

平成 23 年 3 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17054033

研究課題名（和文）遺伝子発現制御における DECODE 複合体の分子作用機構の解析

研究課題名（英文）Mechanism for regulation of DECODE complexes in gene activation

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

研究成果の概要（和文）：

特異的転写は、高次転写因子タンパク質-DNA 複合体によって制御を受ける。本研究では、Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体の分子構造を解析し、複合体の安定化機構が、DNA を介したアロステリック制御であることを見いだした。この制御様式は、様々な転写因子-DNA 複合体においても適用可能であり、ある程度の一般性を持つと考えられた。さらに、転写因子-DNA 複合体形成に与える転写因子の化学修飾の役割が、複合体を構成する他の転写因子タンパク質によって調節を受けていることを、その分子機構とともに明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Multiple transcription factors (TFs) regulate transcription by forming TFs-DNA complexes. A cell signaling causes chemical modification of transcription factors, which modulates transcriptional activities. Besides, effect of chemical modification of transcription factors on their activity in the context of TFs-DNA complexes, however, is largely unknown. In this study, we showed that the phosphorylation of a transcription factor Ets1 “differentially” modulates Ets1-containing TFs-DNA complexes. In addition, we clarified the underlying mechanism by which the selective modulation of Ets1-containing TFs-DNA complexes is achieved using NMR analyses of allosteric regulation of Runx1 by CBF β and crystallographic analyses of multiprotein-DNA complex comprised of Ets1, Runx1 and CBF β formed on the *TCR α* gene enhancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	21,600,000	0	21,600,000
2006年度	21,000,000	0	21,000,000
2007年度	21,000,000	0	21,000,000
2008年度	21,000,000	0	21,000,000
2009年度	21,000,000	0	21,000,000
総計	105,600,000	0	105,600,000

研究分野：生化学、構造生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：転写因子、タンパク質-核酸複合体、Ets1, Runx1, エンハンサー、化学修飾

1. 研究開始当初の背景

転写因子(TFs)-DNA 複合体は、標的遺伝子の転写を制御し、細胞の発生・分化特異的な転写プロファイルを形成する。転写因子の異常は、転写制御破綻を引き起こし、がんや炎症などの疾患の発症と進展に深く関与するため、転写制御機構を分子レベルで理解することは極めて重要である。

転写の開始段階は、異なる種類の転写因子が、特定の組み合わせで、DNA の転写制御領域に結合して形成される TFs-DNA 複合体によって制御される。つまり、転写因子は単独で標的遺伝子の転写を制御するのではなく、TFs-DNA 複合体形成を介して機能を発揮する。同時に転写因子は、細胞シグナルを通じて、リン酸化、アセチル化、メチル化等の化学修飾を受け、それによって活性が制御されることが知られている。転写因子の翻訳後修飾による転写制御機構を理解するためには、従って、注目する翻訳後修飾が TFs-DNA 複合体の安定化に対してどのように作用するのかを調べる必要がある。そのため、まず、非修飾状態の TFs-DNA 複合体の安定化機構を理解する必要がある。しかし、現状では、TFs-DNA 複合体の形成機構には不明な点が多く残されている。また、転写因子の化学修飾の影響は、これまでの報告では個別の転写因子のみに注目して解析されているにとどまり、高次の TFs-DNA 複合体形成における転写因子の化学修飾の影響は不明である。

本研究室は、特定領域 DECODE 開始以前より、一貫して転写因子-DNA 複合体の制御機構について分子構造レベルで解析してきており、本特定領域研究では、より高次の TFs-DNA 複合体における複合体の安定化機構を理解し、さらに転写因子の化学修飾による複合体形成への影響を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高次 TFs-DNA 複合体の安定化機構を理解し、さらに転写因子の化学修飾の複合体形成への影響を明らかにすることである。

