

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291015

研究課題名(和文) 動的構造を利用する核内受容体の基質依存的な選択的共役因子リクルート機構の解明

研究課題名(英文) Substrate dependent selective recruitment for the co-activators by the use of the structure dynamics of nuclear receptor

研究代表者

楯 真一 (Tate, Shin-ichi)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20216998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体PPAR γ の基質依存的な転写共役因子選択的リクルート機構の解明を目指した。

PPAR γ の基質結合ドメインは、基質結合により転写共役因子結合領域を囲むH3、H4の相対配向を変化させることを見いだした。この解析には、申請者が開発したD1ORITE法が効果的に利用された。

転写共役因子SRC1の核内受容体結合モチーフLxxLLを含む2つの領域を対象として、過渡的に形成される低存在率の次構造とPPAR γ への結合能の相関を解析した。2つの領域は、C末端部領域とLxxLLモチーフにおいて異なる低存在率構造を持つことが分かった。また、低存在率構造がPPAR γ への結合能に密接に関わることも分かった。

研究成果の概要(英文)：We explored the mechanism of the substrate-dependent selective recruitment of the co-activator to PPAR γ , a type of nuclear receptor. We determined the solution structure of PPAR γ in the complex with agonist to demonstrate the relative orientation between H3 and H4 surrounding to the co-activator binding pocket was changed, which have been never found in the X-ray structures.

We analyzed the low-population structure of the fragments having the PPAR γ binding motifs, LxxLL, in SRC1, a co-activator. We revealed that two fragments had different low population structures at the site of LxxLL motif and the C-terminal parts following the binding motif. We also found the C-terminal low population structures are responsible for the co-activator binding to the PPAR γ . The dynamic structural properties of SRC1 should determine the substrate-dependent co-activator recruitment to the PPAR γ .

研究分野：NMR structure biology

キーワード：nuclear receptor co-activator transient structure NMR structure dynamics time resolution FRET

1. 研究開始当初の背景

核内受容体の一種である PPAR_g (Peroxisome Proliferator-activated Receptor-*g*)は、脂肪細胞分化誘導に関わる転写因子である。PPAR_g は、基質依存的に転写共役因子(抑制型共役因子あるいは活性型共役因子)をリクルートし、クロマチン修飾を介した転写制御をおこなう。PPAR_g の基質結合ドメイン(LBD)は大きな基質結合ポケットをもち、多様な構造の脂溶性化合物を基質とする。PPAR_g は基質の種類に応じてリクルートする共役因子のタイプを替える。アンタゴニスト結合では抑制型因子をリクルートし、アゴニスト結合では活性型因子をリクルートする。さらに、アゴニストの化学構造に応じてリクルートする活性型共役因子を替える。例えばアゴニスト Rosiglitazone は p300 をリクルートするが、別なアゴニスト GI262570 では Tip60 がリクルートされる。PPAR_g は共役因子中の LxxLL モチーフ配列(x は任意のアミノ酸)を認識して結合する。LxxLL 配列は、PPAR_g LBD 上の AF-2 表面(activator function 2 surface)に結合する。

PPAR_g アゴニストは、活性強度に応じて full agonist (FA)と partial agonist (PA)に分類される。アゴニストは、基質結合ポケットに入り AF-2 表面にある 12 番目のヘリックス(H12)と水素結合を形成し H12 を安定化させることにより FA 活性を誘導する。一方、基質結合ポケットには入るが H12 と水素結合を形成しないアゴニストは、PA 活性を示す。H12 を含む AF-2 表面の構造安定化が基質の活性強度に関係すると考えられている。質量分析を用いた H/D 交換実験からは、AF-2 表面は構造多様性をもち、基質の化学構造に応じて構造変化することが示されている。しかし、PPAR_g LBD-基質複合体の結晶構造からは、基質結合異動的な AF-2 表面構造の多様性と機能の相関については観測されていない(理由は後段で議論)。

PPAR_g が持つ特徴的な基質依存的転写共役因子の選択性、活性制御には PPAR_g LBD 構造の多様性と基質依存的な構造変化が関係するとされる。しかし、PPAR_g LBD の分子量(30 kDa)と溶解度の低さ(0.5 mM 以下)、構造柔軟性・構造多様性が原因となる NMR シグナルの広幅化など、測定上の問題のために、高分解能構造を基にした PPAR_g の機能制御機構の研究はほとんど報告されていない。

