

研究報告書

「転写基本因子 TFIID の結晶構造解析を介したクロマチン転写制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 安達 成彦

1. 研究のねらい

生命は極めて性能の良い機械であり、部品サイズの小ささ・エネルギー変換効率の高さ・情報処理の巧みさなどの点においては、人類の創出した機械をはるかに凌駕した性能を有する。その一方で生命の設計図である遺伝情報は、ヒトでさえわずか 750 メガバイトしかないことは驚くべき事実であり、生命は少ない情報を有効活用する何らかの仕組みを獲得したことが想定される。ゲノム DNA から遺伝情報を読み出す初発段階が転写開始反応であることから、転写開始反応は生命が有する巧みな情報処理の一翼を担っていると考えられる。

転写開始反応の分子機構の研究は大腸菌において精力的になされて、1 種類の転写酵素・1 種類の転写開始因子で基本的な反応が遂行されることが明らかにされた。大腸菌と同様に、ヒトを始めとする真核細胞の転写開始反応も、転写酵素・転写開始因子によって遂行されるが、転写酵素は 3 種類、転写開始因子は 6 種類と、非常に複雑化したことが明らかになった。真核細胞における転写開始反応の複雑化の主な原因は、遺伝子の増加によるゲノム DNA の長大化であり、ヒトではおよそ 1 メートルの DNA をわずか数ミクロンの核内に収納する必要がある。ゲノム DNA の核内への収納は、ヒストンタンパク質が約 200bp の DNA と結合してクロマチンと呼ばれる高次構造を形成することで達成されており、ゲノム DNA はヒストンに巻き取られるように核内に収納されている。

しかしながら、ヒストンはゲノム DNA の折りたたみには有用であるが、同時に転写酵素などの接近に阻害的に作用する。そのため、真核細胞における転写開始には、ゲノム DNA 内の標的遺伝子周辺に結合したヒストンを一旦除去する必要がある。そのためには、まずヒストン翻訳後修飾酵素・ヒストン翻訳後修飾認識因子・ヒストン除去因子がヒストンに作用し、さらに、転写開始因子・転写酵素が集合する。この反応にはおよそ 80 種類のタンパク質が関与し、それぞれが集合と解離を繰り返す極めて複雑な反応である。このように複雑な反応の分子機構を解明するには立体構造情報が必須であるが、全ての因子の立体構造を解析することは極めて困難である。

真核細胞の転写反応に関わる因子の中で、転写基本因子 TFIID は正確な位置からの転写に必須な転写開始因子であり、全遺伝子の 9 割の発現に関わる転写開始における重要因子である。さらに、TFIID は先述の真核細胞の転写開始に必要な一連のドメインを全て持っていることから、TFIID の立体構造解析を中心に研究を進めれば、真核生物の転写開始反応の全容を理解できると考え、私たちは TFIID の立体構造解析を目指した研究を開始した。

