kazuhiro)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90260330

(2) 連携研究者

椎名 政昭 (SHIINA, Masaaki)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：30347299

浜田 恵輔 (HAMADA, Keisuke)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：00344052