

論文の内容の要旨

論文題目 Aryl hydrocarbon receptor の構造生物学的研究

氏 名 櫻井 駿也

【背景】

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)は外来異物であるダイオキシンを認識する受容体として同定され、異物代謝のための遺伝子発現を制御する転写因子である。それに加えて、AhR は内因性の多様なリガンドに応答することで、T細胞の分化調節や tryptophan-2,3-dioxygenase – kynurenine 経路を介した癌の亢進など、様々な生理的機能を持ち、創薬ターゲットとして注目されている。

AhR は通常細胞質で Hsp90 などのシャペロンと複合体を形成しており、リガンド依存的に核内に移行する(図 1)。そこで AhR nuclear translocator (ARNT) 及び xenobiotic-responsive element (XRE)と呼ばれる DNA 配列に結合し、

コアクチベータをリクルートしターゲット遺伝子の転写を活性化する。AhR が誘導するタンパク質の1つである AhR repressor (AhRR)は、ARNT とのヘテロダイマー化と、それに続く XRE との結合によって AhR の転写活性を競合的に抑制する。加えて AhRR はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)などのコリプレッサーをリクルートすることで転写を抑制するとされている。

AhR, ARNT, AhRR は全て basic-helix loop helix (bHLH) – PER-ARNT-SIM (PAS)ファミリーに属する(図 2)。このファミリーは一般的に N 末端側に DNA 結合を担う bHLH ドメインとタンパク質間の相互作用やリガンド結合に関わる PAS ドメインを 2 つ持ち、C 末端側に転写を制御す

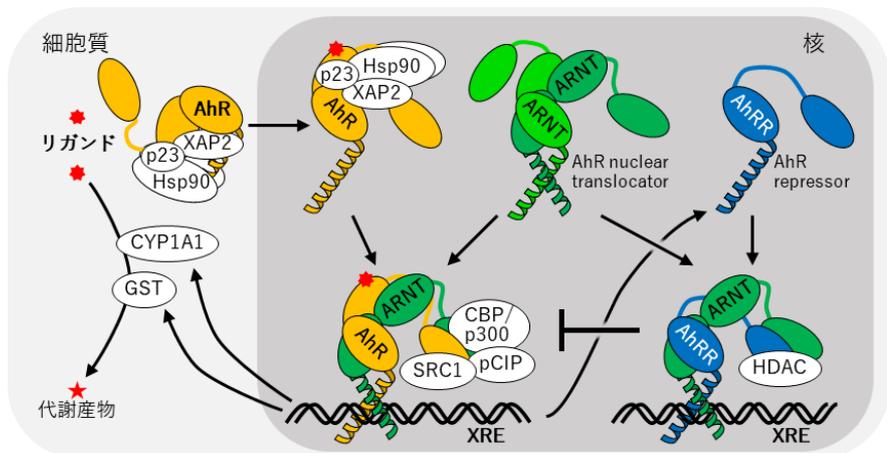


図 1. AhR のシグナル経路

る領域を持つ。ただし、AhRRはPASドメインを1つしか持たない。

これまでに転写を活性化するAhR/ARNT/DNA複合体のbHLH—PAS-A領域の構造が報告されているが、リガンド結合ドメインであるPAS-Bドメインの構造は明らかになっておらず、詳細なリガンド認識機構

やPAS-Bドメインを含めた四次構造は不明である。また、転写を抑制するAhRR/ARNT複合体については、構造情報は皆無だった。本研究ではAhRの転写制御機構を構造生物学的に解明することを目的として、AhR/ARNT複合体についてX線結晶構造解析またはクライオ電子顕微鏡による単粒子解析に向けた検討を行った。また、AhRR/ARNT複合体についてX線結晶構造解析を行った。

【方法】

転写を活性化するAhR/ARNT複合体については、まずhuman由来のAhR, ARNTについてbHLHからPAS-Bドメインまでの領域を、昆虫細胞Sf9を用いて共発現させた。リガンドとしてAhRの内因性リガンドであるL-kynurenineを培地に添加した。破碎上清から、各種カラムを用いて精製することで高純度試料を得た。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによりDNAとの結合を確認した。より結晶化に適した試料を得るため、複数の種由来のAhR, ARNTやフレキシブルなループ領域を欠損させた変異体、熱安定性を向上させた変異体などを検討した。さらに、PAペプチド配列(GVAMPGAEDDVV)を挿入したAhR/ARNT複合体を作成し、PAペプチドの抗体NZ-1との複合体を調製した。得られた試料を用いて結晶化スクリーニングを行うとともに、ネガティブ染色またはクライオ条件下での電子顕微鏡観察を行った。

