

# 出芽酵母転写抑制因子の相関構造機能解析 Correlative structure functional analysis of yeast transcriptional repressor

松村浩由<sup>1</sup>、清水伸隆<sup>2</sup>

<sup>1</sup>立命館大学生命科学部生物工学科

<sup>2</sup>高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所

Hiro Yoshi Matsumura<sup>1\*</sup>, Nobutaka Shimizu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

<sup>2</sup>Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK)

## 1 はじめに

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Tup1 は、Cyc8 とコリプレッサー複合体を形成することで、遺伝子の転写を抑制する転写抑制因子であり、性分化、グルコース、酸素濃度、DNA 損傷等によって制御される 180 種類以上に及ぶ遺伝子を標的とする。Tup1 ホモログとして、例えばヒトでは TLE が知られており、酵母以外の真核生物にも広く保存されており、そのドメイン構成や機能の類似性から、Tup1 様の転写抑制機構は他の高等生物に共通すると考えられている。また、TLE には、がんの発現や進行への関与が報告されており、Tup1 ホモログの転写抑制プロセスの構造基盤を解明することで、がん発現メカニズムに関する新たな知見が獲得できることが期待される。このように Tup1-Cyc8 コリプレッサーは、遺伝学的・生化学的な機能解析が積極的に進められてきた転写抑制因子である。

Tup1 は 3 つの機能ドメインを有するマルチドメインタンパク質であり、個々のドメイン単位での構造解析が進められてきた<sup>1,2)</sup>。N 末端領域は Tup1 四量体形成に必須のコイルドコイルドメインであり、我々のグループがその立体構造を報告した。また C 末端領域は  $\beta$  プロペラ構造を有しておりこちらは様々なタンパク質間相互作用を担っていることが示唆されている。しかし、未だ全ドメインを含めた全長構造、および Cyc8 と結合した複合体構造の情報は得られていない。このマルチドメインタンパク質の機能の発現には、分子内のドメイン相互の関係および機能に関わる他のタンパク質との相互作用を詳細に調べる必要があり、全長構造・複合体構造の解析が不可欠である。そこで本研究では、Tup1、Cyc8 の部分ドメイン複合体および Tup1 全長に対して複数の測定手法を組み合わせた相関解析を行った。

## 2 実験

Tup1-Cyc8 複合体形成における相互作用領域である Tup1\_NTD (1-92 アミノ酸領域)、Cyc8\_TPR(1-3) (45-149 アミノ酸領域) を組み換え大腸菌による

大量発現、精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより複合体サンプルを調製した。これをもとに複数の濃度点による希釈系列を調製し、小角 X 線散乱測定を行い、濃度による性状の変化を観察した。また、Tup1 全長を組み換え酵母により大量発現、精製を行い、動的光散乱 (DLS) 法、MALDI-TOF/MS により精製サンプルの評価を行った。続いて、電子顕微鏡による構造解析を目指し、ネガティブ染色法によるサンプル評価を行った。

## 3 結果および考察

### (1) Tup1\_NTD-Cyc8\_TPR(1-3)複合体の構造的性状

Tup1\_NTD-Cyc8\_TPR1-3 および各単体の小角 X 線散乱測定によって得られた散乱曲線から Guinier 解析を行い、推定分子量を計算した。複合体に関してタンパク質濃度に応じて分子量の値が変化することが分かった (図 1)。複合体の濃度依存性は各単体に比べ顕著に大きかった。

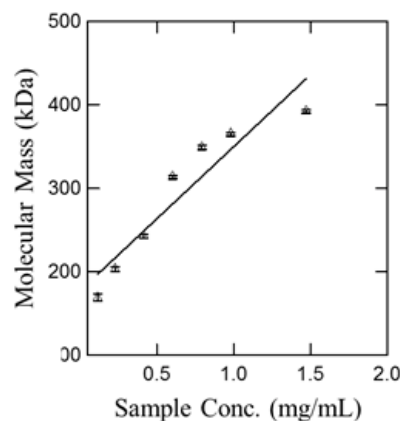


図 1 サンプル濃度と推定分子量の関係

### (2) Tup1 全長の性状解析

これまで一般的な遺伝子組み換え大腸菌や酵母による Tup1 全長の発現は困難であった。そこで新たにプロテアーゼ遺伝子破壊を行った酵母の低温誘導

発現系を試験したところ、Tup1 全長の大量発現に成功した。各種カラムによる精製条件検討により、単離されたサンプルに対して、MALDI-TOF/MS および DLS を用いてサンプルの純度および分散状態を調べた。その結果、Tup1 全長の分子量に相当するピークのみが確認され、全長成分を保持した Tup1 が高い純度で単離されたことが確認された。また DLS より、粒子径分布が狭く単分散なサンプルであることも確認できた。

続いてネガティブ染色法による観察を行った結果、WD40 ドメインと思われる球状の分子が明瞭な輪郭で観察され、単分散かつ高純度であることが確認できた。

#### 4 まとめ

先行研究で、Tup1-Cyc8 はオリゴマーを形成することで転写抑制時におけるヒストンへの作用範囲を拡大することが示唆されている。本データから、Tup1 に Cyc8 が結合することが転写抑制機構における自身のオリゴマー化のトリガーである可能性が示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) H. Matsumura *et al.*, *J. Biol. Chem.* **287**, 75-86 (2012)
- 2) E. R. Sprague *et al.*, *EMBO J.* **19**, 3016-3027 (2000)

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