

論文内容の要旨

論文題目 熱力学的解析を基盤とした核酸の 蛋白質分子認識に関する研究

氏名 長門石 暁

第1章 序論

DNAは遺伝情報を有した設計図としての役割以外に、特殊な立体構造、高次構造を形成して特有の機能を果たしていることが近年分かってきた。RNAによる多様な機能も徐々に解明されてきており、もはや蛋白質間のみの相互作用ネットワークだけで生命現象を理解することは困難であり、核酸-蛋白質間の分子認識を解明していくことがより重要になってきている。従って核酸の詳細な分子認識メカニズムの解明は、細胞内のいわゆるインタラクトーム解析に大きく貢献し、また核酸創薬における重要な情報も与えることが出来ると考えられる。

現在まで核酸においては様々な生体分子との相互作用解析がなされてきているが、その認識機構は蛋白質間の相互作用と比べて複雑かつ多様性で、いまだ未知なる部分を多く残している。その1つに、DNA構造の安定性に大きな寄与を果たしている水和水の存在が挙げられる。ゆえに核酸の蛋白質に対する相互作用機構は、認識に関与している配列や構造に関する相同性というアプローチだけでは全てを理解することはできないと考えられている。本研究では、熱力学という解析手法を基に、核酸と蛋白質間における相互作用の精密な解析を行い、分子認識機構における新たな見解を提案することを目的とする。DNA自身には多くの水和水が関与しており、これらは溶媒環境の影響を強く受け、DNAの構造変化にも関与している。従って蛋白質-DNA間の相互作用において特に溶媒環境と水和水変化、それに伴うDNAの構造に注目し、熱力学的な解析を基盤に、その詳細なメカニズムについて議論する。

本論文は全5章より構成されている。第1章の序論に続いて、第2章では超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の転写因子 TATA-box 結合蛋白質 (PhoTBP) とそのターゲット DNA (dsTATA-1) との相互作用解析を行っている。ここでは好熱菌の生育環境である高温条件下という二本鎖 DNA (dsDNA) が不安定化する条件下で、その相互作用解析を行うことにより DNA の PhoTBP に対する相互作用における水和水変化に関する新たな知見を得ている。第3章では、PhoTBP の dsDNA に対する配列特異性の探索を行い、環境温度など違いにより特異的に相互作用する塩基配列が異なることを見出している。これらは dsDNA が環境因子によって異なる機能活性を有していること

を示唆している。第4章では、四本鎖構造を形成するDNAとhuman thrombin蛋白質間の相互作用解析を行い、蛋白質の四本鎖構造を形成するメカニズムの解明を行い、4本鎖DNAに対する蛋白質の役割について議論する。最後の第5章が総括となる。

第2章 超好熱菌古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 TATA-box 結合蛋白質と二本鎖DNA間の相互作用解析

本章では、PhoTBPとdsTATA-1を用いて、好熱菌の生育環境である高温条件下というdsDNAが不安定化する条件下での相互作用解析を行った。その際、熱力学的な解析を基盤にその詳細なメカニズムの解析を行った。特に相互作用における水和変化に注目し、PhoTBPのDNAへの結合における水和変化の重要性と、dsDNAと水和水の関係性について議論した。

TBPのdsTATA-1に対する結合は、疎水性相互作用による脱水合作用を主な駆動力としている(Figure 1)。等温滴定型熱量測定(ITC)によるPhoTBPとdsTATA-1との相互作用は、高温条件下において高い結合親和性($K_d = 10^6 \text{ M}^{-1}$)を示し、脱水合作用に由来するエントロピー駆動型の相互作用が観察された(Figure 2)。高温で二本鎖が変性したdsTATA-1は、PhoTBPの存在下ではアニーリングして結合していることが、ITCと示差走査型熱量測定(DSC)の解析より明らかとなった。さらに詳細な解析から、PhoTBPは一本鎖DNA(ssDNA)に対しても結合できることが明らかとなり、その相互作用はエントロピー駆動型であった。従来TBPはその脱水合作用がdsDNAの秩序だった水和水の放出エネルギーが主な駆動力であるとされてきた。しかし、本実験ではduplex構造を形成していないssDNAに対してもエントロピー得な大きな結合エネルギー変化が観察された。今後ssDNAに対するこの相互作用メカニズムをより詳細に調べることにより、DNA結合蛋白質がDNAと結合するための本質に迫る機構が明らかになると考えられる。またPhoTBPによるdsDNAのアニーリング機能をさらに解析することにより、DNAのduplex形成制御に関する有用な知見が得られると期待される。