そのためには、高次の TFs-DNA 複合体の結晶構造解析による高分解能の分子構造が必須である。しかし、高次複合体の構造決定に成功したとしても、相互作用が複雑なため、

TFs-DNA 複合体全体の形成機構の理解に必ずしも直結していない。実際、これまでに、いくつかの高次 TFs-DNA 複合体の X 線結晶構造が先行研究で明らかにされているにもかかわらず、制御機構に関する理解はほとんど進んでいない。

そこで、我々はまず、生理的な高次 TFs-DNA 複合体の基本単位 (building block)、すなわち異なる 2 つの転写因子間で発揮される協調的な DNA 結合活性制御機構を明らかにし、この基本単位の集積により安定な高次 TFs-DNA 複合体が形成されると考えた。我々の先行研究である、急性白血病の原因となる Runx1 の制御機構解析(Cell, 2001)では、転写因子の活性制御には、分子の動的性質が深く関与している可能性を示してきた。しかし、この研究は、X 線結晶構造解析による静的分子構造解析が主体となっており、生命現象に重要なマイクロからミリ秒オーダーの動的性質についての情報を得ることはできない。

そこで、我々は、転写因子の DNA 結合活性が、他の転写因子によって制御される機構を、核磁気共鳴法 (NMR) を用いて、分子の動的側面から明らかにすることを試みた。次に、得られた動的な分子構造情報を利用して、より高次の TFs-DNA 複合体の安定化機構を解析し、さらに、転写因子の化学修飾による TFs-DNA 複合体の安定性への影響についても解析を試みた。

1) 動的分子構造解析による転写因子 Runx1 の活性制御機構解析

転写因子 Runx1 は、急性白血病において高頻度に変異が認められるタンパク質である。Runx1 は、DNA 非結合性の転写因子 CBF β とヘテロダイマーを形成して機能する。CBF β は、Runx1 の DNA 結合活性をアロステリックに上昇させることが知られている。我々がこれまでに報告した Runx1 の先行研究を基にすると、CBF β による Runx1 のアロステリックな活性制御は、Runx1 の特定の部位の構造的揺らぎの安定化によることが予想された。これをより直接的に確かめるため、NMR を用いた動的分子構造解析を行った。

2) 高次 TFs-DNA 複合体の安定化機構とリン酸化の影響の解析

T 細胞抗原受容体 α 鎖($TCR\alpha$)の発現を制御するエンハンサー($TCR\alpha$ エンハンサー)上に形成される、Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体の安定化機構および同複合体を構成する転写因子 Ets1 の化学修飾の影響を解析した。

$TCR\alpha$ 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 (コンポジット配列) を含んでいる。この配列は、T 細胞の分化に極めて重要な働きをしており、1980 年代後半から精力的に解析されているが、複合体の安定化機構は明らかにされていない。コンポジット配列に結合する転写因子 Ets1 は、DNA 結合ドメインに隣接して 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、その結果、標的遺伝子の転写が抑制されると考えられてきた。しかしながら、Ets1 のリン酸化が、Ets1 を含む TFs-DNA 複合体の安定化に与える影響を詳細に解析した報告はこれまでにない。

3. 研究の方法

1) 動的分子構造解析による転写因子 Runx1 の活性制御機構解析

^{15}N 標識した Runx1 を調製し、NMR による緩和時間測定を行った。Runx1-DNA および Runx1-CBF β -DNA 複合体における Runx1 の主鎖のゆらぎを残基ごとにモニターした。

2) 高次 TFs-DNA 複合体の安定化機構とリン酸化の影響の解析

Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行った (投稿中)。部位特異的アミノ酸変異体を用いて、ゲルシフトアッセイ、転写活性化実験および ChIP アッセイ等の機能解析を行い、分子構造から導かれる仮説の検証を行った。次に、Ets1 のリン酸化が複合体形成に与える影響を調べるため、リン酸化 Ets1 を含む Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行い、非リン酸化 Ets1 の場合と同様の構造-機能相関解析を行った。