転写を抑制するAhRR/ARNT複合体については、human由来のAhRR (PAS-Aまで)とbovine由来のARNT (PAS-Bまで)のループ欠損体を、昆虫細胞Sf9を用いて共発現させた。破碎上清から、各種カラムを用いて精製することで高純度試料を得た。リジン残基をエチル化した試料について、結晶化スクリーニングを行いAhRR/ARNT複合体の結晶を得た。高エネルギー加速器研究機構にてX線回折データの収集を行い、HIF-2 α /ARNT (PDB ID: 4ZP4)の結晶構造をモデルとした分子置換法によって構造決定した。

【結果】

1. 転写活性化複合体 AhR/ARNT

Human, bovine, monkey, rabbit, pig, rat, chicken, xenopus, zebrafish由来の野生型(WT)及び変異体AhR/ARNT複合体について高純度試料の調製に成功した(図3Aに一例を示す)。ゲル濾過

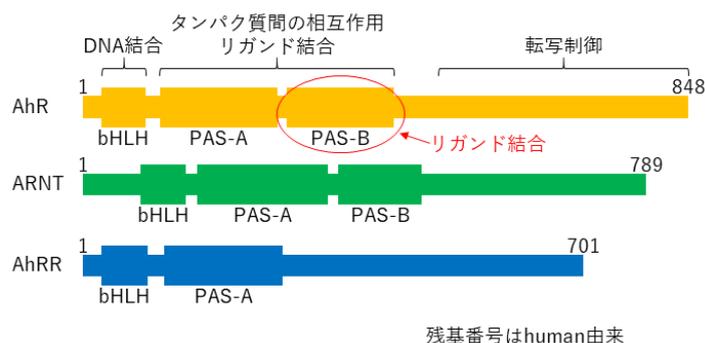
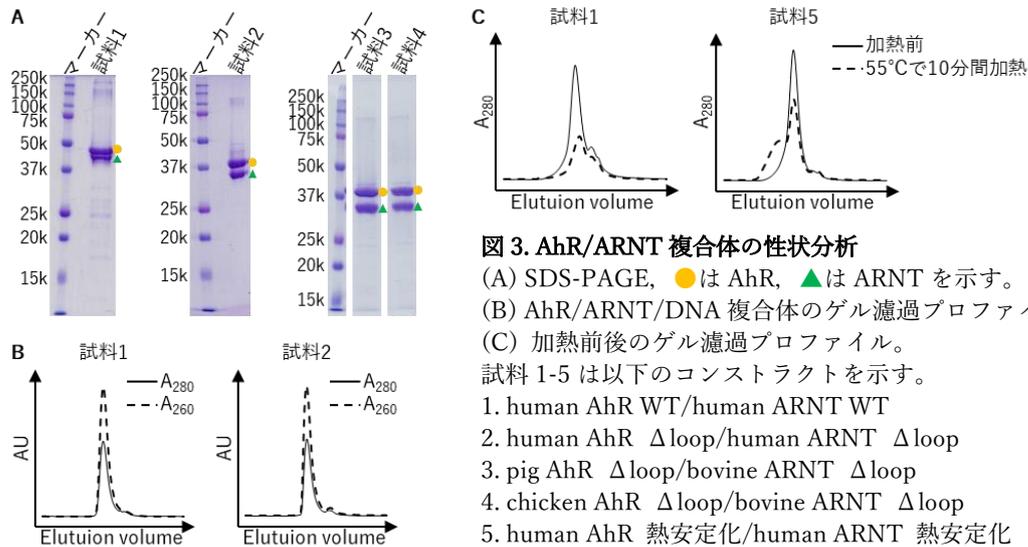


図2. AhR, ARNT, AhRRのドメイン構成

クロマトグラフィーにより DNA との結合を確認し, AhR/ARNT/DNA 複合体を調製した(図 3B)。初期の結晶化スクリーニングで結晶が得られなかったため, AhR/ARNT 複合体の安定性を向上させるために, ループ欠損体や熱安定性を向上させる変異を検討した。結果の一例を図 3C に示す。



野生型では 55°C, 10 分間の加熱で, ゲル濾過クロマトグラフィーでのピークがほぼ消失したのに対して, この変異体では 6 割程度ピークが残っていた。これまで 700 種類以上のコンストラクトを作成し, 100 種類以上の結晶化試料を調製した。タンパク質のアルキル化やプロテアーゼ限定分解, DNA の長さや配列, リガンドの種類などの条件を変更して 10 万以上の条件で結晶化スクリーニングを行ったが, 結晶は得られていない。

野生型 human AhR/ARNT/DNA 複合体についてクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行った結果, 12 Å の分解能でこれまでの bHLH-PAS ファミリーの構造解析から予測されるモデル (AhR/ARNT の bHLH-PAS-A (PDB ID: 5Nj8), HIF-2α/ARNT の PAS-B (PDB ID: 4ZP4) を基に作成) とよく一致する三次元マップが得られた(図 4)。

