

氏名	相澤康則
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第431号
学位授与の日付	平成11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	薬学研究科薬品作用制御システム専攻
学位論文題目	二量体タンパク質によるDNA塩基配列の分子認識機構

(主査)

論文調査委員 教授 杉浦幸雄 教授 川寄敏祐 教授 半田哲郎

論文内容の要旨

転写の初期段階では、複数のタンパク質が特定の塩基配列を認識し、協同的に結合する。この精密な分子認識過程において、タンパク質間に存在する非共有結合相互作用が、タンパク質群がDNA塩基配列を認識する際の選択性の向上および協同性の発現に重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで著者は、複数のDNA結合タンパク質が関与する精密な分子認識機構を解明することを目的として、塩基配列選択的にDNAと結合する二量体ペプチドを設計および合成した。この二量体ペプチドは、DNA結合ドメインとして天然のタンパク質のDNA結合ドメイン由来のペプチドを、二量化部位として β -シクロデキストリン(Cd)とそのゲスト分子からなるホストゲスト包接化合物を有している。ホストゲスト相互作用によって二量体を形成するペプチドは、天然のタンパク質とは異なり、2つのドメインが完全に独立している。そのため、DNA-単量体ペプチド間相互作用に影響を及ぼすことなく、二量化部位の性質だけを変化させることができる。筆者はこのペプチド二量体および対照実験用に同一のDNA結合ペプチドを有する共有結合二量体ペプチドを用いて、二量体の安定性を変化させた場合、および二量体形成の平衡反応をなくした場合に、二量体ペプチドのDNA塩基配列認識がそれぞれどのように変化するかについて検討した。その結果、(1)協同的なDNA-ペプチド二量体複合体の生成は二量体の熱力学的な安定性により決定されること、(2)二量体形成が平衡反応であることにより、DNA-ペプチド二量体複合体形成がより狭いペプチド濃度範囲で完了し、同時に塩基配列選択性も向上することを明らかにした。さらに、ロイシンジッパーを二量化部位に持つ天然のDNA結合二量体タンパク質を用いて(2)の結果の検証を行い、上記の二量体ペプチドと同様の結論を得た。

第1章 二量体ペプチドとDNAの複合体形成における二量体形成部位の熱力学的安定性の役割

ペプチド二量体の熱力学的安定性を変化させるために、ゲスト分子の種類の異なる5種類のペプチド二量体を合成した。DNA結合ドメインとして転写因子GCN4のDNA結合領域由来の24残基のペプチドを共通に用い、そのC末端のシステインの側鎖にCd、そしてアダマンタン(Ad)などの各種ゲスト分子を導入した。次に、これらペプチド二量体の熱力学的安定性を表面プラズモン共鳴を原理とする測定器で測定した。この値をもとに、GCN4が特異的に認識するDNA配列に対するペプチド二量体の結合に関するゲルシフトアッセイのデータを解析した。その結果、二量体の安定性とペプチド二量体-DNA複合体の安定性は直線関係にはなく、安定なペプチド二量体-DNA複合体形成には一定値以上の二量体の安定性が必要であることがわかった。また、非特異的DNA配列とペプチド二量体の結合を調べ、DNA塩基配列選択性を検討したところ、二量体形成能がほぼ等しい2種類のペプチド二量体が、特異的DNA配列に対して同程度の親和性を示したのに対して、非特異的DNA配列に対しては有為な親和性の差を示した。このことから二量体形成部位の熱力学的安定性だけでなく、そのわずかな構造の違いも、二量体ペプチドの塩基配列選択性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

第2章 非共有結合および共有結合により二量体を形成したペプチドのDNA塩基配列認識

次に、ペプチド二量体形成が単量体と二量体の平衡反応により支配されていることが、ペプチド二量体のDNA塩基配列

認識能にどのような影響を与えるかを検討した。このために、同一のDNA結合ペプチドを用いて、共有結合および非共有結合により二量体を形成する3種類のペプチド二量体を合成した。共有結合二量体ペプチドとして、ジヒドロフェナンスレン誘導体を介してGCN4のDNA結合領域由来のペプチドを二量化したペプチドを用いた。非共有結合二量体ペプチドとしては、2種類の二量体ペプチドを用いた。一方はCdペプチドおよびAdペプチドからなる二量体ペプチド、他方は同一ペプチド内にCdおよびAdを有するAdCdペプチド2分子からなる二量体ペプチドである。AdCdペプチドは標的DNA非存在下では分子内ホストゲスト錯体を形成している。そのため、AdCdペプチドは二量体でDNAに結合する際に、もう一方の非共有結合二量体ペプチドに比べて劇的な構造変化を伴う。従って、この3種類の二量体ペプチドの塩基配列選択性を定量的に比較することで、ペプチド二量体の塩基配列認識に対するペプチド二量体の解離平衡の影響だけでなく、二量体形成の際に起こるペプチド構造変化の影響についても明らかになると考えられる。ゲルシフトアッセイの結果、二量体形成を非共有結合によって平衡反応とすることで塩基配列認識の選択性が向上することが確認された。また、二量体形成に加えて、ペプチドの構造変化という別の平衡を存在させることによって二量体ペプチドの塩基配列選択性が大きく向上することが明らかとなった。

