

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14708

研究課題名(和文)次世代分化制御薬の開発を目指した転写因子複合体の構造機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses for the transcription factor complex in TGF-beta signalling.

研究代表者

宮園 健一 (Miyazono, Kenichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：90554486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖因子の一つであるTGF-スーパーファミリーは、細胞の様々な機能を調節する多機能性サイトカインである。本研究では、TGF-シグナルを受容した細胞内で形成され、実際に遺伝子発現の制御を行う転写因子複合体Smad3-FoxH1に着目し、その構造と機能の解析を行った。X線結晶構造解析法によりSmad3-FoxH1複合体の立体構造を決定したところ、他の複合体構造では見られなかった、新規の相互作用面を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The transforming growth factor beta (TGF-beta) superfamily of cytokines regulates a number of biological processes such as cell self-renewal, differentiation, apoptosis and senescence. In this study, we focused on the transcription factor complex (Smad3-FoxH1) that is formed in cells by the stimulation of TGF-beta signal. The Smad3-FoxH1 complex regulates a number of gene expressions to regulate the differentiation of stem cells. Smad3 and FoxH1 from human were overexpressed in *E. coli*. The structure of Smad3-FoxH1 complex was determined by X-ray crystallography. The Smad3-FoxH1 structure showed that FoxH1 bind to Smad3 using different mechanism from those of other Smad3 cofactors.

研究分野：構造生物学

キーワード：TGF- 転写因子 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖因子の一つである TGF-スーパーファミリーは、細胞の多様な機能を調節する多機能性サイトカインである。ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞においては、様々な遺伝子発現を一挙に制御することにより、幹細胞を種々の細胞へと分化させる役割を担っている。一方、成熟した細胞においては、細胞の増殖、アポトーシス、免疫細胞分化、オートファジー、血管新生、細胞外マトリックス生産、細胞死などに関与している。そのため、TGF-シグナルに異常が発生すると、ガンや繊維症といった重篤な疾病や、マルファン症候群をはじめとした様々な遺伝病が発症することが知られている。

細胞外からもたらされる TGF-シグナルは、細胞表面のセリンスレオニンキナーゼ型受容体 (T RI, T RII) を介して細胞内へと伝わり、Smad2/3 と呼ばれる転写因子群のリン酸化へと変換される。Smad2/3 は他の Smad (Smad4) とヘテロ 3 量体を形成し核内へと輸送され、TGF-シグナル依存的な様々な遺伝子発現の制御が行われている。

TGF-シグナルの多機能性は、実際に細胞内で作用する、Smad2/3 を中心とした転写因子複合体の多様性と深く関係している。細胞内において、Smad2/3 は数百もの補因子 (コファクター) と結合することが知られており、TGF-シグナルを真に理解するためには、これらのコファクターの結合による Smad2/3 の機能変換を理解することが欠かせない。

TGF-シグナルを意のままに操り、ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞を望み通りの臓器へと厳密に分化させる方法が、将来の再生医療の発展のために強く求められている。これまでの幹細胞分化制御法は、細胞増殖因子を用いて細胞に刺激を与える方法が主流であるが、細胞増殖因子の多機能性ゆえに、その確実な制御は非常に困難なものとなっている。幹細胞の分化制御をより厳密に行うためには、細胞表面における刺激の調節ではなく、その刺激によって引き起こされる細

