

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0251

研究課題名（和文）ヒストン修飾新規リーダータンパク質による転写機構解析（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）The analysis of transcriptional mechanism intermediated by a novel histone modification reader protein(Fostering Joint International Research)

研究代表者

神吉 康晴（KANKI, YASUHARU）

東京大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：00534869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,000,000円

渡航期間：12ヶ月

研究成果の概要（和文）：ピルビン酸キナーゼ（PK）は解糖系の最後のステップを触媒する酵素であり、糖代謝の律速酵素の一つでもある。哺乳類では4つのアイソフォームが知られているが、PKM2をノックアウトするとがん細胞の増殖は顕著に抑制される。従って、PKM2の酵素活性を決定する部位を原子レベルで解き明かし、その作用原理を明らかにすることは、様々な種類のがんに用いることが可能な抗がん剤の開発に繋がる。本研究では、ヒトPKM2及び家族性がん患者由来のPKM2 mutant (H391Y)の構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を用いてそれぞれ2.9、3.1という原子レベルの解像度で解き明かした。

研究成果の概要（英文）：Pyruvate kinase (PK) catalyzes the last irreversible step of glycolysis, and is known to be one of the rate-limiting enzyme of glycometabolism. There are four PK isoforms in mammals, PKM2 knockout lead to the reduction of cancer cell growth. Therefore, to elucidate the molecular mechanism of PKM2 enzymatic activity by atomic level is very valuable to develop a new drug on various kinds of cancer. In this project, we use the latest cryo-electron microscopy machine to resolve the atomic model of human PKM2 wild type and patient-derived mutant PKM2 H391Y. By using a single particle analysis, we clarified PKM2-WT, and PKM2-H391Y for the resolution of 2.9 and 3.1, respectively. Taken together, we learned how to use a breakthrough technology in structural biology field in this international collaborating grant.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：クライオ電子顕微鏡 ピルビン酸キナーゼ 抗がん剤 単粒子解析

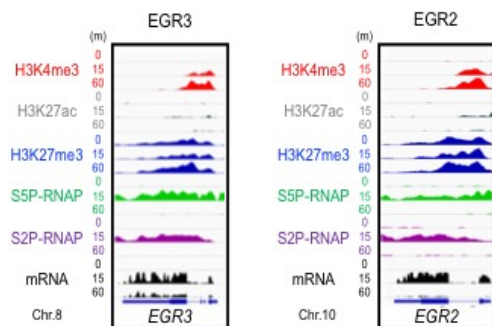
1. 研究開始当初の背景

(1) 我々多細胞生物では、構成する細胞の違いを規定している大きな要素は発現している遺伝子の種類と量の違いである。これら遺伝子発現が刻々と変化するには、「転写」の「開始」と「終結」が精緻に制御されていなければならないが、高等真核生物におけるその仕組みは複雑で全貌はまだ明らかになっていない。

(2) これまでに申請者らは、発現アレイと次世代シーケンサーを用いた網羅的解析から、血管内皮細胞の恒常性維持、サイトカインや低酸素刺激による活性化シグナルについて研究を重ねてきた (2009 *JBC*, 2011 *EMBO J*, *MCB*, 2012 *MCB*, *EMBO J*, 2014 *JBC* など)。血管内皮細胞にとって必須の栄養因子は血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor; VEGF) であるが、これは生理的な血管新生のみならず、悪性固形腫瘍や糖尿病性網膜症などの病的血管新生でも重要な役割を果たしている。本研究の基盤となっている研究 (若手研究 A) は、血管内皮細胞が腫瘍環境下の高濃度 VEGF 刺激下におかれることで駆動する転写制御機構解明から、より副作用の少ない新規創薬シーズを探索することを目的としている。