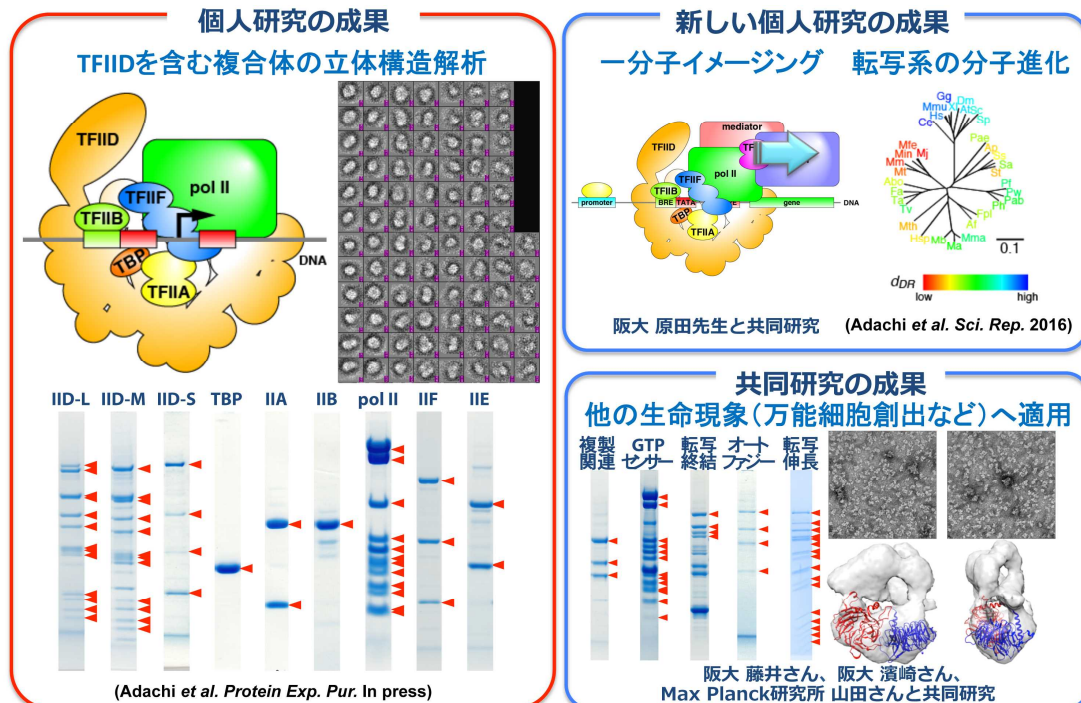
2. 研究成果

(1) 概要

TFIID の立体構造解析に向けた大量精製における難点(分子量が大きい・サブユニット数が多い・細胞内での発現量が少ない・精製の過程でサブユニットが脱離しやすい)を、さきがけ研究のサポートを経て克服し、約 90%の純度で TFIID を大量精製する系を確立した。現在は、領域内のさきがけ研究者である阪大・藤井博士との共同研究によって、最終精製標品の品質を電子顕微鏡による負染色像観察で確認しつつ、結晶化スクリーニングを行っている。

また、TFIID は三日月型の形状を持つが、柔軟な形状を持つことが知られている。TFIID の形状を安定化させるためには、三日月型の凹部分に相互作用因子を結合させることが望ましい。私たちは生化学的な相互作用解析や電子顕微鏡による低分解能の単粒子解析から、TFIID の凹部分に相互作用することが予想されている TFIIB, pol II, TFIIF, TFIIE, TFIIA を約 90%の純度で精製した。特に TFIIA については、2 種類のサブユニットを単独で発現させると不溶化するため、精製法の改善を行い、2 種類のサブユニットを融合して発現した後に protease で切り離すことによって、可溶性画分から精製することに成功した [論文リスト 1]。これらの精製標品を用いて、TFIID を含む超分子巨大複合体を再構成して立体構造を解析する計画である。

さらに、超分子巨大複合体の再構成においては、各因子を混合する順序が重要であることから、進化的に誕生した順序を参考にすることを考えた。新しい分子進化の指標を開発して、TFIID の DNA 結合サブユニットである TBP よりも、TFIIB が先に生まれたことを解明し [論文リスト 2]、進化的に誕生した順序で混合することによって、より安定な複合体の再構成を試みる計画である。



(2) 詳細

研究テーマ A 「TFIID の大量精製法の改善」

TFIID は 15 種類のサブユニットから構成される約 1MDa の複合体であるが、立体構造解析に

向けた大量精製における難点(分子量が大きい・サブユニット数が多い・細胞内での発現量が少ない・精製の過程でサブユニットが脱離しやすい)を、さがけ研究のサポートを経て克服し、約 90%の純度で TFIID を大量精製することに成功した。