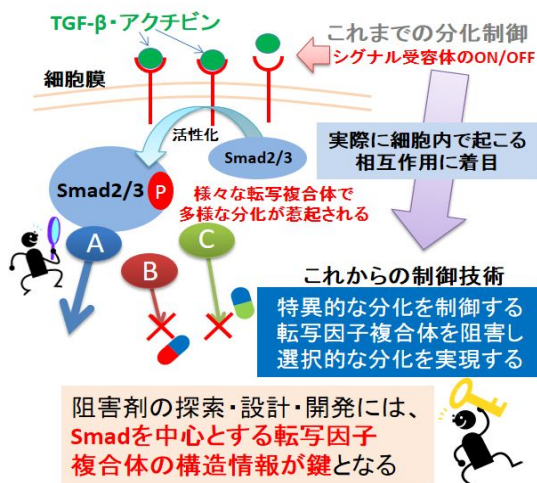


図1 TGF-シグナル伝達系

胞内での様々な相互作用を精密に制御する技術の開発が不可欠である (図1)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、幹細胞の分化を制御するサイトカイン TGF-シグナルの下流で実際に遺伝子発現の制御を行う、Smad2/3 を中心とした転写因子複合体に注目し、コファクター依存的な TGF-シグナルの制御がどのような構造基盤によってもたらされているかを解明しようと試みた。本研究で研究対象とした Smad3-FoxH1 複合体は、初期発生段階で、中・内胚葉分化制御スイッチとして作用する転写因子複合体で、原条の形成に関与することが知られている。また、FoxH1 は細胞の iPS 化を促進する働きを持つことも知られている。

発生の初期段階で作用する Smad3-FoxH1 複合体の相互作用にかかわる構造基盤を解明し、その相互作用を阻害しうる化合物の探索が可能となれば、TGF-シグナルの直接阻害よりもより高精度に TGF-シグナルを制御することが可能なシステムとなる。そこで本研究では、ヒト由来 Smad3-FoxH1 複合体の構造を X 線結晶構造解析法により決定し、その相互作用の阻害剤開発のために必須な構造基盤を蓄積することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来 Smad3 及び FoxH1 の大量発現系構築と精製

ヒト由来 Smad3 と FoxH1 は、大腸菌の異種タンパク質大量発現系を利用して、大量調製を行った。Smad3 及び FoxH1 遺伝子を大腸菌発現用ベクター pET48 にクローニングし、異種タンパク質大量発現用大腸菌を形質転換し、目的タンパク質を得た。得られたタンパク質は、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。

(2) Smad3 と FoxH1 の相互作用解析

Smad3 と FoxH1 の間の相互作用は、ヒスチジンタグを利用したプルダウンアッセイや、表面プラズモン共鳴法による解析によって評価した。

(3) Smad3-FoxH1 複合体の結晶化及び構造解析

Smad3-FoxH1 を濃縮し、シッティングドロップ蒸気拡散法により、結晶化のスクリーニングを行った。得られた結晶を用い、大型放射光施設 Photon Factory のタンパク質結晶構造解析用ビームライン AR-NE3A にて X 線回折データの取得を行った。得られた X 線回折データを用い、Smad3 単独の立体構造 (PDB ID: 1MJS) をモデルとした分子置換法により、

Smad3-FoxH1 の立体構造を決定した。

(4) Smad3 および FoxH1 の変異体解析

Smad3-FoxH1 複合体の構造解析の結果から、その複合体形成に重要であると思われる残基を特定し、それらの残基の複合体形成に対する寄与を変異体解析によって評価した。変異型 Smad3 及び変異型 FoxH1 の相互作用は、ヒスチジntagを利用したプルダウンアッセイによって評価した。

(5) Smad3-FoxH1 複合体形成阻害剤の *in silico* スクリーニング

Smad3-FoxH1 複合体の構造解析の結果から、Smad3 と FoxH1 の相互作用に重要な領域を特定し、その相互作用と競合する化合物の *in silico* スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、複合体形成の阻害作用が示唆された化合物に関しては、その作用を、ヒスチジntagを利用したプルダウンアッセイによって評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト由来 Smad3-FoxH1 複合体の再構成

大腸菌の異種タンパク質発現系を利用することにより、ヒト由来 Smad3 および FoxH1 の大量調製に成功した。得られたタンパク質間の相互作用は、プルダウンアッセイによって確認できた(図2)。

