

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏 名 宮園 健一

指導教員名 田之倉 優

論文題目 ホメオドメインタンパク質 *Aristaless* と *Clawless* による  
共同的な DNA 認識機構の構造機能解析

ホメオドメインは、60 残基の高度に保存されたアミノ酸配列からなる、真核生物の中で最も広範な転写調節因子群の一つであり、生物の発生や分化に非常に大きく関係することが知られている。ホメオドメインは N 末端のアーム構造とそれに続く三本の  $\alpha$  ヘリックスからなるタンパク質で、アミノ酸配列の保存性からも予測されるとおり、その立体構造も非常に高く保存されていることが知られている。アミノ酸配列や立体構造の高い保存性のため、ホメオドメインが認識できる DNA 塩基配列の種類は非常に限られており、その一般的な認識配列は 5' -TAATNN-3' である。この様な認識配列の多様性の乏しさにもかかわらず、ホメオドメインタンパク質は、発生や分化に関係する多岐にわたる遺伝子の発現制御を精密に行うことができる。認識できる塩基配列の多様性の乏しさと、多岐にわたる遺伝子の発現制御機構の間には一見矛盾があるように思えるが、ホメオドメインタンパク質は、他の因子(ホメオドメインを含む別の転写調節因子等)と共同的に DNA と相互作用することによって多様性を獲得している。

ショウジョウバエの肢形成に関与する二つの転写調節因子 *Aristaless* (Al) と *Clawless* (Cll) はともにホメオドメインを有するタンパク質である。Al と Cll は、共同的に作用することによって、肢形成に関与する別の遺伝子 *Bar* の発現を抑制することが知られている。現在までに、二つのホメオドメインによる共同的な DNA 結合機構を解明した立体構造解析の例はいくつか存在するが、Al と Cll は既存の DNA 結合機構とは全く異なる新規の機構で共同的に DNA に結合することが示唆された。そこで我々は、Al と Cll による共同

的な DNA 結合に関与する分子機構の構造学的な基盤を解明するため、これらのタンパク質とその認識配列を含む DNA との三者複合体の立体構造を X 線結晶構造解析法により決定した。

## 1. 共同的な DNA 結合に関与する最小領域の決定

一般的に真核生物の転写調節因子には、特定の立体構造をとらない、もしくは別のタンパク質と結合して初めて特定の立体構造をとるような、立体構造上不安定な領域が多く含まれる。このような領域は、タンパク質 - DNA 複合体の結晶化に悪影響を及ぼす場合が多々ある。そのため、始めに AI および CII の三者複合体形成に関わる最小領域の同定を行った。類縁タンパク質とのアミノ酸配列の比較を行うと、AI はそのホメオドメイン領域にのみおいて、そして CII はそのホメオドメイン領域とその上流 14 残基(図 1 N3-N2)、下流 6 残基の領域(図 1 C1-C2)において、そのアミノ酸配列が高度に保存されていることが示された。AI のホメオドメイン領域、N 末端および C 末端の長さを少しずつ変化させた CII コンストラクトを大腸菌の系を用いて大量調製し、ゲルシフトアッセイによりそれらの共同的な DNA 結合能を調べた。その結果、AI および CII による共同的な DNA 結合機構には、上記のアミノ酸配列上保存された領域が必須であることが示された(図 1)。