PPAR_g の基質依存的な共役因子選択性の変化は、LxxLL モチーフ配列のみでは説明できない。アゴニスト Rosiglitazone 結合状態の PPAR_g は、共役因子 SRC1 中

の LHRLL 配列を持つ2番目のモチーフと強く結合するが、SRC2 に対しては LRYLL 配列をもつ3番目のモチーフに対して高い親和性を示す。

一方、SRC1 の第3モチーフは SRC2 第3モチーフと同じ LRYLL 配列を持つものの、Rosiglitazone 結合 PPAR_g には全く結合しない。このことは、LxxLL 配列周辺部の PPAR_g 認識への関与を示唆する。しかし、結晶構造では LxxLL 配列周辺部は PPAR_g と相互作用しておらず、説明できない。共役因子リクルート選択性の解明には、共役因子側の溶液構造解析も必要である。

2. 研究の目的

核内受容体タンパク質 PPAR_g は、基質依存的にリクルートする共役因子を選択する。本研究では、PPAR_g が基質に応じて共役因子認識能を変化させる機構を、NMR 構造解析を通して明らかにする。

申請者は、PPAR_g が基質依存的に基質結合ポケットから離れた位置に活性依存的な構造変化が誘導される事見だしている。また、共役因子側についても、活性型共役因子 SRC1 を例として、天然変性領域である PPAR_g 認識配列(LxxLL モチーフ)周辺に低存在率のヘリックス構造が存在し、PPAR_g 結合に伴いその C 末端部に新たに過渡的なヘリックス構造が誘導される事を見つけた。この研究を基盤とし、多様な基質・共役因子を対象として動的構造を介したリクルート制御機構を解明する。

3. 研究の方法

- (1) PPAR_g の基質依存的な立体構造変化解析: 主鎖化学シフトによる局所骨格構造制約と、異方性核スピン相互作用による 2 次構造間相対配向等を規定する巨視的構造制約を用いて、結晶構造を初期構造とする制約付き分子動力学計算により基質依存的な PPAR_g の立体構造を決定する。
- (2) 共役因子の認識部位の動的構造: PPAR_g 認識配列 LxxLL を含む天然変性領域の NMR 構造解析により過渡的構造形成など、共役因子の認識配列部の動的構造特性を明らかにする。
- (3) 共役因子の過渡的に形成される構造と機能との相関解析: co-activator SRC1 を対象として、その N 末端部および C 末端部の LxxLL モチーフ周辺の過渡的に形成される構造特性を変化させる変異体を構築し、過渡的に形成される 2 次構造変化と PPAR_g への結合能との相関を解析する。

上記の計測・解析を複数の基質、共役因子フラグメントに適用し系統的なデータを集積する。

4. 研究成果

- (1) PPAR_g 基質依存的な立体構造変化の解析
PPAR_g-LBD のアゴニスト rosiglitazone 結合状態での立体構造決定を行った。30kDa を越

える分子量の PPAR γ の立体構造決定は通常の NOE を用いた方法では行う事ができない。PPAR γ -LBD の主鎖化学シフトから得られる骨格の 2 面角情報と共に、申請者が開発した DIORITE 法による 2 次構造間の相対配向情報を用いて立体構造を決定した(図 1)。

DIORITE は、PPAR γ -LBD を伸張アクリルアミドゲルを用いて弱く配向させて観測した。高分子量のタンパク質であっても高感度・高分解能で観測できる TROSY を用いて、分子配向に依存して変化する TORSY シグナルの ^{15}N 化学シフト変化量 $\Delta\delta\text{TROSY}$ から得られる各残基の磁場に対する配向角度情報を構造制約として、apo 型の PPAR γ -LBD の結晶構造を初期構造として最適化を行い立体構造を決定した。観測値と最適化した構造からの逆計算による $\Delta\delta\text{TROSY}$ との rmsd は 1.1 Hz であり計測誤差の範囲に十分に入る精度での立体構造を決定できた(図 1)。構造最適化の過程では、骨格の化学シフトから得られる 2 面角情報も構造制約として入れているが、これも十分に計測誤差の範囲で一致した(構造揺らぎがあるループ部位は計算から外した)。