大量精製法の改善において、具体的に検討した項目は、タグの種類(HA タグ、TAP タグなど)、タグを付加するサブユニット(どのサブユニットにタグを付加するかによって、最終精製標品のサブユニット構成が変わってくるため、適切なサブユニットにタグを導入する必要がある)、集菌 OD(TFIID は制御複合体であるため、細胞の対数増殖期以外は発現量が減少するため、集菌時の OD を厳密にコントロールする必要がある)、破碎方法(出芽酵母は細胞壁があり、プロテアーゼの活性も高いため、低温かつ短時間で破碎できる方法を採用する必要がある)、レジンと WCE の比率、溶液条件(TFIID は高塩濃度では安定だが、低塩濃度ではサブユニット間相互作用が維持されないため、適切な塩濃度を維持する必要がある)、レジンの種類(第一段階のタグアフィニティー精製だけでは純度が不十分なので、第二段階としてイオン交換レジンやアフィニティーレジンを網羅的に検討した)、核酸の除去(精製の過程で混入する核酸が RNA であることを突き止め、nuclease によって除去した)、濃縮時の additive の検討(濃縮時の回収率を上昇させるために、複数種類の塩を additive として加えて、その影響を調べた)。以上の通り、一連の検討を行った結果、最終精製標品の収率が上昇し、研究テーマ A の目標は達成できたと考えている。

以上、TFIID の大量精製法の改善を通して確立した精製手法を、他の複合体の精製にも適用してきた。さがけ研究期間中に、細胞の万能化に関わる複製関連複合体、GTP センサーに関連する複合体、転写終結に関わる複合体、オートファジーに関わる複合体、転写伸長に関わる複合体を精製することに成功した。

研究テーマ B「電子顕微鏡による負染色像観察および X 線小角散乱による観察」

研究テーマ A で精製した TFIID について、領域内のさがけ研究者である阪大・藤井博士との共同研究により、電子顕微鏡による負染色像観察を行った。その結果、TFIID に対応する約 20nm の粒子を観察できたものの、粒子像を詳細に観察したところ、粒子のサイズや形状の均一性が低いように見られた。一部のサブユニットが外れたものが混ざっているか、形状の不均性が原因と考えられる。これらを克服するために、研究テーマ C において TFIID の相互作用因子を精製し、相互作用因子によるサブユニット間相互作用の安定化と全体形状の安定化を試みる計画である。

TFIID とほぼ同様の方法で精製し、同時進行している複製関連複合体については、電子顕微鏡による負染色像観察において均一な粒子が見られ、試験的な画像解析によって、単粒子構造が得られた。現在は、高分解能の単粒子解析を目指して、クライオ電子顕微鏡による氷包埋像の観察を行っており、詳細な観察条件を検討中である。

研究テーマ C「TFIID 相互作用因子の精製」

これまでに行われた電子顕微鏡による低分解能での単粒子解析から、TFIID が三日月型の形状を持つことや、その形状が不安定であることが明らかにされている。TFIID の形状を安定化するには、三日月型の凹部分に対して、DNA, TFIIB (1 subunit), pol II (12 subunits), TFIIF (3

subunits), TFIIIE (2 subunits), TFIIIA (2 subunits) などの相互作用因子を結合させることが必要であると想定されている。本研究課題が開始する前に、TFIIB, pol II については、既に約 90%の純度で精製することに成功していた。また、本研究課題の開始後、直ちに TFIIIF, TFIIIE の精製に取りかかり、TFIID で確立した出芽酵母からの内在性複合体の精製法を適用したところ TFIIIF, TFIIIE を約 90%の純度で精製することに成功した。

しかし、TFIIIA については TFIID と同じ方法で、出芽酵母から内在性複合体を精製することはできなかった。TFIIIA は、真核細胞の転写開始に必須な因子であるが、2 種類の構成サブユニットを単独で発現させると不溶性画分に分画されることが知られており、精製には変性とリフォールディングといった数多くの操作が必要であったため、真核細胞の in vitro 転写系を再構成する上での、材料調製のボトルネックと考えられていた。今回、TFIIA の 2 種類のサブユニットを融合して発現することによって、可溶性画分に発現させることに成功し、精製途中に protease で切り離すことによって、少ないステップ数で精製することに成功した [論文リスト 1]。これらの精製標品を用いて、TFIID を含む超分子巨大複合体を再構成して立体構造を解析する計画である。

