

学 位 論 文 題 名

Structural Studies of Sequence-Specific
and Nonspecific DNA-Binding Proteins

(配列特異的および非特異的なDNA結合タンパク質に関する
構造学的研究)

学位論文内容の要旨

生体内では、多種多様な DNA 結合タンパク質が存在し、DNA の複製、修復、組み換えなど、あるいは遺伝子の転写制御や DNA の高次構造の制御など、さまざまな生理反応に関与している。これらのタンパク質は、その機能に応じて、DNA 配列に特異性をもって結合するものと DNA 配列に非特異的に結合するものがある。本研究では、これら 2 種類の DNA 結合タンパク質の代表として、原核生物のヒストン様 DNA 結合タンパク質である *Bacillus stearothermophilus* 由来 HU の結晶構造解析、および、肝特異的転写因子であるラット由来 HNF-6 α とその認識 DNA との複合体の結晶構造解析を行った。以下に論文の内容に沿った要旨を示す。

HU タンパク質は、配列非特異的に DNA に結合することにより、ヌクレオソーム構造の制御、あるいは DNA の複製、組み換え、および転写などの生理反応における DNA の構造変化に関与し、これらの促進因子として機能することが知られている。HU タンパク質はホモあるいはヘテロダイマーとして存在し、コンパクトな分子基部より伸びた一対の β アームによって DNA と副溝を介して結合することが、*Anabaena* 由来 HU と DNA の複合体の結晶構造によって明らかとなった。しかし、DNA 非結合型 HU の β アーム構造については、これまでの結晶構造中ではディスオーダーしており、詳細な報告がなかった。

本研究では、*Bacillus* 由来 HU の結晶構造を決定し、非対称単位中の 6 種類の構造を比較することにより、はじめて DNA 非結合型 β アームについての詳細な構造的知見を得た。DNA 非結合型の HU は、二量体化によって形成される分子基部は 6 種類の構造間でほとんど構造変化がなかった。一方、DNA の副溝と相互作用する β アームについては構造変化が大きく、分子基部を重ね合わせると、アームの末端はおよそ 20 Å の開きがあった。本研究では、非常に特徴的な DNA 結合 β アームのフレキシビリティについての構造学的な分析とともに、

DNA との配列非特異的相互作用に関連があるとされている、アミノ酸側鎖間の塩橋について報告する。

栄養素や薬物の代謝など多様な生理機能を有する肝臓は、その機能発現のために非常に高度に分化した組織である。肝臓組織の発生や分化は肝細胞に特異的な転写調節機構により制御されており、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) などのような肝特異的転写因子群により厳密に調節されている。HNF-6 タンパク質はこのような転写因子群のひとつであり、肝細胞の発生や分化、増殖などの調節のほか、代謝に関連する多様な遺伝子の転写調節機能もまた有している。HNF-6 の DNA 結合領域は CUT ドメインとホメオドメインという二つの DNA 結合ドメインから成っており、ONECUT ホメオドメインタンパク質と呼ばれている。このタンパク質は、認識する DNA 配列の種類によって、異なる DNA 結合特性、あるいは転写活性化特性を示す。本研究では、ラット由来 HNF-6 α の DNA 結合ドメインと、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子のプロモーター領域を含む 14 塩基対の認識 DNA との複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定した。

解析の結果、CUT ドメインとホメオドメインは DNA の同じ主溝に入り込み、二つのドメインをつなぐリンカーを介して巻きつくように DNA に結合していた。各ドメインの認識する DNA 配列はオーバーラップしており、これら二つのドメインは、DNA の構造変化を介して協同的に結合していることが明らかとなった。また、CUT ドメインについては、DNA との結合によって広範囲に構造変化を起こしていることが、DNA 非結合型構造との比較によって明らかになった。

HNF-6 タンパク質の DNA 結合あるいは転写活性化能については、TTR プロモーターとともに HNF-3 β プロモーターについても詳細に研究されている。TTR プロモーターを認識する場合においては、CUT ドメインおよびホメオドメインが、共に DNA 結合に関与するが、これまでの実験から、HNF-3 β を認識する場合には、ホメオドメインは DNA 結合に関与せず、転写活性化に関与することがわかっている。さらに、転写活性化の際に相互作用するコアクチベーターの種類、そして相互作用する部位もまた変化することが、これまでの実験および今回の解析から明らかとなった。

