

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：74330

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247016

研究課題名(和文)クロマチン構造変換に導く核内受容体関連蛋白質の構造基盤

研究課題名(英文)Structural Basis for the chromatin remodeling by nuclear receptors

研究代表者

森川 耿右 (Morikawa, Kosuke)

公益財団法人国際高等研究所・チーフリサーチフェロー

研究者番号：50135513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,300,000円、(間接経費) 11,190,000円

研究成果の概要(和文)：環境変化に应答する遺伝子発現制御機構の最上流に位置する核内受容体について、真核生物のクロマチンの基本構成単位であるヌクレオソームとの相互作用の構造基盤を得ることを目的として研究を行った。その結果、ヌクレオソームが強い障壁として働き、核内受容体の標的配列への特異的な結合が妨げられることが判明した。この事実は、核内受容体と应答配列の結合には、クロマチンリモデリングが必須であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Nuclear receptors belong to a class of transcription factors that function at the initial stage of gene regulation mechanisms, in response to environmental changes. We studied the interaction of nuclear receptors with in-vitro reconstituted nucleosomes by biochemical experiments. We found that the nucleosome functions as a barrier and prevents the specific binding of nuclear receptors to DNA. These results suggest that the chromatin remodeling should be the prerequisite for the docking of nuclear receptors onto the target DNA sequence in the genome.

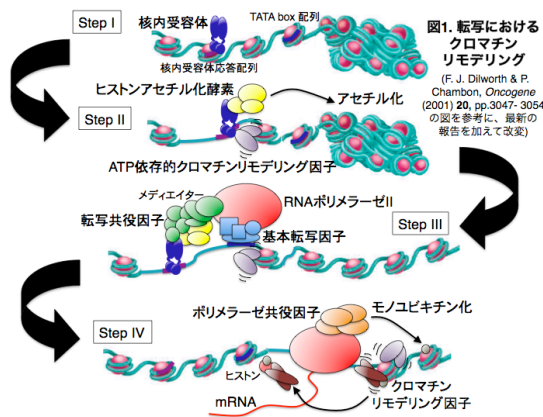
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、構造生物化学

キーワード：核内受容体 クロマチン 構造生物学 発現制御

1. 研究開始当初の背景

細胞核内現象の中でも、高等真核生物に特有の発生、分化といった高次の生命現象を理解するためには、当然ながら転写制御機構の研究に取り組む必要がある。実際、欧米諸国をはじめとして、非常に活発な研究が行われている領域でもある。図1にこれまでに解っている遺伝子の発現制御の概念を示す。この図のように、様々な転写制御因子がいかに巧妙にクロマチン構造を変化させて、遺伝子発現に導くのかを解明する事が、分子細胞生物学における重要な研究課題である。換言すれば、遺伝子発現が抑制状態にあるヘテロクロマチン領域から活性化状態にあるユークロマチン領域へのダイナミックな変換機構を明らかにする事がこの課題の主眼となる。つまり、ヌクレオソーム構造とは無関係のいわゆる“裸”のDNAを用いたこれまでの転写機構研究ではなく、クロマチンを対象とした研究が必須となりつつある。しかし、クロマチンを対象としたこれまでの研究のほとんどが“何が(What)”クロマチン構造変換を制御しているのかを探索することを目標としており、これらの制御因子が“どのようにし



て(How)”クロマチン構造を変換しているのかという分子基盤の研究が置き去りにされてきた。その結果、遺伝子発現の際のクロマチン構造変化の道筋さえも分子レベルではほとんど解明されていないのが現状である。

転写とカップルしたクロマチンリモデリングの各プロセスは大まかに4つのstepに分けられる(図1)。このうち、Step II以降の過程は、クロマチン構造がある程度オープンな状態が研究対象となる。それ故、“裸”のDNAとクロマチンの両方をターゲットとした広範な解析が行われており、詳細な知見が得られつつある。しかし、Step Iについては、核内受容体がクロマチンに結合し、構造変換に導く最初の過程にもかかわらず、クロマチンを対象とした研究は少なく、“裸”のDNAを用いた解析を基にした報告例がほとんどである。

2. 研究の目的

この研究の目的は、環境応答に依存した転写制御機構において最上流で働く核内受容体が、どのような機構でヌクレオソームの集合状態に依存したクロマチン高次構造の変換

を引き起こすのか、その分子機構を立体構造の観点から原子レベルで解明することにある。類似した機能ドメイン配置をもつ核内受容体は、脂溶性リガンドの結合に応答して、様々な共役因子と結合し、転写活性化を誘導する。この機構の本質に迫るには、全長の受容体分子と共役因子複合体が誘起するクロマチンの変形を研究対象とすべきである。ここでは創薬的観点から特に重要なPPAR γ とRAR α 等の分子を中心に、内在性リガンドと合成リガンドに依存した受容体全長分子の転写活性化機構をクロマチンの動的構造変換の観点で研究する。