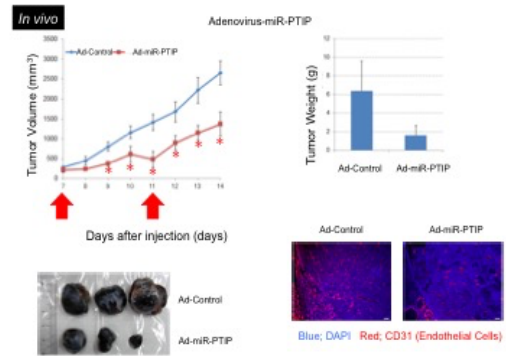
(3) HUVECs (ヒト臍帯静脈内皮細胞) に VEGF 刺激 (50 ng/ml) を行うと、1 時間以内に 20 個程度の転写因子 (EGR3, EGR2, NR4A2 など) が新たに転写され、その発現は一過性であることを我々は報告している (2014 *JBC*)。EGR3 などこれら早期誘導遺伝子はノックダウンにより血管新生を顕著に抑制することから、VEGF 刺激下の master transcription factor (以下 MTF) と考えられる。これら MTF が一過性に転写される際の転写因子エピゲノム複合体を解析することから開始した。

(4) まず、上記 MTF のみに共通のヒストン修飾が存在することを見出した。刺激前から H3K27me3 修飾があること、刺激後に H3K4me3 修飾が加わりイントロン領域に bivalent state (H3K4me3 と H3K27me3 が共存する状態) を形成すること、PoI II が転写を行っていると考えられる 15 分後にも H3K27me3 修飾は特に変化していないこと、である (下図)。Bivalent は ES 細胞が分化する際の MTF で見



られることが分かっている (Bernstein BE et al 2006 *Cell*) が、これまでに、分化した細胞で刺激に応じて形成される bivalent state に関する報告はない。

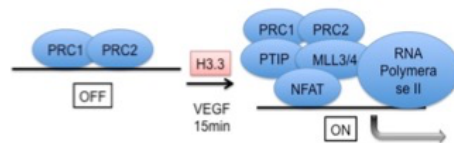
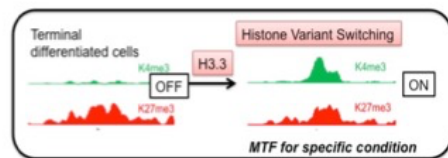
(5) 更に、これら複雑なヒストン修飾を媒介するタンパク質として、PTIP を同定した。In vitro で PTIP を si-RNA でノックダウンすると、VEGF 依存性の早期誘導転写因子群は抑制されるが、恒常的に発現している転写因子 (GATA2, KLF2 など) は抑制されなかった。更に PTIP の miRNA を静脈注射したマウスでは、腫瘍増大、腫瘍内血管新生が抑制された (下図、創薬標的として国際特許取得)。



(6) 以上の知見により、エピジェネティクスは生体において発生や発がんだけでなく、終末分化した細胞の性質もコントロールしていることが分かった。更に、エピゲノムはタンパク質が複合体としてどのように機能しているかが重要であり、構造生物学的なアプローチがないとこれ以上の分子機構解明や創薬開発は難しい、ということが分かった。

2. 研究の目的

これまでに明らかとなった血管新生の早期誘導転写因子群の転写モデル図を下に示す。従来にない詳細な分子レベル解析で明らかにした腫瘍血管新生の機構から、より副作用の少ない抗癌剤を開発することが、本研究の最終的な目標である。

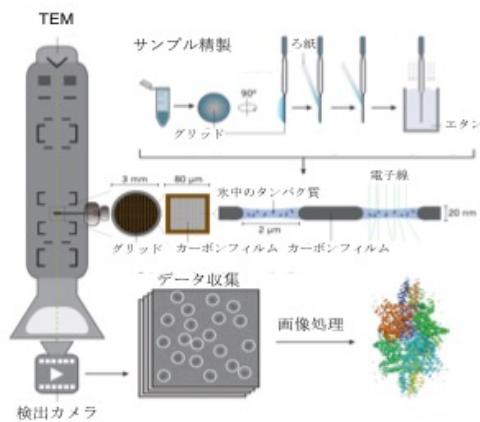


この申請書を提出した 2015 年時点で、世界ではクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によってタンパク質の構造をネイティブなまま観察する手法が Nature of the

year を取り、注目を集めていた。ところが、日本では当時 X 線結晶構造解析に迫るほどの解像度で解析できている機関はなく、本申請の国際共同研究を行う最大の目的は、最新のクライオ電顕を用いたタンパク質の構造解析の技術習得にあった。