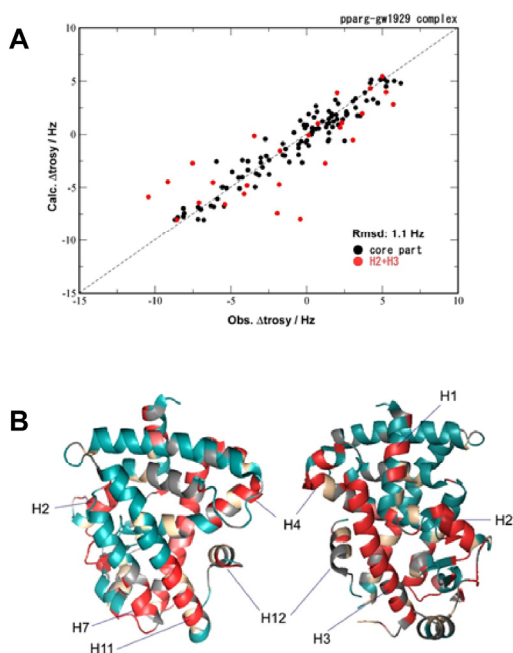


図 1: PPAR γ -LBD の NMR 構造決定。(A) DIORITE 法で決定した立体構造から逆計算した $\Delta\delta\text{TROSY}$ と観測値との一致度。(B) 化学シフト情報と DIORITE により決定した PPAR γ -LBD の立体構造。Apo-型との違いが観測された部分を赤色でマークしている。H3-H4 の部分に構造の違いが観測された。

H3-H4 の領域は co-activator の LxxLL モチーフが結合する H12 を取り囲む。アゴニスト結合により H3-H4 の相対配向が変化することにより LxxLL モチーフおよびその近

傍の配列との相互作用が変化することが基質依存的な co-activator 選択性を実現すると考えられる。しかし、予想していたよりも H12 近傍の構造変化は小さく、逆に H7 あるいは H11 など LxxLL モチーフ結合サイトから離れた位置にも構造変化が観測されるなど、これまで注目されていない部位にも構造変化が誘導される事が分かった。このことから、co-activator の LxxLL モチーフ近傍のみではなく、その周辺の配列と PPAR γ との相互作用が、co-activator 選択性を決めていることが予測される。

この結果から、co-activator のモチーフ周辺のもつ構造特性についても注目した解析が必要であることが明らかになった。

(2) 共役因子の認識部位の動的構造

LxxLL モチーフを含む co-activator の PPAR γ 結合領域は安定な立体構造を保持しない天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) である。主鎖の化学シフト (^{13}C , ^{13}C , ^{13}C , ^{15}N , ^1HN , ^1Ha) の値から 2 次構造の存在率を計算する事ができる。本研究では $\delta 2\text{D}$ というプログラムを用いて、2 次構造存在率を計算した。

Co-activator SRC1 には 2 つの LxxLL モチーフが存在する。N 末端側のモチーフ LxxLL-1 は PPAR γ が Prostaglandin-J2 との複合体の際に選択的に結合し、C 末端側にある LxxLL-2 は PPAR γ が Rosiglitazone を複合体を形成する時に選択的に結合する。SRC1 の 2 つの LxxLL モチーフを含む領域をもちいて主鎖の化学シフトの帰属を行い、上記のアルゴリズムにより 2 次構造の存在率を解析した。

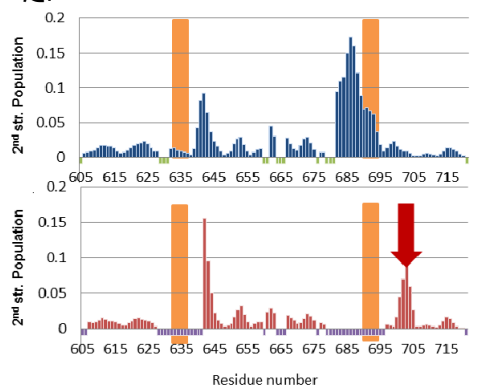


図 2: SRC1 の 2 つの LxxLL モチーフを含む領域の 2 次構造存在率解析の結果(上)。オレンジ色の領域がモチーフ部を示す。LxxLL-2 のは LxxLL-1 よりも高いヘリックス存在率をもつ。さらに、LxxLL-2 の N 末端部には高いヘリックス存在率を持つ領域が存在する。PPAR γ 結合状態では、いずれのモチーフ部も C 末端部にヘリックス含量が増加した。

