

氏名	まつ した けい ぞう 松 下 恵 三
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 496 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	転写因子 Spl における亜鉛フィンガーの特異な DNA 認識と隣接ドメインに及ぼす影響

論文調査委員 (主 査) 教授 杉 浦 幸 雄 教授 川 寄 敏 祐 教授 多 賀 徹

論 文 内 容 の 要 旨

序

ヒト由来の転写因子である Spl はハウスキーピング遺伝子を始め様々な遺伝子の転写を制御していることが知られている。その転写制御は、数多くの遺伝子のプロモーターやその上流にある GC-box と呼ばれる DNA 塩基配列に特異的に結合することにより機能が発揮される。Spl のアミノ末端側にはタンパク質間相互作用や自己会合によって機能が発揮される転写活性化ドメインが、カルボキシル末端側には DNA との特異的結合を担う 3 つの C2H2 型亜鉛フィンガードメインが存在している。これまでの知見から、3 つの亜鉛フィンガーのうちアミノ末端側のフィンガー 1 が結合すると予想される領域は塩基配列にある程度の多様性が見られ、他のフィンガーとの役割の相違が考えられていた。そこで演者はこのフィンガー 1 の DNA 塩基配列の認識様式、およびアミノ末端側に隣接するドメインに及ぼす影響について詳細に調べた。

第 1 章 フィンガー 1 の特異な DNA 塩基認識様式

Spl の 3 つのフィンガーのみを含むタンパク質 Spl (530-623)、フィンガー 1 とフィンガー 3 をそれぞれ欠失させた Spl (zf23)、Spl (zf12)、さらに DNA 塩基の認識に関与する可能性のあるアミノ酸残基を Ala に置換したタンパク質数種を作製した。基質となる DNA は天然に存在する GC-box、及び各フィンガーの結合が予想される領域を変異させた変異 GC-box を用意した。これらを用いて、ゲルシフト法とメチル化干渉法により基質 DNA との結合親和性や塩基認識様式を評価した。その結果、親和性や特異性への寄与はフィンガー 3 が一番大きく、フィンガー 1 は寄与が極めて小さいこと、フィンガー 1 の DNA 認識領域が 5 塩基にも及ぶこと、少なくともフィンガー 1 のヘリックス直前に位置する Lys550 が、2 つのグアニン塩基の認識に関与していることなどが示唆された。

第 2 章 Ala556 を Arg に置換することによる DNA 認識の改変

通常、亜鉛フィンガーにおいてヘリックスの 6 番目に位置するアミノ酸残基が塩基認識に重要な役割を果たしている。フィンガー 1 ではここに Ala556 が存在している。この Ala556 を Arg や他のアミノ酸に置換した Spl の変異体を作製し、各種基質 DNA に対して、ゲルシフト法、メチル化干渉法等を用いて基質 DNA との結合親和性や塩基認識様式を評価した。その結果、Arg に置換した変異体に関して、その各フィンガーの塩基配列選択性への寄与はフィンガー 2 が最も大きく、フィンガー 3 の認識がフィンガー 1 と同程度に弱くなった。また認識様式もフィンガー 1 の認識領域が 5 塩基認識から 3~4 塩基認識へと変化し、新たなグアニン塩基との強いコンタクトも認められた。これらはヘリックス 6 番目の Ala を Arg に置換すると、典型的な C2H2 型亜鉛フィンガータンパク質の一つである転写因子 Zif268 と同じ認識パターンに変化することを示している。さらに塩基認識様式の変化はフィンガー 1 のみならず他のフィンガーへももたらされた。以上よりフィンガー 1 の認識塩基配列の多様性や特徴的な Spl-DNA 複合体形成には Ala556 が重要な役割を果たしていることが推測された。

第 3 章 GFP 融合 Spl の DNA 結合様式

フィンガー 1 の柔軟性が隣接ドメインにどのような構造的影響をもたらすのか調べるため、まず Spl (530-623) のアミノ末端側に、オワンクラゲから単離された蛍光タンパク質 GFP を融合させた。さらに基質 DNA として末端にテトラクロロカルボキシフルオレセインで標識した GC-box を用意した。これらを用いて、蛍光共鳴エネルギー移動や蛍光異方性の温度依存性を測定し、野生型 Spl と Ala556 → Arg 置換 Spl で、DNA 結合状態における隣接ドメインの DNA に対するジオメトリーの違いや DNA 結合に伴う融合タンパク質のコンフォメーション変化を調べた。その結果、DNA との複合体においてアミノ末端 GFP の DNA に対する包括的なジオメトリーやコンフォメーションは両方で非常に類似していた。しかし融合タンパク質のみの場合は、野生型では比較的コンパクトな構造をとっており、DNA との結合により柔軟なコンフォメーション変化をもたらした。一方、Arg 置換された Spl では DNA 非存在下での融合タンパク質の構造は DNA 存在下と大きな相違が見られなかった。以上より、Ala556 は Spl が DNA と結合する際にアミノ末端側に柔軟性をもたらすと考えられた。