3. 研究の方法

(1) クロマチン上での核内受容体の応答配列への結合を調べるため、全長核内受容体(PPAR γ /RXR α , RAR α /RXR α)を大腸菌の発現系によって得た。一方、クロマチンについては、基本構成単位であるヌクレオソームを試験管内再構成した。再構成にあたっては、応答配列を任意の位置に挿入した601配列と、大腸菌発現系から得られたヒストンを用いた。このようにして得られた全長受容体と応答配列を含むヌクレオソームとの相互作用をゲルシフト法により検討した。また、応答配列の挿入個所を変化させることにより、ヌクレオソーム上での応答配列の位置によって、受容体の結合がどのように変化するか調べた。

(2) 核内受容体の一つである全長RAR α /RXR α を精製し、応答配列を含むDNA断片、リガンド、コアクティベーターとの複合体を作成し、ゲルろ過カラムによって精製した。このようにして得られた複合体を用いて結晶化スクリーニングを行った。

(3) RAR α /RXR α の単離したDNA結合ドメインと応答配列(DR5)との複合体を調整し、結晶化を行った。

4. 研究成果

(1) 核内受容体の中から、PPAR γ /RXR α 、RAR α /RXR α という二つの代表的な全長核内受容体を精製し、試験管内再構成したヌクレオソームとの相互作用を生化学的に検討した。その結果、PPAR γ /RXR α ではヌクレオソームの存在により応答配列への結合が顕著に阻害されること、RAR α /RXR α では応答配列への結合選択性が大きく低下することが明らかになった。このことはヌクレオソームが立体障壁として働き、裸のDNAを用いた時に見られるような高い親和性と特異性をもつ結合を妨げていることを示唆している。これまでの一般的な見解では、核内受容体の応答配列への結合が、環境変化に対応した遺伝子発現の最上流に位置するとされている。しかし、以上の実験結果は、ヌクレオソームのポジショニングや構造の変化(クロマチンリモデリング)が、核内受容体の応答配列への特異的な結合に必要であることを示唆している。今後、

in vivo の実験により、細胞レベルでの検証が必要である。また、核内受容体が応答配列に結合するより前に、クロマチンリモデリングを促している因子を発見する必要がある。

(2) 上述の理由から、ヌクレオソームと核内受容体の安定な複合体を取得することが困難であると判断し、全長 RAR α /RXR α と応答配列を含む DNA フラグメント(DR5)、リガンド、コアクティベーターからなる複合体の X 線結晶構造解析を行い、全長複合体による DNA 認識機構を明らかにすることを目的とした。ゲルろ過により、安定な複合体を精製することに成功した。また、コアクティベーターの受容体への結合がリガンド依存的であることを確認した。様々な DNA 断片を用いて、数多くの条件でスクリーニングを試みたが、これまでに複合体の結晶は得られていない。GR(Glucocorticoid Receptor)と ER(Estrogen Receptor)についても大腸菌による発現系を構築したが、有意な発現は見られなかった。今後は、他の核内受容体のメンバー(LXR/RXR, FXR/RXR など)についても結晶化スクリーニングを行い、結晶性の良い受容体を見出す努力が必要であると思われる。

(3) 全長受容体と並行して、RAR α /RXR α の DNA 結合ドメインと応答配列(DR5)との結晶化を行った。幾つかの条件で結晶が得られたが、SPRING8 での回折実験の結果、DNA が分解していることが判明し、実験を断念した。

以上の研究の結果、核内受容体はヌクレオソーム上の応答配列に有意ではあるが予想したほど強くは結合できないことが判明した。つまり、ヌクレオソームが障壁として働き、核内受容体の標的配列への特異的な結合が妨げられることが考えられる。この事実は、核内受容体の結合より先にクロマチンリモデリングを引き起こす因子、いわゆるパイオニア因子の存在を強く示唆している。つまり、何らかの引き金となる因子がまずクロマチンリモデリングを誘発し、その後複数の因子が複雑に影響を及ぼしてはじめて、クロマチン構造が変換されるという過程が重視されるべきである。

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 10 件)