解析の結果、LxxLL-1 と LxxLL-2 のそれぞれのモチーフでは明らかに 2 次構造の存在率に差があることが分かった(図 2)。LxxLL-2 はモチーフ部およびその N 末端部に 10% 程度

の高いヘリックス存在率を示す。一方で、LxxLL-1 は LxxLL モチーフにはほとんどヘリックスを形成せず、N末端部についてもわずかにしかヘリックス形成が観測されない。ただ、LxxLL-1 モチーフには、そのC末端部にヘリックス形成能があることが特徴的である。

いずれの領域も、IDRであるため安定な立体構造を保持せずに、たえずダイナミックな構造変化を繰り返している。10%程度のヘリックス存在率とは、LxxLL モチーフを含むフラグメントがダイナミックに構造変化を繰り返す過程で、過渡的にヘリックス構造を形成することを意味する。

PPAR γ に結合した場合に誘導される立体構造についても同様に主鎖の化学シフトを用いて 2 次構造存在率の変化から解析を行った(図 2)。LxxLL モチーフの NMR シグナルは exchange broadening により消失して観測できないが、その周辺部の NMR シグナル変化から結合に伴うモチーフ周辺部の構造変化を観測することができた(図 2)。図 2 に示すように、PPAR γ との結合に伴って、いずれのモチーフ部もC末端部にヘリックス構造が誘導された。このことは、LxxLL モチーフのC末端部が PPAR γ と相互作用する事により新たなヘリックス構造の安定化が誘導されたものと考えられる。

LxxLL-2 周辺のフラグメントを用いて PPAR γ との相互作用解析を行い PPAR γ 側上にLxxLL含有フラグメントととの新たな結合領域を同定した。この領域は、co-activator との相互作用ではこれまで見えられていなかったH9領域であり、H12 以外にも PPAR γ 上の他の領域が LxxLL モチーフを含むフラグメントの認識に関わるという新たな知見を得た(図 3)。

図 3 : SRC1 LxxLL-2 モチーフを含むフラグメント(residues 665-721) と PPAR γ との相互作用により新たな見いだされた PPAR γ 上の相互作用部位。H9を含む領域も SRC1 との相互作用に関する。

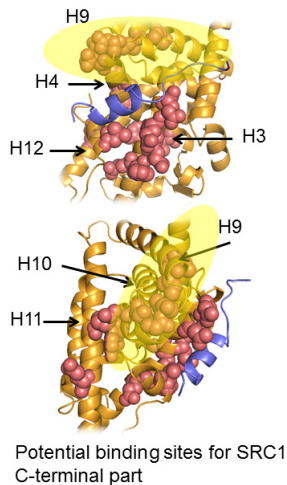


図 1 に示すように、基質結合により構造変化が誘導される領域は、結晶構造解析から予測されている H12 以外にも存在する今回観測された LxxLL モチーフ以外の領域の PPAR γ との相互作用領域が基質依存的

な co-activator 選択性に関与する事が予測される。

図 2 に示した結果を合わせて考えると PPAR γ との結合に伴って変化する LxxLL モチーフ部の C 末端領域は、H10, H11 を含む PPAR γ の基質結合ポケットとは分子の裏側に当たる領域との相互作用が co-activator リクルート制御に関わると考えられる。

(3) 共役因子の過渡的に形成される構造と機能との相関解析

Co-activator の LxxLL モチーフ周辺は IDR であり、安定な立体構造を保持しない。しかし、過渡的に立体構造を形成するために低存在率の 2 次構造が存在する。その存在率と 2 次構造の種類は主鎖の NMR 化学シフトから計算することができる。図 2 に示すように、PPAR γ の co-activator である SRC1 が持つ 2 つの LxxLL モチーフ周辺は、それぞれ異なる 2 次構造存在率を持つ。また、上記の解析で明らかになったように、これまで結晶構造解析を通して明らかにされた、LxxLL モチーフと H12 領域の相互作用以外にも、LxxLL モチーフC末端部が PPAR γ と相互作用することがわかり、co-activator がもつこの領域と PPAR γ の相互作用の重要性が示された。

