

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平尾 嘉利

NMRによる挿入因子 IS1がコードする DNA 結合タンパク質の高次構造の解析

1. 序論

トランスポゾンとは、一定の長さで固有の塩基配列を持つ DNA 断片であり、ゲノム内やゲノム間の異なる部位へ転移可能な因子である。IS1 は、大腸菌で初めて発見されたトランスポゾンで、全長 768 bp、両端に約 30 bp の逆向き反復配列 (IR) を持ち、内部には IS1 の転移反応を司る酵素、トランスポゼース (Tnp) とその制御因子 InsA (全長 91aa) をコードする。IS1 の転移反応は、Tnp による自身の IR の認識と結合、2 つの Tnp 分子と両末端 IR を含む複合体 (トランスポソーム) の形成、各 IR 末端と標的 DNA 間での DNA 鎖組換え反応、のステップをたどって完結する。

Tnp と InsA は、2 つの DNA 結合ドメイン、ジンクフィンガー (ZF) とヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH) を共有する。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 への特異的結合に関与していることが分子遺伝学的に示されている。さらに、両者は相同組換え反応の中間体に見られる Holliday 構造や Y 字型構造にも結合する。そこで、Tnp より分子量が小さく、しかも Tnp と同じ DNA 結合特異性を示す InsA に着目し、NMR を用いてその高次構造及び DNA との相互作用を解析した。

2. GBF-InsA タンパク質の可溶化と NMR 測定

InsA は精製の過程で不溶化しやすい性質を持つため、GBF (Protein G Binding Factor) との融合タンパク質 (GBF-InsA) として *in vitro* で合成後、グアニジン塩酸塩を含むバッファーで変性・溶解・リフォールディングを行い、IR への結合活性を持つ可溶性画分を得た。この方法で  $^{15}\text{N}$  で標識した GBF-InsA、および  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  で標識した GBF-InsA をそれぞれ調製、 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Hetero-nuclear Single Quantum Coherence (HSQC) NMR 測定、及び  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -多核多次元 NMR 測定を行い、構成アミノ酸の主鎖帰属を試みた。その結果、InsA 部分のアミノ酸残基 91 個中 30 個の主鎖帰属ができたが、それは HTH ドメインに由来する残基のみで、ZF ドメインについては全く帰属できなかった。リフォールディング過程で ZF ドメインが安定な高次構造を形成しなかったことが原因と考えられたため、*in vitro* 合成系に亜鉛を 100  $\mu\text{M}$  添加したところ、可溶性の GBF-InsA が合成された。

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

標品の精製度を上げるために、N 末側に (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、同様に HSQC NMR 測定、及び、多核多次元 NMR 測定を行った。その結果、InsA の 91 個のアミノ酸残基中 40 個のアミノ酸残基について主鎖帰属できた。ただし、ZF ドメインの約 70% を帰属できたのに反し、HTH ドメインでは約 10% のみ帰属できた。得られた多核多次元 NMR 測定結果に基づいて、InsA の 2 次構造予測を行った。さらに InsA と同じ C<sub>4</sub> クラスの ZF ドメインを持つ 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ところ、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 ドメインを持たない欠失変異体 InsA [(His)<sub>6</sub>-GBF-InsA (1-66)] の高次構造についても同様に解析したところ、ZF ドメイン由来のシグナルは同じパターンを示したことから、野生型、欠失型を問わず、ZF ドメインは、両者とも同様の高次構造をとっていることが示唆された。

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

(His)<sub>6</sub>-GBF-InsA タンパク質を IR を含む 2 本鎖 DNA と混合させた状態で HSQC NMR 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始め、多くのシグナルが新たに現れた。また、タグである GBF 由来のアミノ酸残基のシグナルが全く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た。特に ZF ドメインでは約 80% のシグナルが消失した。これは、その領域が DNA との相互作用に参与していることを示唆する。実際この領域には 2 個のアルギニン (R19, R29) が存在し、この内、特に R29 を置換変異すると IR DNA 結合活性がなくなることから、この R29 が DNA と相互作用したと考えられる。また、InsA の HTH ドメインを含む C 末側領域を欠失した変異体タンパク質を、同様に、IR を含む 2 本鎖 DNA と混合させて HSQC を測定したところ、野生型タンパク質特異的シグナルは検出されなかった。この結果は、C 末側領域の HTH ドメインが、ZF ドメインとともに IR への特異的結合に参与するという結果を支持するものである。

#### 5. 総括

本研究では、精製中すぐに不溶化する InsA を、*in vitro* 合成時に反応溶液に亜鉛を加えることで、活性ある可溶性タンパク質として得ることに成功、InsA とその欠失変異体タンパク質の NMR 測定を可能にした。その結果、InsA の構成アミノ酸の約半分について主鎖帰属ができ、その N 末側 (ZF) 領域のモデル構造を予測できた。そのモデル予測によって、ZF 内部に β ストランドがあること、およびその β ストランドを構成するアミノ酸残基が新たに推測された。それらのアミノ酸残基、R29, G21, S23, Y30 に置換変異をいれた場合、DNA 結合活性が失われるという、これまでの遺伝学的データと併せて、この ZF 領域内部の β ストランド部分が DNA との相互作用に重要であることがはじめて明らかになった。これらの結果は、これまでアミノ酸配列の一次構造上で論じられていた InsA タンパク質の機能を、高次構造の面から捉えることを可能にした画期的な研究といえる。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。