3. 研究の方法

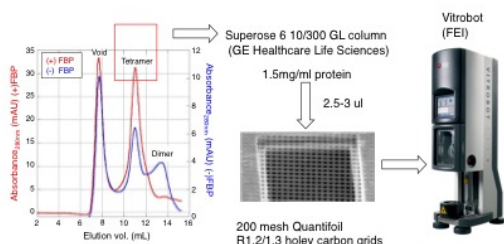
- (1) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行うにあたり、サンプル調整を行う。
 - (2) 渡航先の所属研究室で所有しているクライオ電子顕微鏡 Titan Krios で写真を撮影する。
 - (3) データ解析 (Image Processing) によって、3次元の立体構造モデルを構築する。
 - (4) 構造と機能を関連づける。
- 下図に、単粒子解析の大まかな流れを示す。



4. 研究成果

- (1) 本研究では、解糖系代謝酵素であるピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) の構造解析を行うこととした。PKM2 は、解糖系 10 ステップの最後の不可逆的な反応を触媒する律速酵素であり、同じ遺伝子 PKM から 2 つの splicing variant、PKM1 と PKM2 が転写される。これまでの報告から、PKM1 は全身の細胞に比較的ユビキタスに発現しているが、PKM2 はがん細胞や細胞分裂の盛んな幹細胞などで強く発現していることが分かっている。

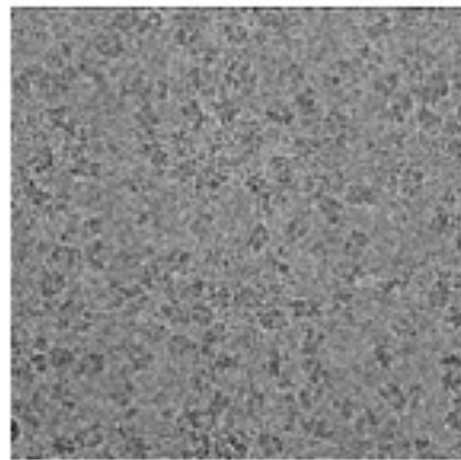
また、PKM2 は正常細胞ではテトラマー (4 量体) の構造を取っており、酵素活性も高いが、がん細胞ではダイマー (2 量体) で酵素活性が低いこともわかっている。酵素活性が低いことで、がん細胞では解糖系からペントースリン酸など他のメタボライトを作る方向の代謝にシフトし、細胞分裂の材料を供給することで、癌の発育へと繋がっている。つま



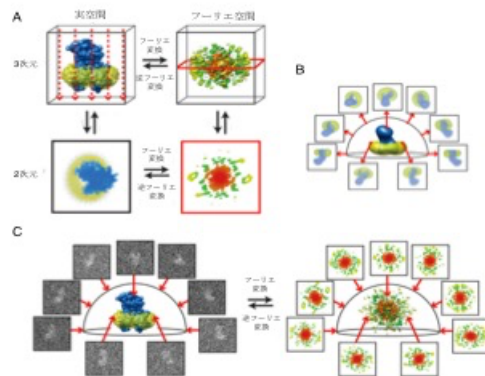
り、そのテトラマー、ダイマーの構造生物学的な違いや、酵素活性を制御している機構を解き明かせば、抗がん剤開発へ大きく進めることになる。