総括

Spl を含め Krüppel タイプの亜鉛フィンガーファミリーは数多く知られており、その亜鉛フィンガードメインはカルボキシル末端側で高度に保存されているが、アミノ末端に連結する転写制御ドメインは多岐にわたっている。転写因子の細胞・組織特異性や遺伝子特異性は、プロモーター領域中の DNA 塩基配列の認識と他の転写因子との複合的な相互作用によって発揮される。亜鉛フィンガードメインによる GC-box の認識と転写制御ドメインでの特異的なタンパク質間相互作用、この両者を無理なく機能させ転写因子としての役割を発揮させるためには両ドメインの連結部分にある程度の柔軟性が必要であり、Spl では Ala556 を含むフィンガー 1 がその役割を担っているのではないかと考えられる。本研究は、Spl の機能を理解する上で有用であるばかりでなく、新しい転写制御分子を構築する上で有益な知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

ヒト由来の転写因子である Spl は、数多くの遺伝子のプロモーターにある GC-box と呼ばれる DNA 塩基配列に特異的に結合することにより機能が発揮される。Spl のアミノ末端側にはタンパク質間相互作用や自己会合によって機能が発揮される転写活性化ドメインが、カルボキシル末端側には DNA との特異的結合を担う 3 つの C₂H₂ 型亜鉛フィンガードメインが存在している。これまでの知見から、3 つの亜鉛フィンガーのうちアミノ末端側のフィンガー 1 が結合すると予想される領域は塩基配列にある程度の多様性が見られ、他のフィンガーとの役割の相違が考えられていた。そこで本研究ではこのフィンガー 1 の DNA 塩基配列の認識様式、およびアミノ末端側に隣接するドメインに及ぼす影響について詳細に検討した。

Spl の 3 つのフィンガーのみを含むタンパク質を基にした数種の変異体と、基質となる DNA を作製し、基質 DNA との結合親和性や塩基認識様式を評価した。その結果、親和性や特異性への寄与はフィンガー 3 が一番大きく、フィンガー 1 は寄与が極めて小さいこと、フィンガー 1 の DNA 認識領域が 5 塩基にも及ぶこと、少なくともフィンガー 1 のヘリックス直前に位置する Lys550 が、2 つのグアニン塩基の認識に関与していることなどが示唆された。

亜鉛フィンガーにおいてヘリックスの 6 番目に位置するアミノ酸残基が塩基認識に重要な役割を果たしていることが知られている。フィンガー 1 ではここに Ala556 が存在している。この Ala556 を置換した変異体を作製し、各種基質 DNA に対して、基質 DNA との結合親和性や塩基認識様式を評価した。その結果、Arg に置換した変異体に関して、その各フィンガーの塩基配列選択性への寄与はフィンガー 2 が最も大きく、フィンガー 3 の認識がフィンガー 1 と同程度に弱くなった。また認識様式もフィンガー 1 の認識領域が 5 塩基認識から 3 ~ 4 塩基認識へと変化し、新たなグアニン塩基との強いコンタクトも認められた。これらはヘリックス 6 番目の Ala を Arg に置換すると、典型的な C₂H₂ 型亜鉛フィンガータンパク質と同じ認識パターンに変化することを示している。以上よりフィンガー 1 の認識塩基配列の多様性や特徴的な Spl-DNA 複合体形成には Ala556 が重要な役割を果たしていることが推測された。

フィンガー 1 の柔軟性が隣接ドメインにどのような構造的影響をもたらすのか調べるため、まず Spl (530-623) のアミノ末端側に、蛍光タンパク質 GFP を融合させた。さらに基質 DNA として末端にテトラクロロカルボキシフルオレセインで標識した GC-box を用意した。これらを用いて、分光学的手法により、野生型 Spl と Ala556 → Arg 置換 Spl で、DNA 結合状態における隣接ドメインの DNA に対するジオメトリーの違いや DNA 結合に伴う融合タンパク質のコンフォメーション

ン変化を調べた。その結果、DNA との複合体においてアミノ末端 GFP の DNA に対するコンフォメーションは両者で非常に類似しているが、融合タンパク質のみの場合は、野生型では比較的コンパクトな構造をとっており、DNA との結合により柔軟なコンフォメーション変化をもたらす一方、Arg 置換された Spl では DNA 非存在下での融合タンパク質の構造は DNA 存在下と大きな相違が見られなかった。以上より、Ala556 は Spl が DNA と結合する際にアミノ末端側に柔軟性をもたらすと考えられた。

以上、本研究は、Spl のフィンガー 1 の転写制御に果たす機能を理解する上で有用な情報を与えるばかりでなく、新しい転写制御分子を構築する上で有益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。

さらに、平成14年2月21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。