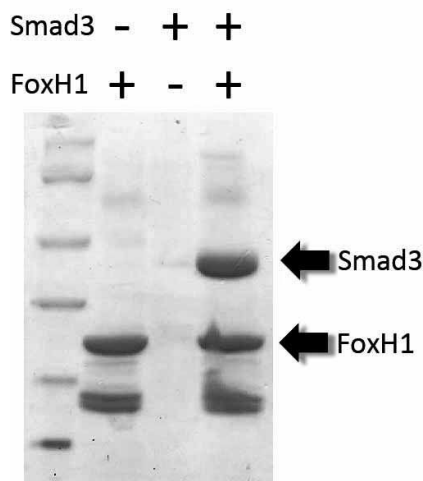


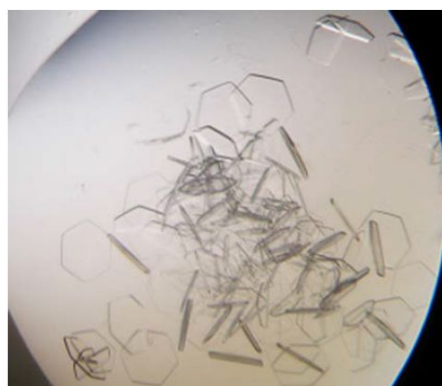
図2 Smad3-FoxH1 の相互作用

また、得られたタンパク質を用いて、表面プラズモン共鳴法による相互作用解析を行ったところ、その解離定数は $8 \mu\text{M}$ 程度であることが明らかになった。

(2) Smad3-FoxH1 複合体の構造決定

Smad3-FoxH1 複合体の結晶は、エチレンイミンポリマーを沈殿剤とする条件で得ることに成功した(図3)。この Smad3-FoxH1 複合体結晶を用い、Photon Factory AR-NE3A ビームラインにて X 線回折データの取得実験を行っ

たところ、最高分解能が 2.4 \AA の X 線回折データを取得することができた。



200 μm

図3 Smad3-FoxH1 結晶

得られた X 線回折像を用いて、Smad3-FoxH1 の構造を決定することに成功した ($R/R_{\text{free}} = 19.6/23.5\%$)。結晶の非対称単位中には、一つの Smad3 と一つの FoxH1 が含まれており、結晶の三回軸に沿って Smad3 が 3 量体化していた。結果として、 $\text{Smad3} \times 3 + \text{FoxH1} \times 3$ のヘテロ 6 量体が結晶中で確認できた。Smad3-FoxH1 複合体の立体構造から、Smad3 分子表面における FoxH1 結合面を特定することに成功した。得られた成果は、これまでに予想されていた結合面とは異なる新規の領域を含んでいた。変異体を用いたプルダウンアッセイの結果、構造中にみられた分子間相互作用に参与する残基は、実際に Smad3-FoxH1 間の相互作用に重要であることが確認された。

(3) Smad3-FoxH1 間の相互作用を阻害する化合物のスクリーニング

Smad3-FoxH1 複合体形成に重要であると考えられた Smad3 分子表面に結合する化合物の *in silico* スクリーニングを行った。複数のドッキングシミュレーションソフトを用い、100 万化合物と網羅的なドッキング計算を行い、Smad3 との相互作用が強いと予想される化合物の選択を行った。強い相互作用が予想された化合物のうち、いくつかの化合物を用い、その Smad3-FoxH1 複合体形成阻害能の評価を行ったが、優位に Smad3-FoxH1 複合体形成を阻害できる化合物を同定することはできなかった。しかしながら、本研究で同定された Smad3 の新たなコファクター結合面と相互作用する低・中分子は、TGF- β シグナルを高精度に制御する可能性をもつことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 福田玖瑠未、宮園健一、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 発生の制御を担う転写因子複合体 Smad2-Mixer の構造機能解析 平成 28 年度日本結晶学会年会 2016 年 11 月 17 日~18 日 茨城県立市民文化センター（茨城県 水戸市）
2. 大野陽介、宮園健一、栗崎晃、浅島誠 田之倉優 TGF- β シグナルを負に制御する Smad2-MAN1 複合体の X 線結晶構造解析 平成 28 年度日本結晶学会年会 2016 年 11 月 17 日~18 日 茨城県立市民文化センター（茨城県 水戸市）
3. 宮園健一、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 幹細胞分化の制御を担う転写因子複合体の構造機能解析 平成 27 年度日本結晶学会年会 2015 年 10 月 17 日~18 日 大阪府立大学（大阪府 堺市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮園 健一 (MIYAZONO, Ken-ichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：90554486