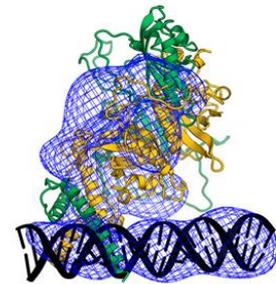


図 4. AhR/ARNT/DNA 複合体の予測モデルとクライオ電子顕微鏡解析で得られた三次元マップ(青色)

NZ-1 との複合体での構造解析に向けて, AhR/ARNT 複合体に 1~6 か所 PA ペプチドを挿入した試料を調製した。NZ-1 については主にフラグメント抗体である Fv-clasp を用いた。ゲル濾過クロマトグラフィーにより NZ-1 Fv-clasp との結合を確認し, AhR/ARNT/NZ-1 複合体試料を調製した(図 5)。ネガティブ染色電子顕微鏡画像を

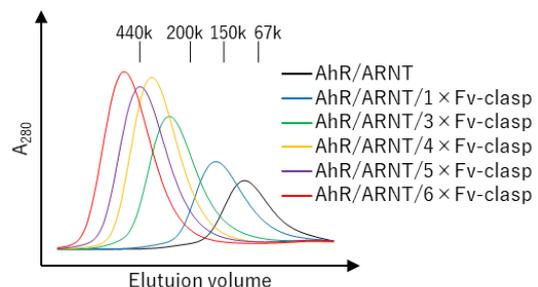


図 5. AhR/ARNT/NZ-1 複合体のゲル濾過プロファイル

取得し、二次元平均化を行った結果、複数の NZ-1 が結合したと考えられる平均像が得られた(図 6)。

2. 転写抑制複合体 AhRR/ARNT

AhRR/ARNT 複合体の構造を 2.4 Å の分解能で構造決定した(文献 1)。ARNT の各ドメインは AhRR に巻き付くように配置しており、約 3,600 Å² の領域で相互作用していた(図 7)。また、AhRR の bHLH と PAS-A ドメインは相互作用していたが、ARNT 分子内のドメイン間相互作用はなかった。AhRR/ARNT 複合体と AhR/ARNT (bHLH-PAS-A) 複合体の構造(PDB ID: 5NJ8)を比較すると、bHLH-PAS-A 領域の構造はよく似ていた(RMSD = 1.6 Å)。さらに、ARNT や DNA との相互作用に関わる残基は AhRR と AhR で高度に保存されており、AhRR が AhR を競合的に抑制する構造基盤が明らかになった。一方、他の bHLH-PAS ファミリーの構造と比較すると、AhRR は PAS-B ドメインを持たないため、ドメイン配置が異なっており、AhRR と ARNT に特異的な相互作用界面が観察された。

【考察】

転写を活性化する AhR/ARNT 複合体について、クライオ電子顕微鏡解析により DNA との複合体の低分解能三次元マップを得た。電子顕微鏡解析の結果から AhR/ARNT/DNA 複合体は構造多型が大きく、また分子量が小さいことから高分解能での構造解析には至っていない。構造多型とフレキシビリティが大きいことは結晶化を阻害する原因にもなっていると考えられる。NZ-1 Fv-clasp を結合させることで分子量が大きくなり、クライオ電子顕微鏡による構造解析につながることが期待される。

転写を抑制する AhRR/ARNT 複合体の構造解析によって AhRR の抑制機構の 1 つである AhR との競合モデルを構造生物学的に示すことができた。さらに他の bHLH-PAS ファミリーとの比較から AhRR/ARNT 複合体に特徴的なドメイン配置が明らかになった。この特徴的なドメイン配置はコリプレッサーのリクルートなど競合モデル以外の転写抑制機構に関与する可能性がある。

【参考文献】

1. Sakurai, S. *et al.* (2017) The crystal structure of the AhRR-ARNT heterodimer reveals the structural basis of the repression of AhR-mediated transcription. *J Biol Chem.* **292**, 17609-17616

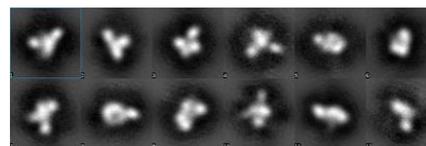


図 6. AhR/ARNT/6×NZ-1 複合体のネガティブ染色電子顕微鏡観察により得られた二次元平均化像

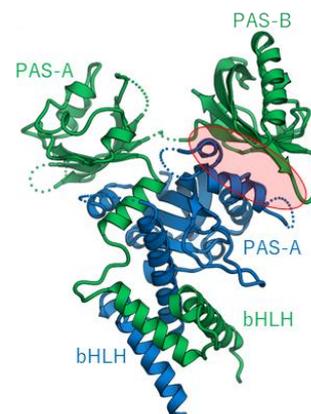


図 7. AhRR/ARNT 複合体の結晶構造

赤丸は AhRR/ARNT 複合体に特異的な相互作用界面。