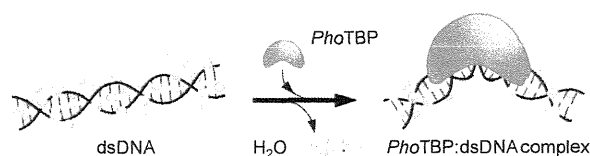


Figure 1. TBPとdsDNA間の相互作用モデル図

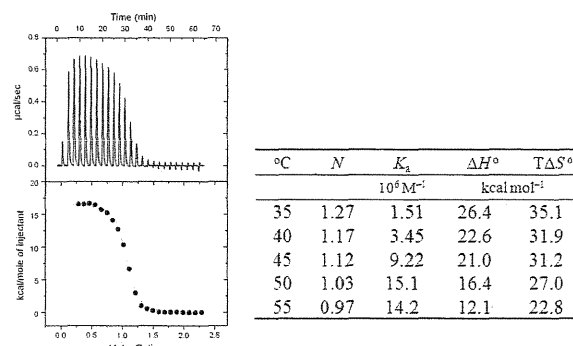


Figure 2 PhoTBPとdsDNA間相互作用における反応熱と熱力学的パラメータ(ITC測定)

第3章 超好熱菌古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来 TATA-box 結合蛋白質のDNA塩基配列特性の探索

極限環境生物が生育している環境は、高温(80 °C以上)でかつ高塩濃度(1 M以上)と、蛋白質-DNA間相互作用において不利な条件になっている。このような過酷な環境下においてDNAには温度に適応した塩基配列特異性、それに伴う機能特異性は存在していないのであろうか?本章では超好熱菌由来のTATA-box結合蛋白質をモデル分子として、二本鎖DNAへの配列特異性探索を行い、熱力学的な解析を基盤に温度に対応する塩基配列とその相互作用特性を明らかにした。

dsDNAに対する塩基配列特異性の探索を行うにあたり、PhoTBPのSELEX解析を行った。高温環境下として50 °CでのSELEXを行った結果、A/T-richな塩基配列(5~8 bp)が含まれていた(図3A上段)。MEMEを用いて共通する塩基配列モチーフの解析を行った。その結果、50 °CではTTTAというモチーフで構成されたA/T-rich配列がコンセンサスであることが明らかとなった(Figure 3A中段)。37 °Cにおいては、TTTAにTATAというモチーフが混在した塩基配列が選択され(Figure 3B)、さらに低温の25 °CになるとTATAモチーフをコンセンサスとしたA/T-rich配列が選択された

(Figure 3C)。このように、高温では TTTA 配列、低温では TATA 配列に対し選択的に *Pho*TBP と結合していることが明らかとなった。

50 °C と 25 °C の SELEX で選択された DNA 配列 (50 °C ; oligo50, 25 °C ; oligo25) を用いて、ITC 測定による相互作用の熱力学的解析を行った。50 °C における測定の結果、oligo50, oligo25 とともに同程度の結合定数 ($K_d = 10^5 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) が得られた。25 °C においても同様の結果が得られ、oligo50 と oligo25 は *Pho*TBP に対する結合親和性に温度によって有意な差がないことが明らかとなった。oligo25 と oligo50 では比熱容量変化 ΔC_p に相違がみられた (oligo50-1: $-0.43 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, oligo25-1: $-0.49 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)。これは *Pho*TBP との相互作用において、oligo50 と oligo25 では水と変化に違いがあることを示唆する。

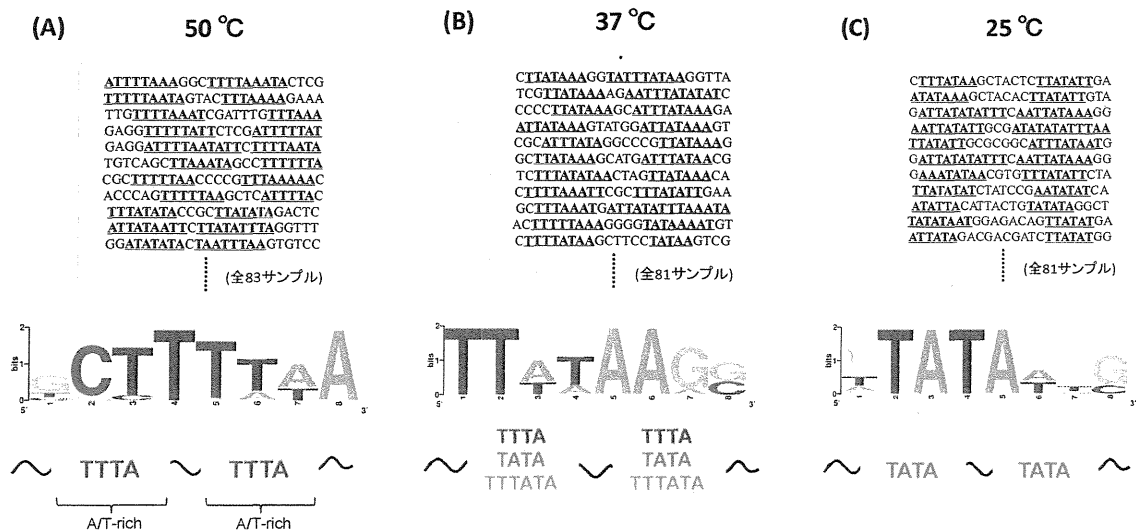


Figure 3. 各温度条件下における SELEX 解析の配列結果。上段; ランダム領域の配列例, 中段; MEME による 8 bp スケールでの塩基配列モチーフ (Weblogo 表示), 下段; ランダム領域の配列概略図。灰色は A/T-rich な配列領域。(A) 50 °C, (B) 37 °C, (C) 25 °C。