ここでは、SRC1 の 2 つの LxxLL モチーフを対象とし、それぞれの領域が過渡的に形成する低存在率 2 次構造がどのように PPAR γ との相互作用に関わるかを解析した。

分子動力学計算から、過渡的に形成されるヘリックス構造が LxxLL モチーフの疎水性側鎖と周辺部にある残基の疎水性側鎖との相互作用により形成されると予測された(図 4)。

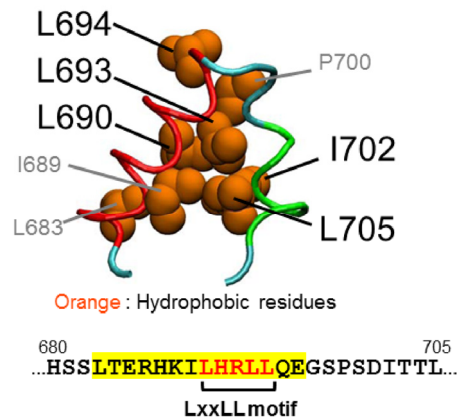


図 4: SRC1 の LxxLL-2 領域で過渡的に形成されるヘリックス構造。N 末端部に過渡的に形成されるヘリックス構造(図 2)は、LxxLL モチーフのC末端部にある測位性側鎖との相互作用により形成される。

図 4 に示すように、LxxLL-2 は、C 末端部にある L705 などの疎水性残基側鎖と LxxLL モチーフ中の疎水性側鎖との間での過渡的な接触により構造形成が促される。従って、この疎水性相互作用を弱めることで過渡的な構造

形成が阻害されると予測される。

SRC1 の LxxLL-2 モチーフを含むフラグメント (665-721) を用いて、L683G, I689G, I702G, T703G, T704G, L705G の 6 種類の変異体を作成してそれぞれの 2 次構造存在率を NMR で解析したところアミノ酸変異に応じて大きく過渡的構造形成が変化する変異体フラグメントを得ることができた (図 5)。

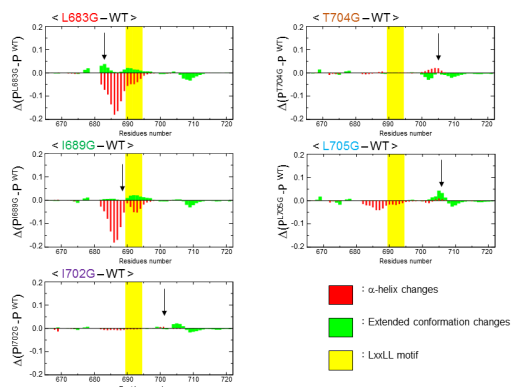


図 5: SRC1 LxxLL-2 モチーフのアミノ酸変位に応じた 2 次構造存在率の変化. それぞれの変異体の 2 次構造存在率から、野生型のフラグメントで観測された 2 次構造存在率を引いた差分を表示している. 矢印は変異を導入した残基の位置を示す. 黄色の影を付けた部分は LxxLL モチーフ部を示す. 赤はヘリクス構造、みどりはシート構造を示す. この場合のシート構造はペプチド鎖が伸びた構造状態にあることを示す。

L683G, I689G 変異体では LxxLL-2 領域に特徴的である (図 2) N 末端のヘリクス存在率を大きく変化させる事に成功した. 一方で、分子動力学計算からは最もヘリクス存在率を低下させると予測された L705G 変異体では、N 末端部のヘリクス存在率にわずかな変化を誘導したに留まり、そのかわり変異点近傍に明確にシート構造 (伸びきった構造) を誘導した. ヘリクス存在率を大きく変化させた L683G, I689G では、この領域のシート構造が低下していたのとは大きな違いが観測された。

