

Tup1-Cyc8 コリプレッサー複合体のハイブリッド構造解析 Hybrid structural analysis of the Tup1-Cyc8 corepressor complex

松村浩由^{1*}、清水伸隆²、井上豪³

¹立命館大学生命科学部生物工学科

²高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所

³大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻

Hiro Yoshi Matsumura^{1*}, Nobutaka Shimizu², Tsuyoshi Inoue³

¹Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

²Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

³Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University

1 はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Tup1-Cyc8 複合体は、Tup1 4 分子と Cyc8 1 分子とが結合した分子量約 400kDa の転写抑制因子であり、性分化、DNA 損傷など 180 種類以上の多様な遺伝子の転写抑制に必須である。また、Tup1 ホモログは全ての真核生物に保存されており、例えば、ヒトの Tup1 ホモログ TLE の機能を失った細胞はガン化する。Tup1-Cyc8 複合体は機能解析が積極的に進められてきた蛋白質であるが、一方で Tup1-Cyc8 複合体の立体構造情報が不足しているため、その分子機構の理解は乏しい。

申請者らは Tup1 の四量体形成に必要な Tup1 の N 末端ドメイン (Tup1N) の立体構造を世界に先駆けて報告し (*JBC*, 2012)、Tup1 の四量体がコイルドコイル相互作用で安定化されていることを解明したが、やはりこれもドメインの解析であるため「Tup1-Cyc8 の転写抑制機能の分子機構」についての明確な知見は得られなかった。Tup1-Cyc8 複体内における相互作用やドメイン間の相対配置などの構造情報が得られれば、本複合体の構造-機能相関が初めて解明されるだけでなく、他の Tup1 ホモログ (Groucho, TLE など) にも共通する転写抑制の構造基盤の解明となる。そこで、X 線結晶構造解析と X 線溶液散乱を組み合わせた相関解析に取り組んだ。

2 実験

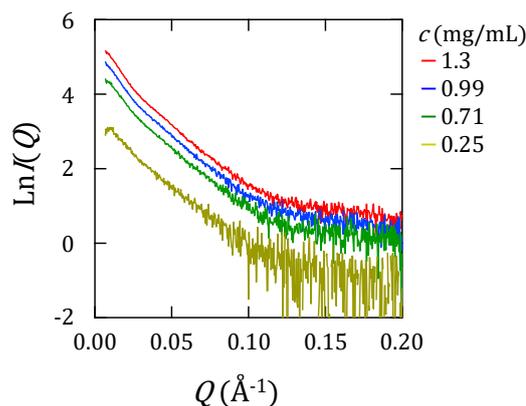
S. cerevisiae 由来 Tup1 の N 末端領域 (1-92) を従来の方法で発現精製した (以下、Tup1N)。さらに、*S. cerevisiae* 由来 Cyc8p の N 末端領域

(45-149) を大腸菌発現系で発現させ精製した (Cyc8 TPR1-3)。この領域は、Tup1 と結合する最小領域とされる。精製した Tup1N と Cyc8 TPR1-3 を混合し、Native-PAGE にて結合の有無を観察したところ、両者が強固に結合して Tup1N/TPR1-3 複合体を形成することが確認できた。その後、本複合体をゲル濾過によって精製した。そして、得られたサンプルを 1.3 mg mL^{-1} から 0.25 mg mL^{-1} まで濃度バリエーションを作成し、SAXS 測定を行った。

3 結果および考察

Tup1N と Cyc8 TPR1-3 のそれぞれが 4 分子ずつ結合すると仮定し測定濃度を設定した。 0.25 mg/mL から 1.3 mg/mL の濃度範囲で測定を行った (図 1)。

図 1



Guinier プロットからそれぞれの濃度 c での R_g^2 と原点散乱強度を求めた。直線近似によるゼロ濃度外挿から $R_g = 62.6 \pm 2.0 \text{ \AA}$, $I(0)/c = 100.5 \pm 2.5 \text{ mL/mg}$ と見積もることができた。また、Kratky プロットからタンパク質が折り畳まれていることを確認した。この濃度範囲では慣性半径と平均会合数の濃度依存

性が小さく濃度ゼロ外挿に適したデータセットであると考え、濃度ゼロ外挿した散乱曲線から距離分布関数 $P(r)$ を見積り、分子最大長 $D_{\max} = 248 \text{ \AA}$ であると見積もられた。

4 まとめ

本研究によって Tup1N と Cyc8 TPR1-3 が安定な複合体を形成することが分かった。今後は、更に濃度バリエーションを増やして多点での測定を行うことでより高精度のデータを取得し、三次元構造解析を行っていきたいと考えている。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金 25440022, 26102526 の助成を受けて行ったものです。ここに感謝致します。

参考文献

[1] Matsumura, et al., *J. Biol. Chem.*, 287, 26528-26538 (2012).

* h-matsu@fc.ritsumei.ac.jp