そこで塩濃度 (NaCl) 変化における各相互作用の結合定数を算出し、 $\log K_{\text{obs}} = \log K_{\text{obs,IM}} - A \log[\text{NaCl}] + 0.016B [\text{NaCl}]$ 式による fitting を行うことで、係数 A よりイオンの挙動、係数 B より水分子の挙動を算出し相互作用特性の比較を行った。その結果、oligo50 は高温において多くの水分子の放出があったのに対し、低温では水分子はあまり放出されることがわかった。逆に、oligo25 では低温において多くの水分子の放出があったのに対し、高温では取込まれることが分かった。以上の結果は、本実験の SELEX ではより多くの水分子を放出する塩基配列 DNA が選択的に結していることを示している。TBP は dsDNA と相互作用するために脱水和反応を必要とする。従って十分な水分子の放出による TBP の DNA 結合は、より安定な複合体を形成すると考えられる。

塩濃度や分子クラウディング環境下においてもその配列傾向は変化する事から、温度以外の様々な環境因子が DNA の構造とその機能に寄与していることが示唆される。これらにはおそらく dsDNA の水和水と構造の柔軟性が関連した因子が大きく関与していると考えられる。今後、環境因子と DNA のその機能に関するより詳細な解析を行うことで、生体内における核酸分子の機能特性を知ることができ、またゲノム配列からその生物の生育環境を予測することもできると考えられる。

第 4 章 トロンビン蛋白質と四本鎖 DNA 間の相互作用解析

生体内では、DNA が四本鎖構造と呼ばれる高次構造を形成して、転写や複製制御に深く関わっていると考えられている。そこで本章では、thrombin 蛋白質結合 DNA アプタマー(TBA)を四本鎖形成 DNA のモデル分子として用い、蛋白質結合によって誘起される四本鎖形成メカニズムの解明を行う。熱力学的、また速度論的な解析より、カチオン分子と蛋白質とで四本鎖形成にどのような違い、もしくは類似点があるのかを詳細に解析し、四本鎖形成におけるカチオン分子と蛋白質のそれぞれの役割を考察する。

TBA はカリウムイオン(KCl)存在下において安定な四本鎖構造を形成する(Figure 4)。しかし、この安定化させるカチオン分子非存在においても、thrombin との結合により容易に四本鎖形成されることが円偏光二色性スペクトル測定により明らかとなった。また ITC 測定の結果から、thrombin 結合による四本鎖形成に由来すると考えられるエントロピー得な反応熱が観察された。速度論解析では、KCl 非存在下の thrombin-TBA 相互作用は KCl 存在下での相互作用よりも解離速度が速いことが明らかとなった。thrombin によって形成された TBA の四本鎖構造は、KCl によって安定化された TBA よりも安定性が低いことが示唆された。四本鎖の安定化にはその分子内にカチオン分子のような安定化分子の存在が重要で、蛋白質の結合はそれらをサポートするものであると考えられる。

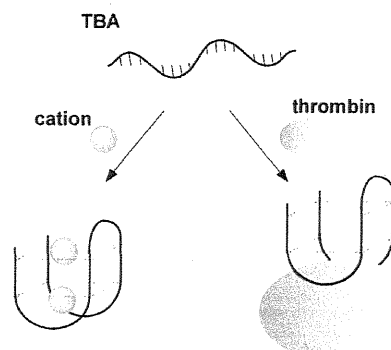


Figure 4. TBA のカチオン分子または蛋白質の結合による 4 本鎖形成.

第 5 章 総括

本研究では、DNA-蛋白質間の相互作用において、DNA が蛋白質に対しどのような分子認識を示すか、どのような相互作用・機能特性を有しているのか、を知るために、熱力学的な解析を基盤にその詳細な解明に取り組んだ。DNA は温度や溶媒環境の変化によって自身の水和状態と共に変化することにより、その構造や物性が変化し、それに伴い蛋白質との相互作用特性も変化していた。DNA の機能を知るためには、その配列と構造だけを知るのではなく、DNA を取り巻く水和水の状態も十分考慮して考えていかなければならない。これにより核酸分子のさらなる機能解明へ大きく貢献すると考えられる。