本研究ではまず、ヒト PKM2 テトラマー (240kDa) のタンパク質に関して、大腸菌を用いて発現させ、精製した (前頁図)。

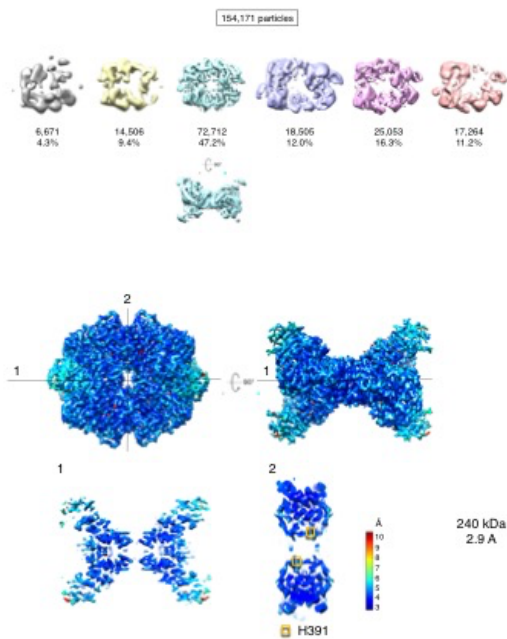
- (2) 精製したタンパク質を用いて撮影用グリッドを作成し、クライオホルダーに搭載後、顕微鏡は Titan Krios (FEI 社)、Detector は Gatan 社の K2 で撮影を行った。撮影条件は super resolution mode、physical pixel size 0.637 Å で行った。得られた結果を選別し、1,467 枚を次の Image Processing のステップに進めた。



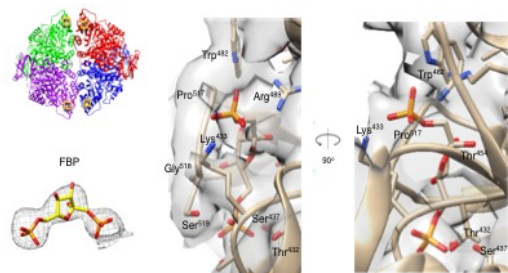
- (3) Image Processing のステップでは、アルゴリズムソフトとして RELION を用いた。RELION の原理を図で示す。



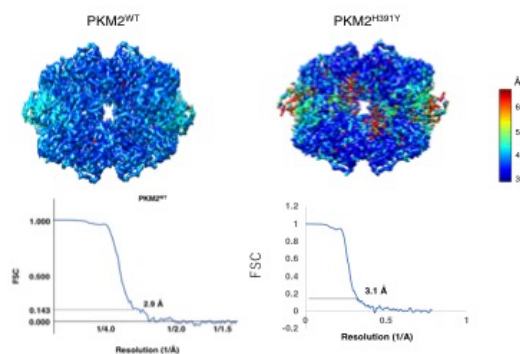
最初にマニュアルで約 1,000 個の particle を選び出し、それをテンプレートに、1,467 枚から particle、371,754 個をオートステップで選び出した。その中から、2D でクラス分けを何度か行い、最終的にノイズではない particle 154,171 個を抽出した。次に、3D のクラス分けを行い、最終的に構造決定に使用する 72,712 particles を選び出した (次頁図上)。ここから、最終的には 2.9 Å の解像度で 3 次元構造を決定した (次頁図下)。



(4) 決められた 3次元構造では、この酵素のアロステリックアクチベーターである FBP の結合部位、水素結合なども全て決定した (下図)。今回のこの成果は、現在のクライオ電顕では難易度が高いと考えられている小分子量のタンパク質 (合計 240 kDa) を 3Å という非常に高い解像度で決定したのとなった。

