

学位論文題名

Studies on the Structural Characteristics of a Novel Tandem Repeat DNA-Binding Domain, STPR

(タンデムリピートを有する新規 DNA 結合ドメイン STPR の
立体構造特性に関する研究)

学位論文内容の要旨

FMBP1 蛋白質 (fibroin-modulator-binding protein 1) は絹蛋白質フィブロインの転写制御因子の一つであり、フィブロイン遺伝子の転写開始点の上流領域およびイントロン領域に存在する DNA 配列 (ATNTWTNTA) に特異的に結合する。FMBP1 は 218 アミノ酸残基から成る蛋白質であり、その C 末端側 (99-190 a.a.) に DNA 結合ドメイン STPR (score and three amino acid peptide repeat) を有する。STPR は極めて相同性の高い 4 本のリピート (R1、R2、R3、R4) がタンデムに連結することで一次配列を構成する。興味深いことに STPR は真核生物に広く保存されており、進化上、重要な役割をしていることが予想されるが立体構造に関する報告は皆無である。そこで本研究では STPR の立体構造に関する特性を解析すること、および DNA 結合様式を解析することを目的とした。

初めに STPR 全長 (R1-R4) の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを DNA 非結合状態・DNA 結合状態の二状態で測定した。しかし何れもピークの重なりが甚だしく、NMR を用いて STPR 全長の立体構造決定は困難であることがわかった。そこで STPR 全長を構成する 4 本のリピート (R1、R2、R3、R4) を切り離し、ペプチドレベルで立体構造解析を行った。その結果、4 本のペプチドは同様な立体構造を持ち 1 本の短い α ヘリックス (3-10 a.a.) とランダムコイルから形成されることがわかった。またこの短い α ヘリックスは 2 つの分子内相互作用 (塩橋と N-capping box) により安定化されていることが分かった。次に 4 本のペプチド (R1、R2、R3、R4) と STPR 全長 (R1-R4) の関係を調べるため CD を用いて解析した。その結果、4 本のペプチドの平均スペクトルは STPR 全長のスペクトルと重なった。また 4 本のペプチドと STPR 全長は良く似た非協同的な熱変性曲線を示した。以上から STPR 全長の中で 4 本のリピートは相互作用せずに独立に運動していること、STPR 全長の立体構造は決定した 4 本のペプチドの立体構造を繋ぎ合わせたものに近似していることが示唆された。

続いて STPR 全長と DNA の結合比を決定するため、DNA 滴定実験を行い、ゲルシフトアッセイ、プルダウンアッセイにて評価した。その結果、STPR 全長は DNA に対して 1:1 で結合することが分かった。ここで DNA 結合状態における STPR 全長の立体構造について解析するため、DNA 非結合状態、DNA 結合状態の二状態で STPR 全長の CD スペクトルを比較した。その結果、DNA との結合に伴い STPR 全長のヘリックス含量が 31% から 76% まで増大することが分かった。また CD を用いた熱変性実験から、DNA 非結合時に観察された STPR 全長の非協同的な熱変性曲線は、DNA との結合に伴い協同的な曲線へと変化することが分かった。さらにトリプシン消化酵素を用いた限定分解実験から、

STPR 全長は DNA 非結合状態では消化酵素により全て分解されるのに対し、DNA 結合状態では STPR 全長が消化酵素に強く抵抗することが分かった。以上より STPR 全長は特異的 DNA と結合することで立体構造変化が著しく誘導され、ヘリックス含量のより多いリジットで球状な立体構造を形成することが示唆された。さらに DNA の立体構造を強く反映する近紫外領域の CD スペクトル測定から、複合体形成時、蛋白質のみならず DNA にも立体構造変化が誘導されることがわかった。

