

氏名	野村 渉
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第 571 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合におけるリンカー配列の影響に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 杉浦幸雄 教授 藤井信孝 教授 伊藤信行

論文内容の要旨

序論

亜鉛フィンガータンパク質はヘリックス・ターン・ヘリックスやロイシン・ジッパーなどと並ぶ DNA 結合モジュールとして知られている。構造的な特徴として、亜鉛イオンを配位中心として $\beta\beta\alpha$ 構造にフォールドした各ドメインがリンカー配列により連結され、直列に並ぶ形で構成されている。ドメイン数は変化に富んでおり、典型的なものは 3 個で構成されるが、9 個のドメインを持つ 9-亜鉛フィンガータンパク質による長鎖 DNA 結合も注目されている。典型的な亜鉛フィンガータンパク質ではリンカー配列の保存度が非常に高く、それらは共通して DNA の主溝にはまり込んで DNA に結合する。これまで、リンカー配列の DNA との直接的相互作用は確認されていない。しかし、リンカー配列は DNA 結合において重要な役割を果たしていると考えられてきた。本研究ではリンカー配列が DNA 結合に及ぼす影響を明らかにするため、1) 典型的リンカー配列の置換による DNA 結合への影響、および 2) リンカー配列の伸長による DNA 認識パターンの変化について検討を行なった。

第一章 TFIIIA 型リンカー導入によるマルチ亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合の変化

天然の 9-亜鉛フィンガータンパク質 TFIIIA の 4～6 番目のフィンガードメインに関与する特徴的なリンカー配列を Sp1 亜鉛フィンガー 3 ユニットをつないで作製した Sp1ZF9 の典型的リンカー配列部分に導入し、Sp1ZF9T を作製した。ゲルシフト法による DNA 結合実験の結果、Sp1ZF9T は 2 つの異なる様式で DNA に結合し、時間経過によって安定な DNA 結合体に収束することが明らかになった。その安定な結合様式を DNase I フットプリント法、メチル化干渉法で調べた結果、9 つのフィンガードメインのうち N 末端側の 4 つのフィンガードメインによって DNA に結合していることが示された。典型的なリンカー配列のみで構成される Sp1ZF9 が 9 つ全てのフィンガードメインによって DNA に結合することから、リンカー配列が DNA 結合に与える影響が大きいことが明らかになった。

第二章 リンカー配列導入位置によるマルチ亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合部位への影響

TFIIIA 型リンカー配列の導入位置による DNA 結合への影響の違いを明らかにするために、導入位置を N および C 末端に変換した 9-亜鉛フィンガータンパク質 Sp1ZF9TN, Sp1ZF9TC を作製し、それぞれの DNA 結合を調べた。ゲルシフト法の結果、2 種のタンパク質はほぼ同じ親和性で 3GC ボックス DNA に結合することが示された。また、DNA との複合体を示すバンドも同じように現われていた。DNA 結合様式を調べるために DNase I フットプリント法、メチル化干渉法を行なったところ、異なるリンカー導入位置であるにも関わらず、標的配列である 3GC ボックスの同じ配列部分に対して結合していることが示された。しかし、Sp1ZF9T の DNA 結合においても示されたように、TFIIIA 型リンカー配列が疎水性アミノ酸を含むこと、また、AG や QDL など短いリンカー配列も含むことなど、亜鉛フィンガーにおいて典型的である DNA の主溝にはまり込む結合様式には適さない性質をもつと考えられるため、TFIIIA 型リンカーが導入された位置とは反対側にある亜鉛フィンガードメイン 4 つを用いて DNA 結合をすることが予想された。

第三章 リンカー配列伸長による亜鉛フィンガータンパク質の DNA 配列認識パターンの拡張

亜鉛フィンガードメインは α ヘリックスのアミノ酸によって 3 塩基の DNA 配列を認識する。このドメインが典型的なリンカー配列 TGEKP で直列につながることで連続した DNA 配列の認識が可能になる。TGEKP 配列の役割として、 α ヘリックス構造の安定化や連続した DNA 配列に対する結合に適した構造への変化などが構造解析により示されている。この典型的なリンカー配列に Gly を中心とした 2~4 アミノ酸を導入し、不連続な DNA 配列への結合が可能であるか、また、配列選択的な DNA 結合が可能であるかを検討した。Sp1 亜鉛フィンガータンパク質中の各リンカー配列に GG, GGS, GGSG の 3 種類の伸長リンカーを導入した。標的 DNA 配列として GC ボックスに 1 または 2 塩基対の AT 配列を各フィンガードメインの結合サイトの間に導入した DNA を用意した。ゲルシフト法の結果より、2 アミノ酸導入体では AT 配列の導入位置に応じた DNA 結合はみられなかったが、3 または 4 アミノ酸導入体では伸長したリンカー配列が DNA 結合時に位置する部分に AT 配列が導入されている標的配列に対して特異的に結合することが示された。DNase I フットプリント法の結果においては、導入された AT 配列部位に伸長したリンカー配列が位置する組み合わせの場合、標的配列全体にフットプリントがみられたが、位置しない場合は AT 配列部位においてフットプリントが確認されなかった。これらの結果より、リンカーを 3~4 アミノ酸伸長することで DNA 結合時のフィンガードメイン間の距離がある程度のフレキシビリティをもって調節され、AT 配列を含む配列への選択的な結合をしていると考えられる。従って、リンカー配列を伸長することにより不連続な DNA 配列に対する結合が配列選択的に行なうことが可能であり、伸長の為に導入するアミノ酸の種類によってはリンカー部分での DNA 配列認識も組み合わせた亜鉛フィンガーの新たな DNA 認識パターンを確立することができる可能性も示唆された。

