

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

宮園 健一

本論文では、ショウジョウバエの肢形成にかかわる転写調節因子 *Aristaless*(以降 Al)と *Clawless*(以降 Cll)の共同的な DNA 結合機構を解明するべく、X線結晶構造解析により Al-Cll-DNA 三者複合体の結晶構造を決定し、その共同的な DNA 結合にかかわる分子機構の解明を行っている。本論文は、第一章『序論』、第二章『発現コンストラクトの最適化』、第三章『Al 及び Cll のホメオドメイン単独構造』、第四章『Al-Cll-DNA 三者複合体の結晶構造解析』、第五章『変異体解析』、第六章『総合討論』の全六章からなる。

第二章では、Al と Cll の共同的な DNA 結合に関与する最小領域の決定を行っている。Al および Cll はそのヒトホモログである *CART1* および *Hox11L1* と同様の機構において共同的な三者複合体形成を行うことという知見から、共同的な DNA 結合に関与する領域は各々のタンパク質間で高く保存されていると予測し、アミノ酸配列の比較から共通する領域の同定を行っている。アミノ酸配列比較から予測された三者複合体形成に関与すると考えられる領域の重要性は、長さを少しずつ変化させたタンパク質コンストラクトを大腸菌のタンパク質発現系を用い大量調製し、それらを用いてゲルシフトアッセイを行うことによって確認している。ゲルシフトアッセイの結果から、Al はそのホメオドメイン領域が、Cll はそのホメオドメイン領域およびその上流 14 残基及び下流 8 残基が共同的な DNA 結合に関与していることを明らかにしている。このようにして求められたホメオドメインの上流及び下流の領域の三者複合体形成に対する寄与は本論文において初めて明らかにされた機構であることを述べている。

第三章及び第四章では、第二章で決定した領域を含むタンパク質コンストラクトを利用して、タンパク質の結晶構造解析を行い、その構造学的な基盤の解明を行っている。本論文では、Al ホメオドメイン単独の立体構造、Cll のヒトホモログである *Hox11L1* のホメオドメイン単独の立体構造、Al-Cll-DNA 三者複合体の立体構造が、それぞれ X線結晶構造解析法によって決定されている。得られた結晶構造の解釈から、Al と Cll による共同的な DNA 塩基認識機構及び共同的な DNA 結合機構に関与する分子機構を解明している。Al と Cll は、そのホメオドメイン領域および Cll ホメオドメイン上流領域によって塩基認識を行うことを明らかにしている。Cll 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、三つの塩基の認識に関係していることを突き止め、このような塩基認識機構は、Al-Cll-DNA 三者複合体で初めて見られた特徴的な構造であると述べている。また、Al と Cll による共同的な DNA 結合機構に関する分子機構に関しても考察を行っている。本論文で決定された Al-Cll-DNA 複合体立体構造を解析することにより、共同的な DNA 結合には、二つの特徴的な分子機構が関与していると述べている。一つ目は Al と Cll の間に見られる塩橋形成による複合体の安定化機構、二つ目

は Al と CII ホメオドメイン上流領域の共同的な作用による DNA minor groove の拡張機構である。これらの Al-CII-DNA 三者複合体で初めて観察された特徴的な分子機構が、二つのホメオドメインの共同的な DNA 結合に関与していると考察している。また、ホメオドメイン単独の立体構造と、三者複合体構造中に見られるホメオドメインの立体構造を比較することにより、共同的な DNA 結合には、ホメオドメイン領域の構造上の特徴は関与していないであろうと考察している。

第五章では、Al と CII の共同的な DNA 結合に関与すると考えられた残基の変異体を作成し、その構造上の重要性の評価を行っている。各残基のアラニン変異体を作成し、ゲルシフトアッセイにより共同的な三者複合形成能を評価した結果、各変異体の示す共同的な DNA 結合能は優位に低下しており、構造から予測された共同的な DNA 結合に関与すると考えられる分子間相互作用が、実際構造上重要な意義を持つことが示されている。

第六章では、これまでに得られている知見をもとに Al と CII がもたらす共同的な DNA 結合機構のモデルを提唱している。提唱されている三者複合体形成モデルは、これまでの研究結果に基づいており、十分信頼性における妥当なモデルであると言える。また、CII のホメオドメインタンパク質としての特徴についても述べられており、CII は他のホメオドメインとも共同的に DNA に対し結合できるのではないかと考察されている。

各研究はすべて論理的に行われており、最終的に得られた知見は新規性が極めて高く、かつその妥当性も申し分ない。また、本研究は学術上非常に興味を置かれている分野において、全く新規の機構を提唱するに至っている。そのため、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。