ここで α -ヘリックスを誘導する有機溶媒 1,1,1-trifluoroethanol (TFE) を用いて、DNA 結合状態における STPR 全長の立体構造の予測を試みた。初めに 4 本のペプチド (R1、R2、R3、R4) に対して TFE 滴定を行い、CD スペクトルの変化を観察した。その結果、何れのペプチドも TFE 濃度の増加に伴いヘリックス含量が増加すること、そして比較的低い TFE 濃度 (30-40%) でヘリックス含量が飽和に達することが分かった。また 4 本のペプチドの飽和ヘリックス含量の総和は、DNA 結合状態における STPR 全長 (R1-R4) のヘリックス含量とよく近似することが分かった。そこで TFE 濃度 30% 中における 4 本のペプチドの立体構造を NMR により解析した。その結果、何れのペプチドも C 末端側方向へのヘリックスの伸張 (3-20 a.a.) が観察され、この伸張したヘリックスは両親媒性の性質を示すことがわかった。CD 測定の結果をもとに考察すると、複合体形成時に観察されるリジットで球状な STPR 全長の立体構造は、物理化学的性質の良く似た 4 本の伸張ヘリックスがリンカーにより連結されることで形成されると予想された。

最後に STPR 全長の中で DNA との結合に関与しているアミノ酸残基を特定するため変異体を作成し、ゲルシフトアッセイを行った。まず、先に同定したヘリックス安定化因子の塩橋に注目し、各リピートの塩橋を破壊するような STPR 全長の変異体を 4 つ作成して DNA 結合能を評価した。その結果、R3 または R4 の塩橋を破壊した変異体では著しく DNA 結合能が欠損した。以上から STPR 全長を構成する 4 本のリピートは非常によく似た一次配列を持つにもかかわらず DNA 結合能に関して異なる役割を果たしていることが示唆された。次に DNA 結合能に関与していることがわかったリピートの 1 つ R3 に注目してこの領域のアミノ酸残基を 1 つずつアラニンに変えた STPR 全長の変異体を 17 個作成し、DNA 結合能を評価した。その結果、DNA 結合に関与していると思われる 6 つのアミノ酸残基を特定することが出来た。これらの 6 アミノ酸残基は伸張ヘリックスの片側の面に集中することから、この領域が R3 における DNA との結合面である可能性が示唆された。またヘリックス誘導試薬 TFE 中における変異体の二次構造を CD で解析した結果、R3 の中央に存在する Arg-9 が DNA 結合時に誘導されるヘリックスの伸張に深く関与していることがわかった。

過去の研究において DNA 非結合状態ではフレキシブルであるが、DNA 結合時にリジッドなヘリックス構造を形成する DNA 結合モチーフとしては bZIP や HLH が報告されている。これらは複合体形成時に dimer を形成すること、および DNA の立体構造がほとんど変化しないことが知られている。本研究から解明された STPR 全長の特性、すなわち DNA に対して 1:1 で結合し、複合体形成時に DNA の立体構造変化が観察されることを考えると、STPR 全長は典型的な DNA 結合モチーフと異なる新規モチーフを形成することが予想される。本研究では複合体形成時の立体構造を高分解能で決定することは出来なかったが、分光学的手法、生化学的手法から STPR 全長の DNA 非結合状態、DNA 結合状態における立体構造特性を明らかにした。すなわち DNA 非結合状態では 4 本の短いヘリックスが独立して運動しているということ、また複合体形成時、ヘリックス伸張が誘起されてリジットで球状な立体構造を形成することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 教 授 田 中 勲
副 査 准教授 相 沢 智 康
副 査 教 授 小布施 力 史 (大学院生命科学院)

学 位 論 文 題 名

Studies on the Structural Characteristics of a Novel Tandem Repeat DNA-Binding Domain, STPR

(タンデムリピートを有する新規 DNA 結合ドメイン STPR の
立体構造特性に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