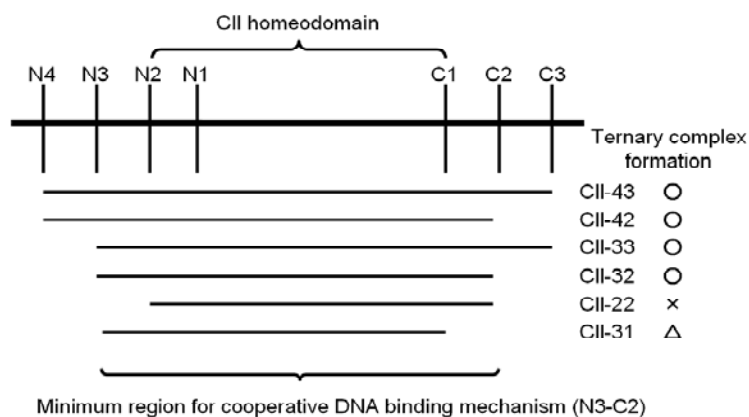


図 1 CII の三者複合体形成に必須な最小領域

## 2. AI-CII-DNA 三者複合体構造解析

AI および CII の三者複合体形成に必須な最小領域を含むコンストラクトを用い、ホメオドメイン単独の結晶構造解析および AI-CII-DNA 三者複合体の結晶構造解析を行った。AI-CII-DNA 三者複合体の結晶は、PEG3350 を沈殿剤とする条件で得られた。得られた結晶を用い、放射光施設 Photon Factory(筑波)のビームライン AR-NW12 にて X 線回折データの収集を行ったところ、最高分解能が 2.7 Å の X 線回折データの取得に成功した。結晶の空間群は  $P2_12_12_1$ 、格子定数は、 $a = 70.93$ ,  $b = 85.40$ ,  $c = 110.68$ (Å)であった。この X 線回折データを用い、分子置換法によって AI-CII-DNA 三者複合体の結晶構造を決定することに成功した(図 2)。

構造解析の結果、A1 と CII による塩基配列認識機構を明らかにすることができた (図 3)。A1 と CII は共存条件下で 5' -TTAATTAATTG-3' の 11 塩基対の DNA を認識することが知られているが、このうちの前半部分 (5' -TTAATNA-3' ) が A1 によって、後半部分 (5' -TAATTG-3' ) が CII によって認識されることが明らかになった。A1 による塩基認識は、ホメオドメインに共通な典型的な機構での塩基認識であったが、CII による塩基認識には独自の機構が存在していた。CII のホメオドメイン上流保存領域に存在する二つの残基、Arg-5 と His-10 は minor groove 側から DNA に近づき、三つの塩基 (図 3 の T12、T13、G14 ) の認識に関係していた。このような塩基認識機構は、A1-CII-DNA 三者複合体で初めて見られた特徴的な構造である。