加えて、超分子巨大複合体の再構成においては、各複合体を混合する順序が重要である。私たちは、対象とする遺伝子の祖先型からの変化度を示す d_{DR} (distance between Direct Repeat) という分子進化の示標を開発し、約 30 億年前に、TFIID の DNA 結合サブユニットである TBP よりも、TFIIB が先に生まれたことを解明した [論文リスト 2]。この結果を踏まえて、進化的に誕生した順序で混合することによって、より安定な複合体を再構成できるのではないかというコンセプトを提案し、実際に、TFIID を含む複合体に対して試みる計画である。

3. 今後の展開

今後も引き続き、TFIID および TFIID を含む超分子巨大複合体の立体構造解析を試みる。また、X 線結晶構造解析や電子顕微鏡による単粒子解析では得ることが難しい、分子の動的な情報を得るために、構造生命領域アドバイザーである阪大・原田先生との共同研究を開始し、真核細胞の転写開始反応の一分子イメージングの研究を進めている。

さらに、転写開始反応という極めて洗練された情報処理システムが、進化の過程で、どのようにして構築され、どのように高度化したか、といった設計原理を理解するために、分子進化の研究を発展させている。私たちが開発した d_{DR} に基づいて、転写開始反応に関わる因子の祖先型からの変化の様子や、どのようにして真核細胞の転写システムが機能的な複雑性を獲得していったかを解明していく計画である。

今後、TFIID の構造・機能・進化の研究で確立した様々な研究手法を、他の生命現象にも応用し、さらに研究を発展させる事を計画しており、既に、複製反応を経由して細胞の万能化に関わる超分子複合体などを出芽酵母から大量精製し、結晶化スクリーニングを行っている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況

研究テーマとして、(A) TFIID の大量精製法の改善、(B) 立体構造に向けた品質確認法の確

立、(C) 安定化因子の精製の3点を挙げ、それを踏まえて、TFIIDの結晶化と立体構造解析を最終目的として掲げた。これら4点の中で、研究テーマの3点については、上述の通りに達成できたと考えており、この時点での研究目的の達成状況は75%と考えている。

次に、目的として掲げたTFIIDの結晶化と立体構造解析については、さがけ研究期間内に、TFIIDおよびTFIIDを含む複合体の立体構造は決定できなかったものの、結晶化に至るパイプラインを確立し、今後、結晶化スクリーニングを繰り返すだけという状況を作り出すことに成功した。また、研究計画には含まれていなかった、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析について、共同研究を通して本格的に着手できる状況を整えた。さらに、TFIIDの研究で確立した手法を他に適用することで、複製関連複合体、GTPセンサー関連複合体、転写終結関連複合体、オートファジー関連複合体、転写伸長関連複合体を精製することに成功した。以上の一連の成果を加味し、研究目的の達成状況は90%と考えている。

・研究の進め方

実施体制は、学生1名、テクニシャン1名という体制であった。マンパワーの不足はいなめなかったものの、共同研究によって克服する方針をとり、構造生命領域の阪大・藤井博士、阪大・原田先生、Max Planck研究所・山田博士などとの領域内連携を通して、研究を大きく発展させることができたと考えている。

研究費はほぼ計画通りに執行することができた。ただし、さがけ研究期間中に、新たに誕生した共同研究については研究費が不足したため、平成27、28年度に、それぞれ増額申請を行った(平成27年度:800千円、平成28年度:750千円)。

・研究成果の科学技術および社会・経済への波及効果

生命科学の基盤情報を与える構造生物学において、様々な技術的な進歩により、多くのタンパク質の立体構造が解析可能になってきた。しかし、生体内においてタンパク質は単体で働くのではなく、複合体を形成して機能するにも関わらず、本研究課題で対象としたようなタンパク質複合体の立体構造解析は、未だ困難が多く成功例も少ない。特に、TFIIDのような制御複合体は、生命の恒常性維持に関わる重要なタンパク質複合体であるにもかかわらず、少量しか精製できないことや、形状が柔軟であることから、高分解能での立体構造解析は極めて困難である。本研究課題において、制御複合体の大量精製法の確立や、立体構造解析に向けた品質確認法の確立ができた点は、今後、生命科学研究の様々な分野において制御複合体を精製する際に適用可能であり、多大な貢献をできることが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