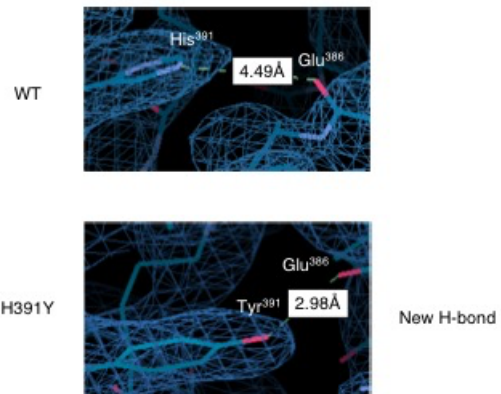


(5) 次に家族性に発がんを起こす Bloom Syndrome の患者さん由来の mutant である 391 番目のヒスチジンがチロシンに変異している PKM2^{H391Y} についても同様の解析を行った。その結果、mutant についても 3.1Å という高い解像度で決定することができた (下図)。



(6) PKM2^{WT} と PKM2^{H391Y} との構造、機能の比較

別途行った生化学的アッセイにより、mutant は WT に比べると酵素活性は低いことが分かった。構造解析の結果、391 番目のヒスチジンがチロシンに変化することで、386 番目のグルタミン酸と新たな水素結合が形成され、全体として大きな構造変化を引き起こすことが分かった (下図)。



(7) 結論

本研究では、現在難しいとされている 240 kDa の小分子タンパク質に対して、現在のクライオ電子顕微鏡単粒子解析の限界値に近い 3Å 前後での構造解析に成功した。更に、アロステリックアクチベーターとの結合様式を決定し、mutant に関しては、グローバルな構造変化を起こすことで酵素活性が落ち、その結果、がん細胞が増殖しやすい環境下になっていることが示唆された。

(8) 考察

本研究においては、このように日本ではまだあまり実現できていない、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析によってタンパク質の構造決定を行った意義は大きい。今回の PKM2 に関しては、更なる生化学的実験、分子生物学的実験が必要であろう。

また、それとは別に、本研究の基盤課題であるエピゲノム因子の構造決定に関しては今後の課題である。これらの因子は細胞膜上に発現しているタンパク質ではないために、今回と同じかあるいは簡便な精製法でサンプルの準備は可能であると考えられる。しかし、問題は大きな複合体を形成する点である。試験管内でその複合体を再構成することが鍵となるであろう。

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Genome-wide analysis revealed that DZNep reduces tubulointerstitial fibrosis via down-regulation of pro-fibrotic genes.

Sci Rep. 2018 Feb 28;8(1):3779. doi:
10.1038/s41598-018-22180-5. (査読有)

- (2) Takeda M, Kanki Y, Masumoto H, Funakoshi S, Hatani T, Fukushima H, Izumi-Taguchi A, Matsui Y, Shimamura T, Yoshida Y, Yamashita JK. Identification of Cardiomyocyte-Fated Progenitors from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Marked with CD82. Cell Rep. 2018 Jan 9;22(2):546-556. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.057. (査読有)

- (3) Mimura I, Hirakawa Y, Kanki Y, Kushida N, Nakaki R, Suzuki Y, Tanaka T, Aburatani H, Nangaku M. Novel lnc RNA regulated by HIF-1 inhibits apoptotic cell death in the renal tubular epithelial cells under hypoxia. Physiol Rep. 2017 Apr;5(8). doi:10.14814/phy2.13203. (査読有)

- (4) Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro JI, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita JK, Minami T. Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. Nucleic Acids Res. 2017 May 5;45(8):4344-4358. doi:10.1093/nar/gkx159 (査読有)

[学会発表] (計2件)

1: 神吉康晴、「クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析」、第4回日本血管生物若手研究会、2018年

2: 神吉康晴、「クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析」ConBio2017、2017年

[その他]

ホームページ等

<http://www.ric.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神吉 康晴 (KANKI, Yasuharu)

東京大学・アイソトープ総合センター・助教
研究者番号: 00534869

(2) 研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

Sriram, Subramaniam

National Institute of Health • National

Cancer Institute • Center for Cell
Research • Laboratory of Cell Biology •
Biophysics Section • High Resolution
Electron Microscopy • Senior Director