



機能する。翻訳フレームシフトが起きない場合は、*IS1* の転移抑制因子である全長 91 アミノ酸残基の InsA タンパク質 (InsA) が産生される。*IS1* の転移反応は、Tnp による自身の IR への認識と結合、2 つの Tnp 分子と両末端 IR を含む複合体 (トランスポソゾーム) の形成、各 IR 末端と標的 DNA 間での DNA 鎖組換え反応、の順に起こる。

Tnp は、N 末端側の InsA 部分に 2 つの DNA 結合ドメイン、ジンクフィンガー (ZF) ドメインとヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) ドメイン、を有している。これら 2 つのドメインはどちらも *IS1* の転移に必要であり、IR への配列特異的結合に関与している。InsA は Tnp と同じ 2 つの DNA 結合ドメインを持つが転移触媒ドメイン (DDE;図参照) を持たないので、Tnp と拮抗して IR に配列特異的に結合し、転移反応の進行を阻害するとともに、Tnp と InsA 自身の遺伝子発現のリプレッサーとしても働く。Tnp と InsA は IR 配列以外の DNA にも非特異的に弱く結合するが、その DNA が相同組換え反応の中間体に特異的に見られる Holliday 構造や Y 字型構造をとっていると、構造特異的に強く結合する。この構造特異的結合には ZF ドメインを含む領域が関与するが、HTH ドメインは必要ではない。トランスポソゾーム形成においては DNA が Holliday 構造と類似の構造をとり、Tnp の構造特異的な結合活性がその安定性に寄与すると考えられている。

トランスポソゾームの形成機構は未だ明らかではない。Tnp がどのように IR 配列と結合し安定なトランスポソゾームを形成するかを解析するためには *in vitro* でその形成反応を再現し高次構造を解析する必要がある。そこで、Tnp と 2 つの DNA 結合ドメインを共有し、同じ DNA 結合の特異性を示す InsA に注目した。InsA は Tnp より分子量が小さく、高次構造の解析が容易であると考えられる。本研究ではトランスポソゾームの形成機構を解明することを目的として、InsA を *in vitro* 発現系を用いて調製し、高次構造及び DNA との相互作用の解析を NMR を用いて行った。

## 2. 不溶性 GBF-InsA タンパク質の可溶化と NMR 測定

InsA は、一般的な生化学的手法で精製を試みると、その精製の過程で不溶化しやすい性質を持つ。そこで、可溶性で活性のある状態にするため GBF (Protein G Binding Factor) との融合タンパク質 (GBF-InsA) として *in vitro* で合成した。しかし、生成した GBF-InsA はやはり不溶性であったので、その沈殿した GBF-InsA をグアニジン塩酸塩を含むバッファーで変性させて溶解したのち、リフォールディングを行うことで可溶化した。この可溶性 GBF-InsA はゲルシフト解析の結果、IR への配列特異的 DNA 結合活性を保持していることがわかった。そこで、この方法で  $^{15}\text{N}$  で標識した GBF-InsA を調製し、NMR を用いて [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ]-Hetero-nuclear Single Quantum Coherence (HSQC) を測定したところ、プロトンのシグナルが広範囲にわたって多様な化学シフトを示した。これは GBF-InsA が高次構造を形成していることを示す。次に  $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$

で標識した GBF-InsA を調製し、多核多次元 NMR 測定を行った。主鎖帰属を行った結果、InsA 部分において 91 個中 30 個のアミノ酸残基のシグナルを帰属することができた。HTH ドメインにおいては約半数のアミノ酸残基のシグナルを帰属することができたが、ZF ドメインにおいては全く帰属することができなかった。この原因として、リフォールディング操作の過程で ZF ドメインが安定な高次構造を形成しなかった可能性が考えられた。そこで、最初の合成過程で ZF ドメインが安定な高次構造をとるように *in vitro* 合成系に亜鉛を 100  $\mu$ M 添加したところ、可溶性の GBF-InsA が合成された。ZF ドメインが安定な高次構造をとった結果、タンパク質の凝集が起きなくなったためと考えられる。