4. 研究成果

1) 動的分子構造解析による転写因子 Runx1 の活性制御機構解析

$^1H, ^{15}N$ および ^{13}C で標識した Runx1 単体、Runx1-DNA 複合体および Runx1-CBF β -

-DNA 複合体を調製し、NMR 実験を行い、タンパク質主鎖由来のシグナルを帰属した。またそれぞれの複合体について $^1H-^{15}N$ HSQC スペクトルの線形解析および ^{15}N 核の磁気緩和パラメーター T1、T2 および $^1H-^{15}N$ NOE の測定を行い、Runx1-DNA 複合体および Runx1-CBF β -DNA 複合体における Runx1 分子全体の揺らぎのパターンを明らかにした (投稿準備中)。さらに、CBF β による Runx1 の揺らぎの安定化に重要であると予想された残基に変異を導入し、表面プラズモン共鳴法により CBF β による Runx1 の DNA 結合活性の変化を解析した。その結果、Runx1 の DNA 活性の CBF β によるアロステリック制御機構が、Runx1 の揺らぎの安定化にあることが、構造と機能の両面から明らかになった。その制御の中心は、DNA の副溝から相互作用するループ領域であり、この領域の特定の水素結合の安定化が重要であることを見出した (投稿準備中)。この制御機構は、これまでに分子構造が報告されている多くの異種転写因子-DNA 複合体にも適応可能であると考えられ、転写因子の普遍的な活性制御機構の一つと予想している。

2) 高次 TFs-DNA 複合体の安定化機構とリン酸化の影響の解析

我々は、 $TCR\alpha$ エンハンサー上に形成される、Ets1-Runx1-CBF β -DNA およびリン酸化 Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体の結晶化を行い、いずれも 2.4 オングストロームの分解能の構造を得ることに成功した (投稿中)。1) の知見を基に、得られた複合体の分子構造を詳細に調べた結果、Runx1 による Ets1 の DNA 結合の安定化機構は、DNA を介したアロステリック制御であることを見出した (投稿中)。制御に関与するアミノ酸変異体を用いて、定量的ゲルシフトアッセイおよびルシフェラーゼアッセイによって、この安定化経路が実際に機能していることを明らかにした。さらに、これまでに報告されている Ets1 を含む分子構造 (Ets1-Pax5-DNA 複合体; Garvie, et al., Mol Cell, 8, 1267-1276, 2001, Ets1-Ets1-DNA 複合体; Lamber, et al., EMBO J, 27, 2006-2017, 2008) との比較、および変異体を用いた機能実験により、これらの複合体においても、我々が見出したアロステリックな安定化経路が機能していることを見出した (投稿中)。

次に、Ets1 のリン酸化が、Ets1 を含む高次 TFs-DNA 複合体の安定性に与える影響を調べたところ、各複合体ごとに Ets1 のリン酸化の効果が異なることが明らかになった。すなわち、 $TCR\alpha$ エンハンサー上に形成される Ets1-Runx1-CBF β -DNA 複合体では、リン酸化 Ets1 は複合体中に取り込まれ、複合

体は維持されるが、他の Ets1 を含む TFs-DNA 複合体では、リン酸化 Ets1 は DNA から解離し、その複合体を崩壊させることを見出した (投稿中)。これまでは、Ets1 のリン酸化は、Ets1 の DNA 結合を失わせ、標的遺伝子の発現を抑制する単純な転写のオフスイッチと考えられていた。しかし、今回得られた知見は、転写因子の化学修飾の機能が、遺伝子特異的に形成される高次 TFs-DNA 複合体によって異なることを示しており、転写制御に対する理解を深める重要な知見と考えられる。