それぞれの変異体と PPAR_g との相互作用を測定した. 本研究では、以下に測定原理を示す TrFRET (時分割蛍光エネルギー移動法) を使って結合能を解析した. TrFRET では、PPAR_g の N 末端部につけた His-tag に対する抗体を用いた. His-tag 抗体には Tb 錯体が化学的に付加されており、340nm の光で励起することで 490nm の蛍光を発する. PPAR_g には rosiglitazone を結合ものを用いた。

Co-activator SRC1 側には C 末端部に Cys 残基を導入して Alexa488 を化学的に付加したものをサンプルとした。

上記の Tb 錯体を持つ His-tag 抗体は PPAR_g に強固に結合する. PPAR_g に結合した SRC1-Alexa488 は、PPAR_g に結合した Tb

錯体から発せられる 490nm の蛍光を受けて、525nm の蛍光を発する. 従って、抗体に付加した Tb 錯体を励起する 340nm の光を照射して観測される 525nm の光 (FRET 光) の強度を利用することで PPAR_g-SRC1 の相互作用を計測することができる (図 6)。

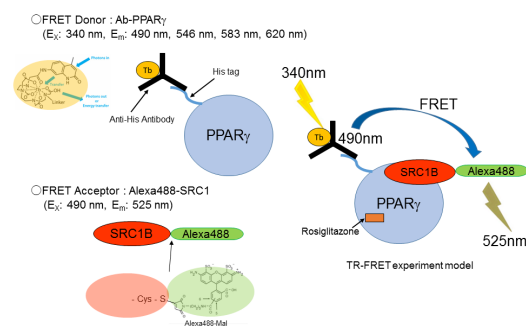


図 6: PPAR_g-SRC1 相互作用強度を計測するための TrFRET のセットアップ. PPAR_g-SRC1 複合体が形成されると、340nm の励起により 525nm の蛍光が観測される. PPAR_g の基質である rosiglitazone から発せられる背景の蛍光に邪魔されることなく高精度の解析を行うためには TrFRET の利用が必須であった。

PPAR_g に対して SRC1 フラグメントを滴定した結果観測された TrFRET の変化を示す (図 7). 背景蛍光に邪魔されることなく、高精度に 525nm の FRET 光の変化が観測されていることがわかる。

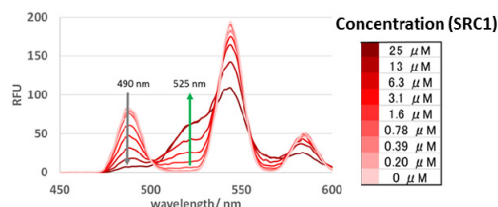


図 7: SRC1 フラグメント滴定に伴う TrFRET 強度変化として観測された PPAR_g と SRC1 との相互作用. 525nm の蛍光強度の変化から PPAR_g-SRC1 の解離定数 K_D を算出した。

TrFRET を用いて、上記の SRC1 LxxLL-2 領域の 5 種類の変異体と野生型の PPAR_g (rosiglitazone 結合状態) の K_D 測定を行った. さらに、上記で解析した 2 次構造存在率と K_D との相関を解析した. その結果、SRC1 LxxLL-2 に関しては、N 末端部が伸張構造になるほど PPAR_g との親和性低下が観測された (図 8). 一方で C 末端部に誘導される伸張構造の存在率が上がると逆に親和性が低下する事が分かった. LxxLL-2 はモチーフ部にヘリクス構造を形成することが親和性を高める一方で、C 末端部がヘリクス構造を取りにくいと親和性が低下するという傾向がある. LxxLL-2 領域では PPAR_g との結合により C 末端部ヘリクス構造誘導されることが有象をと分かっているが、C 末端部が伸展型構造を取りやすくなりヘリクス形成に阻害的に働く

理解することができる。

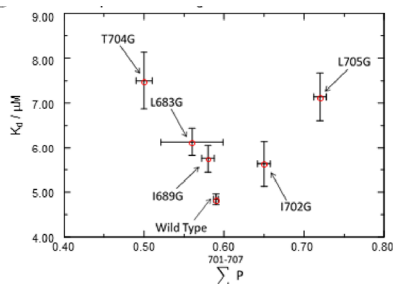


図 8: LxxLL-2 領域 C 末端部のシート構造存在率と PPAR γ に対する K $_d$ の相関

同様に SRC1 LxxLL-1 についても K $_d$ と 2 次構造存在率の相関解析を行った。こちらのケースでは、LxxLL モチーフ部のヘリックスのシート構造(伸展型構造)の存在が高いほど結合能が高いという結果になった。また、C 末端部のヘリックス存在率が高い程結合能が高くなるという結果も得られた。