本研究では、これら二つのプロモーターの識別をどのように行い、そして、どのようにしてコアクチベーターとの相互作用に多様性を生み出しているかについて、CUT ドメインおよびホメオドメインの結合特性の変化、CUT ドメインにおける構造変化、そして二つのドメインによる協同的 DNA 結合から報告する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 佐々木 直 樹
副 査 助教授 出 村 誠
副 査 助教授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

Structural Studies of Sequence-Specific and Nonspecific DNA-Binding Proteins

(配列特異的および非特異的なDNA結合タンパク質に関する
構造学的研究)

生体内では、多種多様なDNA結合タンパク質が存在し、DNAの複製、修復、組み換えなど、あるいは遺伝子の転写制御やDNAの高次構造の制御など、さまざまな生理反応に関与している。これらのタンパク質は、その機能に応じて、DNA配列に特異性をもって結合するものとDNA配列に非特異的に結合するものがある。本研究は、これら2種類のDNA結合タンパク質の代表として、原核生物のヒストン様DNA結合タンパク質である *Bacillus stearothermophilus* 由来HUの結晶構造解析、および、肝特異的転写因子であるラット由来HNF-6 α とその認識DNAとの複合体の結晶構造解析を行ったものである。

HUタンパク質は、配列非特異的にDNAに結合することにより、ヌクレオソーム構造の制御、あるいはDNAの複製、組み換え、および転写などの生理反応におけるDNAの構造変化に関与し、これらの促進因子として機能することが知られている。HUタンパク質はホモあるいはヘテロダイマーとして存在し、コンパクトな分子基部より伸びた一対の β アームによってDNAと副溝を介して結合することが、*Anabaena* 由来HUとDNAの複合体の結晶構造によって明らかとされている。しかし、DNA非結合型HUの β アーム構造については、これまでの結晶構造中ではディスオーダーしており、詳細な報告がなかった。本研究は、*Bacillus* 由来HUの結晶構造を決定し、非対称単位中の6種類の構造を比較することにより、はじめてDNA非結合型 β アームについての詳細な構造的知見を得たものである。

栄養素や薬物の代謝など多様な生理機能を有する肝臓は、その機能発現のために非常に高度に分化した組織である。肝臓組織の発生や分化は肝細胞に特異

的な転写調節機構により制御されており、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF)などのような肝特異的転写因子群により厳密に調節されている。HNF-6 タンパク質はこのような転写因子群のひとつであり、肝細胞の発生や分化、増殖などの調節のほか、代謝に関連する多様な遺伝子の転写調節機能もまた有している。HNF-6 の DNA 結合領域は CUT ドメインとホメオドメインという二つの DNA 結合ドメインから成っており、ONECUT ホメオドメインタンパク質と呼ばれている。このタンパク質は、認識する DNA 配列の種類によって、異なる DNA 結合特性、あるいは転写活性化特性を示す。本研究では、ラット由来 HNF-6 α の DNA 結合ドメインと、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子のプロモーター領域を含む 14 塩基対の認識 DNA との複合体の結晶構造が 2.0 Å 分解能で決定された。解析の結果、CUT ドメインとホメオドメインは DNA の同じ主溝に入り込み、二つのドメインをつなぐリンカーを介して巻きつくように DNA に結合していた。各ドメインの認識する DNA 配列はオーバーラップしており、これら二つのドメインは、DNA の構造変化を介して協同的に結合していることが明らかとなった。また、CUT ドメインについては、DNA との結合によって広範囲に構造変化を起こしていることが、DNA 非結合型構造との比較によって明らかになった。HNF-6 タンパク質の DNA 結合あるいは転写活性化能については、TTR プロモーターとともに HNF-3 β プロモーターについても詳細に研究されている。TTR プロモーターを認識する場合においては、CUT ドメインおよびホメオドメインが、共に DNA 結合に関与するが、これまでの実験から、HNF-3 β を認識する場合には、ホメオドメインは DNA 結合に関与せず、転写活性化に関与することがわかっている。さらに、転写活性化の際に相互作用するコアクチベーターの種類、そして相互作用する部位もまた変化することが、これまでの実験および今回の解析から明らかとなった。本研究は、これら二つのプロモーターの識別をどのように行い、そして、どのようにしてコアクチベーターとの相互作用に多様性を生み出しているかについての構造学的基盤を与えるものである。

以上、本研究は、X線結晶構造解析法を用いることにより、配列特異的、及び非特異的に DNA に結合するタンパク質について、構造学的に研究したものである。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があるものと認めた。