### 3. 可溶性 (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA タンパク質の NMR 測定

可溶化した状態で合成された融合タンパク質を精製するため、GBF の上流に (His)<sub>6</sub> タグを付加した (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA 融合タンパク質を合成した。ニッケルカラムで精製した (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA はゲルシフト解析により、IR への配列特異的 DNA 結合活性と、Holliday 様構造への構造特異的 DNA 結合活性を持つことがわかった。<sup>15</sup>N で標識した (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA の [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC を測定したところ、プロトンのシグナルが広範囲にわたって多様な化学シフトを示し、それが高次構造を形成していることがわかった。そこで、<sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N で標識した (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA を合成し、多核多次元 NMR 測定を行った。主鎖帰属を行った結果、InsA 部分において 91 個中 40 個のアミノ酸残基のシグナルを帰属し、HTH ドメインにおいては約 10%、ZF ドメインにおいては約 70% のアミノ酸残基のシグナルを帰属することができた。この結果を用いて、InsA の 2 次構造予測を行い、また InsA と同じ C<sub>4</sub> クラスの ZF ドメインを有する ZZ ドメインの構造を基に InsA の N 末領域の 3 次構造予測を行った。それらの結果、ZF ドメイン内部に  $\beta$ -シート構造があることが示唆された。

HTH ドメインは IR への配列特異的 DNA 結合には必要だが、Holliday 様構造などへの構造特異的 DNA 結合には必要ない。そこで HTH ドメインを持たない変異体 InsA の高次構造を調べるため、HTH ドメインを含む C 末側領域の 25 アミノ酸残基を欠失させた変異体タンパク質 [(His)<sub>6</sub>-GBF-InsA (1-66)] を合成し、精製した。ゲルシフトで解析したところ、予想通り IR への配列特異的結合活性はなく、Y 字型 DNA への構造特異的な DNA 結合活性は保持していた。また、<sup>15</sup>N ラベルして調製した (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA (1-66) の [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC を測定したところ、それが高次構造を形成していることが示された。(His)<sub>6</sub>-GBF-InsA の結果と比較したところ、ZF ドメイン由来のシグナルは同じパターンを示した。これらは、(His)<sub>6</sub>-GBF-InsA (1-66) が少なくとも ZF ドメインにおいて (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA と同じ高次構造をとっていることを示唆する。

#### 4. NMR を用いた (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA タンパク質の DNA との相互作用の解析

DNA との相互作用を調べるため IR を含む 2 本鎖 DNA と混合させた状態で (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA の [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC を測定したところ、DNA との結合を示唆するアルギニン側鎖のシグナルを含む、多くのシグナルが新たに現れた。また、GBF のアミノ酸残基のシグナルは変化しなかったのに対し、InsA では約 3 分の 2 のシグナルが消失していた。特に ZF ドメインでは約 80% のシグナルが消失した。これらのシグナルの変化は、それらのアミノ酸残基を含む領域が DNA との相互作用に関与していることを示唆する。一方、IR を含まない 2 本鎖または Y 字型 DNA を基質として同様に測定を行ったところ、アルギニン側鎖を含む多くのシグナルが新たに現れたが、IR の場合に現れたいくつかのシグナルは検出されなかった。また、シグナルの消失に関しては、消失数がやや少なかったこと以外は IR とほぼ同じ結果となった。以上の結果は、InsA がいずれの種類 DNA と結合すること、その結合に ZF ドメインを含む領域が関与していること、を示唆する。

InsA の C 末側領域を欠失した変異体タンパク質 (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA (1-66) において同様に各種 DNA と混合させた状態で [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N]-HSQC を測定した。その結果、野生型タンパク質の (His)<sub>6</sub>-GBF-InsA の場合とほぼ同じ結果が得られた。しかし、野生型で IR 特異的に現れたシグナルは、変異体タンパク質と IR を含む 2 本鎖 DNA とを混合させても検出されなかったため、それらは変異体で欠失している C 末側領域のアミノ酸残基に由来するものと考えられた。このことは、C 末側領域の HTH ドメインが ZF ドメインとともに IR への特異的結合に関与するという以前の結果を支持する。

#### 5. 総括

本研究において合成した可溶性の InsA 融合タンパク質の高次構造を NMR を用いて解析した結果、InsA が各種 DNA と結合すること、及びその結合に ZF ドメインを含む領域が関与していること、が分かった。また、変異体タンパク質の解析結果から、HTH ドメインが IR への特異的結合に関与することが考えられた。以上の結果は、IS1 Tnp が IR と結合してトランスポゾームを形成する際に、上記の 2 つのドメインが協働して機能することが重要であることを示している。