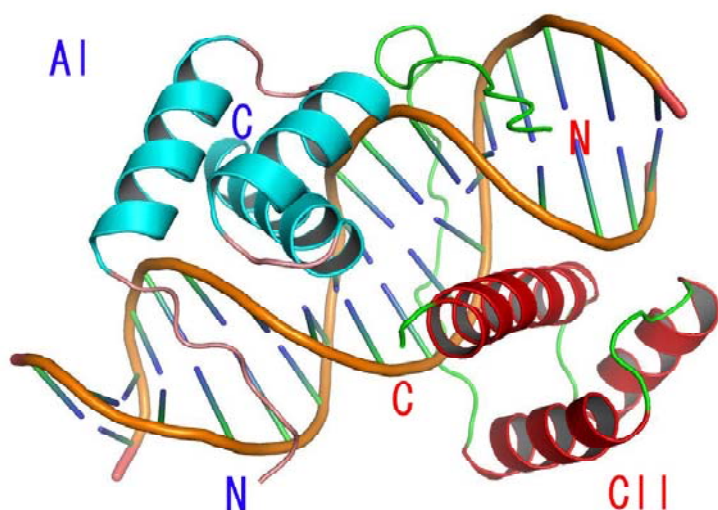


図 2 A1-CII-DNA 三者複合体構造

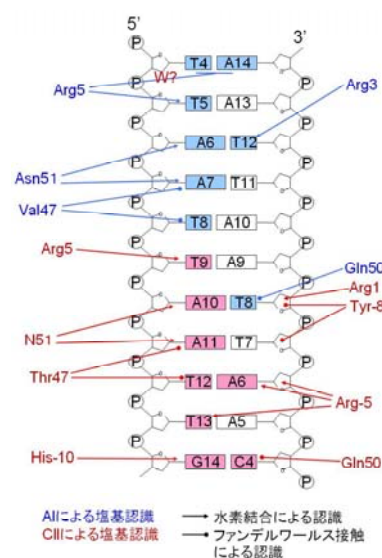


図 3 A1 と CII の塩基認識機構

### 3. A1 と CII の共同的な DNA 結合機構

A1-CII-DNA 三者複合体の構造を決定したことにより、A1 と CII による共同的な DNA 結合機構に関与すると考えられる特徴的な部分構造が明らかになった。一つ目は CII の保存領域の末端に位置する残基と A1 との二つの塩橋形成である。CII ホメオドメイン上流に位置する Arg-14 は A1 の Glu32 と (図 4 site 1)、CII ホメオドメイン下流に位置する Glu62 は A1 の Arg44 と (図 4 site 2) それぞれ塩橋を形成していた。この相互作用によって、CII は DNA 結合領域の末端構造を安定化し、DNA からの解離を抑制しているものと考えられる。この二つの塩橋形成は、CII 結合部位に隣接した形で A1 が DNA に結合していて初めて起こるものであり、A1 と CII の共同的な DNA 結合機構に大きな寄与をもたらすものと予測される。

二つ目は、DNA の構造変化である。CII ホメオドメイン上流の保存領域に存在する Tyr-8 は複合体構造中で DNA のバックボーンを AI 側に押し上げる働きをしており、それにより湾曲した DNA 自身も AI によって安定に保持されている(図 5)。この機構により、CII の Arg-5 や His-10 が塩基に近づきやすくなり、これらの残基による minor groove 側からの特徴的な塩基認識が可能となるものと考えられる。

CII ホメオドメイン上流の保存領域に存在する DNA との接触に関与する残基 (Arg-5, Tyr-8, His-10) や AI との分子間塩橋形成に関与する残基 (Arg-14, Glu62) のアラニン変異体を作成し、これらの残基の構造上の重要性を評価した。その結果、どの変異体に関しても Native のものと比較して三者複合体形成能が低下しており、これらの残基が AI と CII の共同的な DNA 結合に重要であることが示唆された。

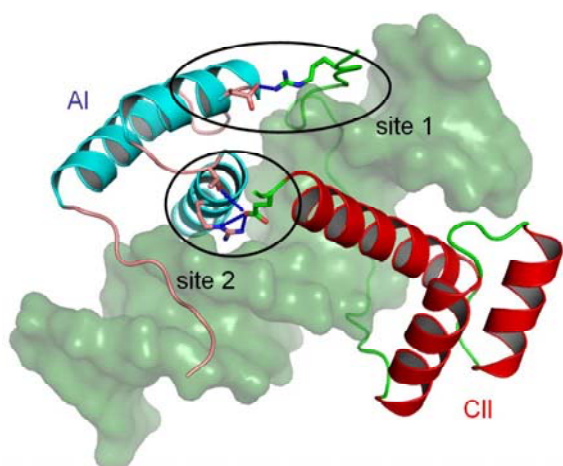


図 4 複合体中に見られる分子間塩橋形成

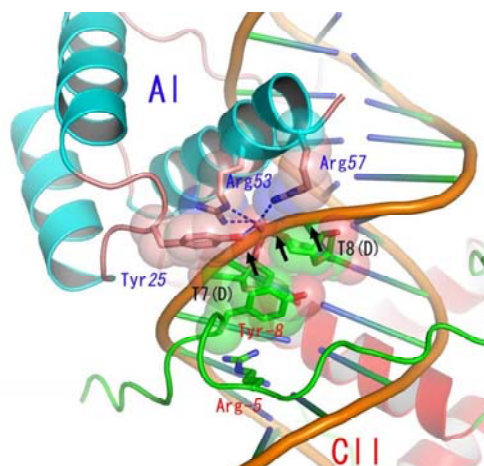


図 5 CII Tyr-8 による DNA 構造変化

#### まとめ

本研究により、AI-CII-DNA 三者複合体の立体構造を決定することができた。その結果、AI と CII による共同的な DNA 結合様式は、既存のものとは全く異なる新規の機構によりもたらされることが明らかになった。今回得られた立体構造の中で最も特徴的な点は、CII ホメオドメインの上流および下流の領域が、AI と CII の共同的な DNA 結合に大きく関与しているという点である。同様の領域を有するホメオドメインタンパク質の数は多くは無いが、このような特徴を持つホメオドメインタンパク質と共同的に作用することにより、他の多くのホメオドメインタンパク質がより広範な塩基配列認識の多様性を獲得できるものと考えられる。