鱗糸目昆虫のカイコは、成長の過程で大量の絹蛋白質を合成する。絹蛋白質はフィブロイン蛋白質とセリシン蛋白質などから構成されるが、これらの蛋白質は特定の時期に特定の器官でのみ発現することが可能である。これは種々の転写制御因子により転写レベルで遺伝子発現が制御されていることに起因する。転写制御因子 FMBP-1 (fibroin-modulator-binding protein-1) は、フィブロイン遺伝子の転写調節配列 (ATNTWTNTA) に特異的に結合し、フィブロインの特異的発現に強く関与していることが示唆されている蛋白質である。FMBP-1 は 218 アミノ酸残基から構成され、C 末端側半分 (99-190 a. a.) に特徴的な DNA 結合ドメイン STPR を持つ。STPR は非常に良く似た 23 アミノ酸残基から成るペプチド (R1, R2, R3, R4) が 4 本直結し、計 92 アミノ酸残基から成るタンデムリピート構造 (R1-R4) を有する。データベース検索の結果、STPR と同様の繰り返し構造が線虫からヒトまで真核生物に広く保存されていることが判明し、進化上、重要な機能を保持していると予想されるが、立体構造を含め詳細については未知であり、これまでほとんど研究が行われていない。

本論文は、真核生物に広く保存される新規 DNA 結合ドメイン STPR の立体構造特性について解析した初めての報告であり、2つの章から構成されている。第一章は、DNA 非結合状態における立体構造について、第二章では DNA 結合状態における立体構造について言及し、各々、Biochemistry 誌 (2007)、Proteins 誌 (2008) に掲載済みである。STPR はその特徴的な一次配列により DNA 非結合状態、DNA 結合状態のいずれにおいても良好な NMR スペクトルを得ることが出来ず、立体構造を高分解能で決定することが困難だった。しかしながら NMR・円偏光二色性 (CD) などの分光学的手法と、ゲルシフトアッセイ (EMSA)・プルダウン

ンアッセイなどの生化学的手法を用いた解析により、著者は STPR 全長の立体構造特性について明らかにした。以下、本研究の成果を具体的に記述する。

1 つ目は、DNA 非結合状態における立体構造特性の解明である。まず STPR を構成する 4 本のペプチドユニット (R1, R2, R3, R4) の立体構造を NMR により決定し、何れのユニットも短い α ヘリックスとランダムコイルから構成されることを明らかにした。そしてこれらの α ヘリックスは塩橋と N-Capping box 相互作用により安定化されていることを発見した。次に STPR 全長 (R1-R4) の立体構造について CD を用いて解析し、ヘリックス含量が低く (ヘリックス含量: 31%)、大部分がランダムコイルであること、STPR 全長の立体構造はペプチド単位で決定されたユニットの立体構造を連結したものに近似していること、STPR 全長の中で各ペプチドユニットは相互作用することなく独立して運動していることを明らかにした。最後に変異体を用いた解析から、STPR 全長を構成する 4 本のユニットは非常によく似た一次配列と立体構造を有するにもかかわらず、DNA 結合能に関して異なる役割を果たしていることを明らかにした。

2 つ目は、DNA 結合状態における立体構造特性の解明である。まず EMSA やプルダウンアッセイの結果、STPR は特異的 DNA に対して 1 対 1 のモル比で結合することを特定した。次に CD 解析から複合体形成時、STPR 全長および DNA の両者に立体構造変化が誘導されること、および STPR 全長は α ヘリックスに富んだ立体構造 (ヘリックス含量: 76%) を形成することを明らかにした。更に熱変性実験、限定分解実験、蛍光プローブを用いた実験から、DNA 結合時、STPR 全長はリジッドな球状のコンフォメーションを形成していることを明らかにした。最後に変異体を用いた解析により、STPR 全長の中で DNA との結合に関与している相互作用面を決定することに成功した。

真核生物に広く保存される STPR は、2005 年、北大の滝谷重治氏らにより発見されたものの、その機能に関しては DNA 結合能を有するという以外の詳細はわかっていなかった。本研究の結果、DNA 非結合状態と DNA 結合状態の立体構造特性が解明されたことにより、これまでに報告されている様々な DNA 結合ドメインとは異なる新規の DNA 結合様式を STPR が有している可能性を示した。これを要するに、著者は、STPR の DNA 認識機構の全容解明に対し有用な知見を与えたものであり、更には、カイコフィブロイン遺伝子の転写制御機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。