本研究の結果は、亜鉛フィンガードメイン間をつなぐリンカー配列が DNA 結合様式に大きく影響を与えることを示し、また、亜鉛フィンガードメインの α ヘリックスによる認識との組み合わせで新たな認識パターンの展開を示唆した点で転写機能に關与する DNA 結合タンパク質の研究に重要な知見を提供するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

亜鉛フィンガータンパク質は転写因子複合体の DNA 結合モジュールとしての役割をもち、その人工的な設計は転写反応の人工的制御につながる重要な課題である。本研究では亜鉛フィンガータンパク質のリンカー配列が DNA 結合に及ぼす影響を明らかにするため、1) 典型的なリンカー配列の置換による DNA 結合への影響、および 2) リンカー配列の伸長による DNA 認識パターンの変化について検討を行なっている。

第 1 章では、天然の 9-亜鉛フィンガータンパク質 TFIIIA の 4~6 番目のフィンガードメインに關与する特徴的なリンカー配列を Sp1ZF9 の典型的なリンカー配列部分に導入し、Sp1ZF9T を作製した。ゲルシフト法による DNA 結合実験の結果より、Sp1ZF9T は 2 つの異なる様式で DNA に結合し、時間経過によって安定な DNA 結合体に収束することが明らかにされた。DNase I フットプリント法、メチル化干渉法により示された DNA 結合様式においても、9 つのフィンガードメインのうちの N 末端側の 4 つのフィンガードメインによって DNA に結合していることを示し、リンカー配列が DNA 結合に大きな影響を与えることを明らかにしている。

第 2 章では、TFIIIA 型リンカー配列の導入位置による DNA 結合への影響の違いを明らかにするために、導入位置を N および C 末端に変換した 9-亜鉛フィンガータンパク質 Sp1ZF9TN, Sp1ZF9TC を作製し、DNA 結合を検討している。ゲルシフト法の結果では、2 種のタンパク質はほぼ同じ親和性で基質 DNA に結合することを示している。DNA 結合様式を調べるための DNase I フットプリント法、メチル化干渉法では、異なるリンカー導入位置であるにも関わらず、標的配列の同じ配列部分に対して結合していることを示した。これらの結果と、疎水性アミノ酸を多く含む TFIIIA 型リンカー配列の性質を考察した結果、TFIIIA 型リンカーが導入された位置とは反対側にある亜鉛フィンガードメイン 4 つを用いて DNA に結合すると結論付けている。

第 3 章では、典型的なリンカー配列 TGEKP に Gly を中心とした 2~4 アミノ酸を導入し、不連続な DNA 配列への結合が可能であるか、また、配列選択的な DNA 結合が可能であるかを検討している。具体的には、各リンカー配列に GG, GGS, GGSG の 3 種類の伸長リンカーを導入し、標的 DNA 配列として GC ボックスに 1 または 2 塩基対の AT 配列を導

入した DNA への結合をみている。ゲルシフト法の結果より、3 アミノ酸以上の導入体において伸長したリンカー配列が DNA 結合時に AT 配列上に位置する場合、配列特異的に結合することが示されている。DNase I フットプリント法の結果では、AT 配列部位に伸長したリンカー配列が位置する組み合わせの場合に明らかなフットプリントが確認されている。これらの結果より、リンカーを 3～4 アミノ酸伸長することで DNA 結合時のフィンガードメイン間の距離がある程度のフレキシビリティをもって調節され、AT 配列を含む配列への選択的な結合をしていると考察している。

本研究の結果は、亜鉛フィンガードメイン間をつなぐリンカー配列が DNA 結合様式に大きく影響を与えることを示し、また、亜鉛フィンガードメインのリンカー配列を用いた新たな認識パターンの展開を示唆した点で転写機能に関与する DNA 結合タンパク質の研究に重要な知見を提供するものである。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月1日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。