1. Takuji Oyama, George E Schmitz, Dylan Dodd, Yejun Han, Alanna Burnett, Naoko Nagasawa, Roderick I Mackie, Haruki Nakamura, Kosuke Morikawa, & Isaac Cann. (2013) Mutational and Structural Analyses of *Caldanaerobius polysaccharolyticus* Man5B Reveal Novel Active Site Residues for Family 5 Glycoside Hydrolases. *PLoS ONE*. 8. e80448. 査読あり DOI: 10.1371/journal.pone.0080448.s005
2. Manami Hashimoto, Noriyuki Kodera, Yasuo Tsunaka, Masayuki Oda, Mitsuru Tanimoto, Toshio Ando, Kosuke Morikawa, & Shin-ichi Tate. (2013) Phosphorylation-Coupled Intramolecular Dynamics of Unstructured Regions in Chromatin Remodeler FACT. *Biophysical J.* 104. 2222-2234. 査読あり DOI: 10.1016/j.bpj.2013.04.007
3. 白木 拓磨, 和久 剛, 森川 耿右. (2013) 生体内代謝をモニターする転写システム: 核内受容体 PPAR γ による転写を介した代謝ネットワーク間のクロストーク. *生化学*. 第 85 巻. 749-761. 査読なし DOI:なし
4. Masao Ohashi, Takuji Oyama, Endy Widya Putranto, Tsuyoshi Waku, Hiromi Nobusada, Ken Kataoka, Kenji Matsuno, Masakazu Yashiro, Kosuke Morikawa, Nam-ho Huh, & Hiroyuki Miyachi. (2013) Design and synthesis of a series of α -benzyl phenylpropanoic acid-type peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma partial agonists with improved aqueous solubility. *Bioorg. Med. Chem.* 21. 2319-2332. 査読あり DOI: 10.1016/j.bmc.2013.02.003
5. Tatsuya Nishino, Kozo Takeuchi, Karen E Gascoigne, Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Takuji Oyama, Kosuke Morikawa, Iain M Cheeseman, & Tatsuo Fukagawa. (2012) CENP-T-W-S-X Forms a Unique Centromeric Chromatin Structure with a Histone-like Fold. *Cell*. 148. 487-501. 査読あり DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.061
6. Maiko Tanabe, Sonoko Ishino, Masafumi Yohda, Kosuke Morikawa, Yoshizumi Ishino, & Hirokazu Nishida. (2012) Structure-based mutational study of an archaeal DNA ligase towards improvement of ligation activity. *Chembiochem*. 13. 2575-2582. 査読あり DOI: 10.1002/cbic.201200336
7. Shintaro Ban, Takuji Oyama, Jun Ichi Kasuga, Kenji Ohgane, Yoshino Nishio, Kosuke Morikawa, Yuichi Hashimoto, & Hiroyuki Miyachi. (2012) Bidirectional fluorescence properties of pyrene-based peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α/δ dual agonist. *Bioorg. Med. Chem.* 20. 3460-3464. 査読あり DOI: 10.1016/j.bmc.2012.04.015
8. Aussie Suzuki, Tetsuya Hori, Tatsuya

- Nishino, Jiro Usukura, Atsushi Miyagi, Kosuke Morikawa, & Tatsuo Fukagawa. (2011) Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins. *J Cell Biol.* 193. 125-140. 査読あり DOI: 10.1083/jcb.201012050
9. Takuji Oyama, Sonoko Ishino, Seiji Fujino, Hiromi Oginio, Tsuyoshi Shirai, Kouta Mayanagi, Mihoko Saito, Naoko Nagasawa, Yoshizumi Ishino, & Kosuke Morikawa. (2011) Architectures of archaeal GINS complexes, essential DNA replication initiation factors. *BMC Biol.* 9. 1-17. 査読あり DOI: 10.1006/jsbi.1999.4174
10. Clara Shionyu-Mitsuyama, Tsuyoshi Waku, Takuma Shiraki, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, & Kosuke Morikawa. (2011) Detecting structural similarity of ligand interactions in the lipid metabolic system including enzymes, lipid-binding proteins and nuclear receptors. *Protein Eng Des Sel.* 24: 397-403. 査読あり DOI: 10.1093/protein/gzq121

[学会発表] (計 3 件)

1. 和久剛、白木琢磨、大山拓次、塩生くらら、森川耿右. Structural basis for the activation of the nuclear receptor, PPARgamma, by fatty acid- and serotonin metabolites. 第 85 回日本生化学大会(招待講演). 2012 年 12 月 15 日. 福岡国際会議場マリメッセ福岡
2. 白木琢磨、五十嵐和彦、森川耿右. 核内受容体 PPAR γ の機能解析: 分子生物学的アプローチと生化学的アプローチ. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム(招待講演). 2011 年 9 月 23 日. 国立京都国際会館
3. 塩生くらら、和久剛、白木琢磨、大山拓次、白井剛、森川耿右. 脂質結合系のタンパク質構造の共進化. 第 11 回日本蛋白質科学会ワークショップ(招待講演). 2011 年 6 月 7 日. ホテル阪急エキスポパーク

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森川 耿右 (Morikawa, Kosuke)
国際高等研究所・部局なし・チーフリサーチフェロー
研究者番号 : 50135513

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

津中 康央 (Tsunaka, Yasuo)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特任講師
研究者番号 : 40551552

深川 竜郎 (Fukagawa, Tatsuo)
国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授
研究者番号 : 60321600

安藤 敏夫 (Ando, Toshio)
金沢大学・数物科学系・教授
研究者番号 : 50184320

真柳 浩太 (Mayanagi, Kota)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号 : 50418571