さらに二量体の解離平衡が無視できるロイシンジッパー型DNA結合タンパク質の共有結合二量体を合成し、その塩基配列選択性を非共有結合により二量化する天然のロイシンジッパータンパク質と比較、検討した結果、先に示したペプチド二量体の結果と同様に、二量体形成が平衡反応であることにより、二量体タンパク質のDNA塩基配列識別能が向上することがわかった。

論文審査の結果の要旨

生体内で見られる、複数のタンパク質が協同的に特定の遺伝子配列に結合するという精密な分子認識過程を解明することを目的として、塩基配列選択的にDNAと結合する二量体ペプチドを設計および合成した。この二量体ペプチドは、DNA結合ドメインとしての天然のタンパク質由来のペプチドに加えて、二量化部位として β -シクロデキストリンとそのゲスト分子からなるホストゲスト包接化合物を有している。ホストゲスト相互作用により、二量体を形成するペプチドは、天然のタンパク質二量体とは異なり、2つのドメインが完全に独立しているので、DNA-ペプチド間相互作用に影響を及ぼすことなく二量化部位の性質を変化させることができる。このペプチド二量体を用いて、二量体の安定性および二量体形成が平衡反応であることが二量体ペプチドのDNA塩基配列認識にどのような影響を及ぼすかについて研究を行った。その結果、以下に示すように二量体形成部位がタンパク質の分子認識能を鋭敏化する役割を担っていることを明らかにすると共に、いくつかの興味ある知見を明らかにした。

1. 二量体形成部位の熱力学的安定性を変化させるために、ゲスト分子の種類異なる5種類のペプチド二量体を合成し、これらのペプチド二量体のDNA結合をゲルシフトアッセイにより定量的に評価したところ、安定なペプチド二量体-DNA複合体形成にはある値以上の二量体安定性が必要であることがわかった。また、二量体形成能がほぼ等しい2種類のペプチド二量体は、特異的DNA配列に対しては同程度の親和性を示したのに対して、非特異的塩基配列に対しては有意な親和性の差を示した。このことから二量体形成部位の熱力学的安定性だけでなく、そのわずかな構造の違いも、二量体ペプチドの塩基配列選択性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. 共有結合および非共有結合により二量体を形成する3種類のペプチド二量体を合成し、二量体形成が単量体と二量体の平衡反応により支配されていることが、ペプチド二量体のDNA塩基配列認識能にどのような影響を与えるかを検討したところ、二量体形成を非共有結合にすることで塩基配列認識の選択性が向上することが確認された。また、二量体形成において、ペプチドの構造変化という別の平衡を存在させることによっても二量体ペプチドの塩基配列選択性が大きく向上することが明らかとなった。

3. 二量体の解離平衡が無視できるロイシンジッパー型DNA結合タンパク質、GCN4の共有結合二量体を合成し、その塩基配列選択性を非共有結合で二量化する天然のGCN4と比較したところ、天然型タンパク質が認識する2種類のDNA配列に対しては、GCN4共有結合二量体もまた、同等の認識能を示したが、非特異的なDNA塩基配列に対しては、天然型の非共有結合二量体の方が高い識別能を示すことが明らかになった。

以上、本研究の結果明らかになったペプチド二量体によるDNA認識における二量体形成部位の作用機構は、生体内での複数のタンパク質によるDNA認識機構を明らかにするうえで、タンパク質間相互作用に着目した新しい概念を提唱したといえる。また、合成された種々の二量体形成様式をもつペプチド二量体は、特定の遺伝子配列を認識する合成ペプチドとしても有用であり、新しい遺伝子を標的とする創薬研究の基礎となる化合物としても重要である。よって、審査に当たった川寄教授、半田教授そして私は、本論文が博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。さらに、平成11年2月22日論文内容とそれに関連した事項につき口頭諮問を行った結果、合格と認めた。