

審査の結果の要旨

氏名 櫻井 駿也

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) はダイオキシンを認識する受容体として同定されたタンパク質であり、生体異物に応答して解毒や代謝のための遺伝子発現を制御する転写因子である。ダイオキシンの毒性のほとんどは AhR を介して発現すると報告されており、ダイオキシンによる AhR の持続的な活性化が原因だと考えられている。一方で、AhR は異物代謝の機能だけでなく、トリプトファン代謝物などの内因性リガンドを含む多様なリガンドに応答することで、リガンド特異的な T 細胞の分化調節や癌の亢進など、様々な生理的機能を持つことから、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いる。リガンド依存的に核内に移行し、AhR nuclear translocator (ARNT) とヘテロダイマーを形成する。AhR/ARNT は xenobiotic-responsive element (XRE) と呼ばれる特異的な DNA 配列に結合し、コアクチベータをリクルートすることで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 つに AhR repressor (AhRR) がある。AhRR は ARNT とのヘテロダイマー形成と、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などのコリプレッサーをリクルートすることで AhR の転写活性を抑制するとされている。

AhR, ARNT, AhRR は全て bHLH-PAS ファミリーに属している。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、それに続いて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 (PAS-A, PAS-B) 持ち、C 末端側に転写を制御する領域を持つ。AhRR は PAS ドメインを 1 つしか持たないという点で特徴的である。

AhR に関する構造情報についてはこれまでに AhR/ARNT/DNA 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、AhR によるリガンド認識機構の詳細や PAS-B ドメインを含めた四次構造は不明である。また、転写抑制複合体である AhRR/ARNT については、構造情報は皆無だった。

本論文は、AhR の転写制御機構を解明することを目的とし、転写活性化複合体 AhR/ARNT と、転写抑制複合体 AhRR/ARNT に関する構造生物学的な研究成果を述べたものである。

まず転写活性化複合体 AhR/ARNT の構造解明に向けた取り組みについて記す。複数の種由来

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, 破碎上清を, 各種カラムを用いて精製することで, リガンド結合能及び DNA 結合能を有する AhR/ ARNT の高純度試料を得た。より結晶化に適した試料を得るため, フレキシブルなループ領域の欠損や熱安定化変異を検討した結果, 野生型に比べて安定性が向上した変異体の高純度試料を得た。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。本研究において 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。

さらに, 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 と低分解能ではあるが, 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と概ね一致した三次元マップを得た。

次に, 転写抑制複合体 AhRR/ ARNT の結晶構造解析について記す。Human 由来の AhRR (PAS- A まで) と bovine 由来の ARNT (PASB まで) のループ欠損体を, 昆虫細胞 Sf9 を用いて共発現させ, 破碎上清を, 各種カラムを用いて精製することで高純度試料を得た。AhRR/ ARNT についてもタンパク質のアルキル化などの条件を変更して約 9000 条件で結晶化スクリーニングを行い, リジン残基をエチル化した試料を用いて結晶を得ることに成功した。X 線回折実験を行い, 2.4 Å の分解能で AhRR/ ARNT の結晶構造を決定した。AhR/ ARNT (bHLH-PAS- A 領域) の結晶構造との比較から, bHLH-PAS- A 領域において AhRR/ ARNT と AhR/ ARNT の構造はよく似ており (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いたことから, 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/ ARNT の特徴的な相互作用界面が観察された。この特徴的な相互作用界面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」と述べている。

本論文は転写活性化複合体である AhR/ ARNT について大規模な結晶化スクリーニングを行い, クライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって原子分解能には至っていないが, リガンド結合ドメインである PAS- B ドメインを含む領域での構造解析に迫った。また, 本論文はこれまで不明だった転写抑制複合体である AhRR/ ARNT について結晶構造を決定し, AhRR による転写抑制機構の構造基盤を明らかにしたものであり, 博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。