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 12 件) すべて査読有

- ① Jounai N, Kobiyama K, Shiina M, Ogata K, Ishii KJ, Takeshita F. NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with Beclin1, *J Immunol* 186, 1646-1655, 2011.
- ② Miyake N, Kosho T, Mizumoto S, Furuichi T, Hatamochi A, Nagashima Y, Arai E, Takahashi K, Kawamura R, Wakui K, Takahashi J, Kato H, Yasui H, Ishida T, Ohashi H, Nishimura G, Shiina M, Saitsu H, Tsurusaki Y, Doi H, Fukushima Y, Ikegawa S, Yamada S, Sugahara K, Matsumoto N: Loss-of-function mutations of CHST14 in a new type of Ehlers-Danlos syndrome, *Hum Mutat*, 31(8): 966-974, 2010.
- ③ Babayeva ND, Wilder PJ, Shiina M, Mino K, Desler M, Ogata K, Rizzino A, Tahirov TH: Structural basis of Ets1 cooperative binding to palindromic sequences on stromelysin-1 promoter DNA, *Cell Cycle*, 9(14): 3054-3062, 2010.
- ④ Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N: Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay, *Am J Hum Genet*, 86(6): 881-891, 2010.
- ⑤ Theeraladanon C, Takahashi N, Shiina M, Hamada K, Takada Y, Endo H, Tateishi U, Oka T, Ogata K, Inoue T: Rational approach to the synthesis, evaluation and 68Ga labeling of a novel 4-anilinoquinoline EGFR inhibitor as a new imaging agent that selectively targets the EGFR tyrosine kinase, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 25(4): 479-485, 2010.
- ⑥ Yamashita K, Suzuki A, Satoh Y, Ide M, Amano Y, Masuda-Hirata M, Hayashi YK, Hamada K, Ogata K, Ohno S: The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391(1): 812-817, 2009. 査読有
- ⑦ Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Urano K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N: De novo mutations in the gene encoding STXB1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy, *Nat Genet*, 40(6): 782-788, 2008.
- ⑧ Morita T, Yamashita A, Kashima I, Ogata K, Ishiura S, Ohno S: Distant N-terminal and C-terminal domains are required for intrinsic kinase activity of SMG-1, a critical component of nonsense-mediated mRNA decay, *J Biol Chem*, 282(11): 7799-7808, 2007.
- ⑨ Sekine K, Chen YR, Kojima N, Ogata K, Fukamizu A, Miyajima A: Foxo1 links insulin signaling to C/EBP α and regulates gluconeogenesis during liver development, *The EMBO Journal*, 26(15): 3607-3615, 2007.

⑩ Watanabe N, Arai H, Iwasaki J, Shiina M, Ogata K, Hunter T, Osada H: Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102(33): 11663-11668, 2005.

⑪ Hamada K, Kato M, Shimizu T, Ihara K, Mizuno T, Hakoshima T: Crystal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay, Genes Cells, 10: 1-11, 2005.

⑫ Sakurai S, Kitano K, Yamaguchi H, Hamada K, Okada K, Fukuda K, Uchida M, Ohtsuka E, Morioka H, Hakoshima T: Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA, EMBO J., 24(4): 683-693, 2005.

[学会発表] (計 17 件)

① Shiina M, Hamada K, Uchiyama A, Shimamura M, Inoue-Bungo T, Baba S, Sato K, Ogata K: Context-Dependent Regulation of the Ets1-containing Enhanceosome by Phosphorylation. Decode winter workshop 2010, Yuzawa, Jan. 2010.

② Baba S, Shiina M, Bungo T, Shimamura M, Uchiyama A, Ogata K: Effect of methylations of Runx1 by PRMT1 on its transactivation activity. Decode winter workshop 2010, Yuzawa, Jan. 2010.

③ Uchiyama A, Shiina M, Hamada K, Bungo T, Shimamura M, Ogata K: Analysis of cooperative DNA binding activity between c-Ets1 and Runx1 on various DNA. Decode winter workshop 2010, Yuzawa, Jan. 2010.