LxxLL-2 の結果と同様に、C末端部が PPAR γ との結合活性に関わることが確認できた。一方で、LxxLL-1 の場合には、モチーフ周辺構造のヘリックス存在率が低いほど PPAR γ に対する親和性が高くなるという LxxLL-2 とは逆の傾向にあることも分かった。以上の 2 つのモチーフ領域の解析を通して、PPAR γ が co-activator が過渡的に形成する低存在率構造を認識する可能性を示す事ができた。

今後は過渡的に形成される立体構造の詳細を解明して、どのように低存在率構造が PPAR γ との相互作用に関わるかの詳細を解明することが求められる。

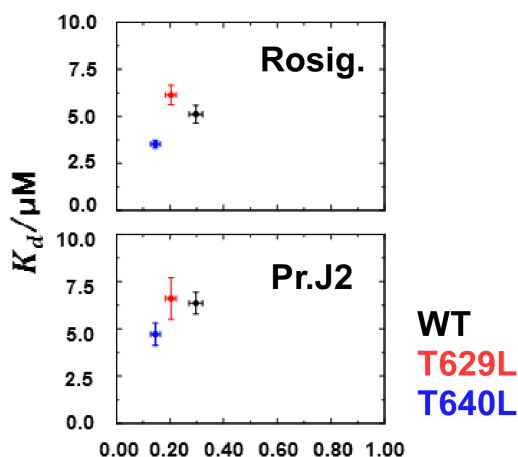


図 9: SRC1 LxxLL-1 を含むフラグメントに対する変異体の LxxLL モチーフ部のヘリックス存在率と PPAR γ に対する親和性(K $_d$ で表記)との相関。LxxLL 部のヘリックス含量が下がる程、親和性が向上している。Rosiglitazone(上)と Prostaglandin J $_2$ (下)の結果を比較。

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 8 件)

- Tochio,N., Umehara,K., Uewaki,J., Flechsig,H., Kondo,M., Dewa,T., Sakuma,T., Yamamoto,T., Saitoh,T., Togashi,Y., and ***Tate,S.** (2016): Non-Rvd mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy. *Scientific Reports*. 6, 37887. (査読有)
Doi:10.1038/srep37887
- Wang,J., Tochio,N., Kawasaki,R., Tamari,Y., Xu, N., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate,N., ***Tate,S.** (2015): Allosteric breakage to the hydrogen bond within the dual-histidine motif in the active site of human Pin1 PPIase. *Biochemistry*, 54, 5242-5253. (査読有) Doi:10.1021/acs.biochem.5b00606

[学会発表] (計 19 件) 招待講演のみ

- “Inter-domain communication between the domains tethered by intrinsically disordered region (IDR) – intramolecular ‘fly-casting’ mechanism facilitating ligand recognition” **Shin-ichi Tate**, The 7th Asia-Pacific Symposium on Intrinsically Disordered Proteins (APIDPs) (2016.10.25-26, Daejeon, Korea) [招待講演]
- “Functional significance of the transient folding of intrinsically disordered proteins (IDPs) revealed by combinatorial approaches including high-speed AFM, SAXS, molecular dynamics and NMR”, **Shin-ichi Tate**, Gordon Research Seminar (2015.06.07-12, Lucca,Italy). [招待講演]

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)
名称: ナノピペット及びその作成方法
発明者: 高見知秀, 楯 真一, 尾白佳大, 尾川修一, 高桑雄二, 小川佳英, 斎藤美佳子, 松岡英明
権利者: 国立大学法人 広島大学
種類: 特願
番号: 特願 2014-220411
出願年月日: 2014 年 10 月 29 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
<http://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/biophys/index.html>

- 研究組織
(1) 研究代表者
楯 真一 (SHINICHI TATE)
広島大学・理学研究科・教授
研究者番号 20216998