純度に改善すべき点はあるが、転写基本因子TFIIDを構成する発現量が多くない15種類のタンパク質の超分子複合体を発現し、90%の純度の精製に成功し、結晶化の前段階まで進められたことは大きな進展である。

ただし、TFIIDの結晶化と立体構造解析の達成のためには、なんらかのブレークスルー(新しい技術開発)等が必要かもしれないので、タンパク質試料作製の効率化、再構成の方法の簡便化等の技術を種々検討して開発して欲しい。巨大な複合体タンパク質の競争力はこの辺から生まれると思う。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Adachi, N., Senda, T., and Horikoshi, M. Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. <i>Scientific Reports</i> 2016, 6, 27922. |
| 2. Adachi, N., Aizawa, K., Kratzer, Y., Saijo, S., Shimizu, N., and Senda, T. Improved method for soluble expression and rapid purification of yeast TFIIA. <i>Protein Expression and Purification</i> 2017, in press. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表(国外)

Adachi, N., Aizawa, K., Yamaguchi, Y., and Senda, T. (2014.09). Large-scale purification of general transcription factor TFIIIF. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin, New York (USA). (ポスター発表)

Adachi, N., Yamaguchi, Y., and Senda, T. (2015.08). Large-scale purification and functional analyses of RNA polymerase II and general transcription factor TFIIIF. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Mechanisms of eukaryotic transcription, New York (USA). (ポスター発表)

Adachi, N., Senda, T., and Horikoshi, M. (2016.03). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. Keystone Symposia: Chromatin and Epigenetics, Whistler (Canada). (口頭発表)

Adachi, N., Senda, T., and Horikoshi, M. (2016.09). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Epigenetics & Chromatin, New York (USA). (ポスター発表)

Adachi, N. (2017.01). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. JST-Bay Area Structural Biology Work Shop, Stanford Univ. (口頭発表)

学会発表(国内)

安達成彦 (2014.12). 「立体構造解析に基づいた真核細胞生物の遺伝子発現制御機構の解析」, BIO interconference 2014, 東京. (口頭発表)

安達成彦 (2015.03). 「生き物が遺伝情報を巧みに活用する仕組みの研究」, 早稲田大学・理工バイオの集い, 東京. (口頭発表)

安達成彦、千田俊哉 (2016.06). 「出芽酵母からの超分子複合体の精製」, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡. (口頭発表・ワークショップ)

安達成彦、千田俊哉、堀越正美 (2016.07). 「分子進化の新しい解析法の発見により数十億年前から現在に至る遺伝子制御システムの進化を明らかにした」, 日本 Archaea 研究会第 29 回講演会, 東京. (口頭発表)

安達成彦 (2016.08). 「立体構造解析を手掛かりにした分子進化の新しい解析法の発見」,

I-URIC フロンティアコロキウム(第2回), つくば. (口頭発表)

安達成彦、相沢恭平、山口佑香、千田俊哉 (2016.09). 「超分子複合体の大量精製と立体構造解析に向けた試み」, 第89回日本生化学会大会, 仙台. (口頭発表・シンポジウム)

Adachi, N. (2016.10). Uncovering ancient transcription systems with a novel evolutionary indicator. NIG Biological Symposium, 静岡. (口頭発表)

安達成彦、相沢恭平、山口佑香、千田俊哉 (2016.11). 「マルチサブユニット複合体研究の出発点: 大量精製と立体構造解析に向けた試み」, 第39回日本分子生物学会年会, 横浜. (座長と口頭発表・シンポジウム)

プレスリリース

「分子進化の新しい解析法の発見により、数十億年前から現在に至る遺伝子制御システムの進化を明らかにした」 (2016.06)

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/pressrelease/20160616/>

「分子進化の新たな解析法を発見」 (2016.06)

<https://www2.kek.jp/imss/news/2016/topics/0617evolution/>

「分子進化論」 (2016.07)

<https://www.kek.jp/ja/NewsRoom/Highlights/20160725134700/>