④ 緒方一博: 分化細胞特異的エンハンソーム形成とリン酸化による制御の分子基盤. 特定領域研究遺伝情報デコード成果報告シンポジウム, 東京 2011年2月.

⑤ 椎名政昭, 浜田恵輔, 豊後泰子, 嶋村麻利子, 内山晃子, 馬場しほ, 佐藤 光, 緒方一博: 細胞内シグナルによるエンハンソーム制御の分子機構 ワークショ

ップ: クロマチン遺伝子制御研究の現状と将来. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸 2010 年 12 月.

⑥ Uchiyama A, Shiina M, Hamada K, Bungo T, Shimamura M, Ogata K: Analysis of cooperative DNA binding activity between c-Ets1 and Runx1 on various enhancers. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸 2010 年 12 月.

⑦ Shiina M, Hamada K, Bungo T, Shimamura M, Uchiyama A, Baba S, Sato K, Ogata K: Context-dependent regulation of the Ets1-containing enhanceosome. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸 2010 年 12 月.

⑧ 緒方一博: 分子構造を基盤としたシグナル伝達と転写制御. 日本薬学会第 130 年会, 岡山 2010 年 3 月.

⑨ Shiina M, Hamada K, Bungo T, Shimamura M, Uchiyama A, Baba S, Ogata K: TCR α エンハンサーにおける転写制御因子複合体形成の制御機構解析. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.

⑩ 椎名政昭, 嶋村麻利子, 豊後泰子, 緒方一博: 分子構造の揺らぎに注目した Runx1/AML1 の活性制御機構解析. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会(BMB2008), 神戸, 2008 年 12 月.

⑪ Shiina M, Shimamura M, Bungo T, Ogata K: Molecular mechanisms for allosteric regulation of Runx1 activity. 第 21 回内藤コンファレンス, 山梨県北杜市, 2008 年 6 月.

⑫ 椎名政昭, 嶋村麻利子, 豊後泰子, 緒方一博: 分子構造の揺らぎに注目した Runx1/AML1 の活性制御機構解析. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生

化学会大会合同大会, 横浜, 2007年12月.

- ⑬ 緒方一博: 転写制御異常と白血病. 第49回日本小児血液学会/第5回日本小児がん学会, 仙台, 2007年12月.
- ⑭ Shiina M, Takata S, Bungo T, Shimamura M, Ogata K: NMR analyses of molecular fluctuations of Runx1 and its correlation with functional regulations. NBSJ Forum 2006: Molecular Biology-- the next decade-- Conference & Scientific Exhibition, 名古屋, 2006年12月.
- ⑮ Shiina M, Takata S, Tahirov TH, Hamada K, Bungo T, Ogata K: Structural basis for the diverse DNA sequence recognition by C/EBP α homodimer. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, 2006年6月.
- ⑯ Shiina M, Tahir TH, Hamada K, Takata S, Ogata K: Molecular mechanism for the diverse DNA sequence recognition by C/EBP β homodimer. 第28回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2005年12月.
- ⑰ Shiina M, Takata S, Hamada K, Ogata K: Structural basis for the diverse DNA sequence recognition by C/EBP β homodimer. XX Congress of the International Union of Crystallography, Florence, Italy, Aug, 2005.

[図書] (計3件)

- ① 緒方一博, 浜田恵輔: 転写制御とエピジェネティクス. 南山堂, 116-131, 2008.
- ② 椎名政昭, 緒方一博: 実験医学別冊 生命科学のための機器分析実験ハンドブック. 羊土社, 243-248, 2007.
- ③ 椎名政昭, 浜田恵輔, 緒方一博: 分子生物学実験シリーズ「図・写真で観るタンパク構造・機能解析実験実践ガイド」. メディカル

ドウ, 18-32, 2005.

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) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

椎名政昭 (SHIINA MASAOKI)
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

佐藤光 (SATO KO)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 90300962