

二量体タンパク質による  
DNA 塩基配列の分子認識機構

1 9 9 9

相澤 康則

# 目次

序論	1
第一章 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	
第一節 ホストペプチドおよび各種ゲストペプチドの設計と合成	10
第二節 ホストゲスト二量体形成部位の熱力学的安定性の測定	14
第三節 二量体形成部位の熱力学的安定性と二量体ペプチド-DNA複合体の安定性の相関	18
第四節 塩基配列識別能	22
第五節 協同的相互作用エネルギーの起源	26
第二章 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	
第一節 非共有結合および共有結合二量体ペプチドの設計と合成	32
第二節 二量体形成部位の解離平衡と二量体ペプチドの塩基配列識別能の相関	36
第三節 ペプチドの構造変化と二量体ペプチドの塩基配列識別能の相関	44
総括	48
実験の部	
第一章に関する実験	50
第二章に関する実験	55
引用文献	59
謝辞	62

## 序論

分子生物学の発展にともない、細胞内のさまざまな生体分子が同定され、細胞という限られた空間に分子量の大小を問わず、非常に多くの分子が存在していることがわかった(1)。これら共存している無数の分子の中から、特定の分子同志がお互いを認識し相互作用することで、細胞内の様々な機能は発現、制御されている。生体分子間の識別こそが、生体機能を支配しているものであり、細胞内の機能を理解するということは生体分子間の識別のメカニズムを解明することにほかならないのである。では、生体分子はそれぞれの特定の相手分子をどのように識別しているのだろうか。

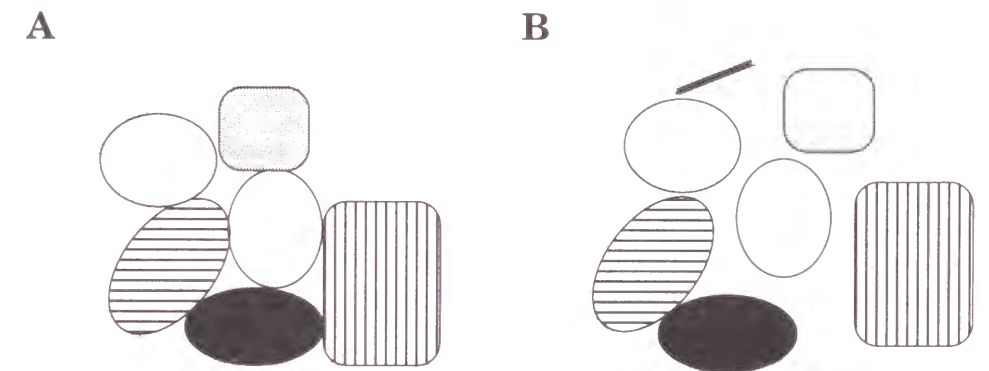
この問題を考える上で、転写開始時に見られる現象は格好の研究対象である。生物では内的あるいは外的要因に応じてゲノム内にコードされている多くの遺伝子のうち特定のものが選択的に発現される。遺伝子の発現、すなわち機能を持つタンパク質の合成に至るまでには、転写、翻訳、そして翻訳後の修飾といった多くの段階があるが、発現させる遺伝子の選択には最初の段階である転写開始部位の選択が最も重要であると考えられている。遺伝子をコードしているゲノムは4種類の塩基対から構成されており、そこには、例えば酵母で $1.2 \times 10^7$ 、ヒトで $3 \times 10^9$ もの膨大な塩基対が存在している。その中から特定の塩基配列部分を選び出すだけでも、確率的にいて、酵母で12、ヒトで16の連続した塩基配列が1塩基対の間違いもなく正確に識別されなくてはならない。実際のプロモーター配列には類似した塩基配列が存在しているため、ゲノム内から特定のプロモーター配列を選び出すためには、より長い特定の塩基配列が識別されていることになる。しかも、DNAは1あるいは2塩基対の違いによって大きく構造を変化させることほとんどなく、二重らせんという巨視的には等しい構造を保持していることから、転写開始部位の識別は非常に精密な分子認識によって成り立っていることになる。これらの理由により、DNA塩基配列の識別を支配している要因を知ることは広く生体分子間の識別において重要な考え方を提示するものと考えられる。

実質的な転写反応、すなわちメッセンジャー RNA 合成反応を行う RNA ポリメラーゼ自体にも塩基配列識別能が備わっており、原核細胞では、この1種類のタンパク質だけで転写制御

がおこなわれる遺伝子も存在するが、真核細胞では RNA ポリメラーゼ以外に 40 種類以上の多くのタンパク質が特定遺伝子の転写制御に関わっていることがわかっている (2)。実際には、それら複数の転写因子が特定のプロモーター部分に協同的に結合し、安定な複合体を形成した場合にその遺伝子の転写活性の上昇が観察されることから、複数のタンパク質による塩基配列の識別にはタンパク質群-DNA 複合体の安定性が重要な役割を果たしていると考えられる (Figure 0-1)。

これまでの生化学的研究から、この複合体の安定性は様々な要因によって支配されていることが明らかにされている。TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) は、真核細胞における多くの遺伝子の発現を制御している基本転写因子の一つで、プロモーター内の 7 塩基対からなる TATA ボックスに特異的に結合し、他のタンパク質とともにプロモーター上に転写開始複合体を形成する。TATA ボックスのコンセンサス配列は 5'-ATATt/aAt/a-3'であり (3、4)、TBP もこの配列に対してもっとも安定に結合するのだが、プロモーターによってはこの配列の 1 あるいは 2 塩基対が異なる TATA ボックスが存在している。しかも、これら TATA ボックスをコンセンサス配列に置換すると転写活性が大きく低下するという報告がある (5)。このような知見から、単純に個々のタンパク質の DNA に対する親和性を増大させても、タンパク質群-DNA 複合体の安定性が上昇する訳でないことがわかる。これらの現象は、結合する塩基配列によって DNA 上でのタンパク質の構造が変化するために、他のタンパク質との相互作用が弱くなり、その結果、タンパク質群-DNA 複合体の安定性が低下したと解釈されている (5)。また、転写活性化における協同的なタンパク質間相互作用の重要性を直接的に示すために、転写因子との相互作用をおこなうアミノ酸を別のアミノ酸に置換した変異 TBP の転写効率を調べた報告もある (6)。そこでは、TATA ボックスに対する親和性は天然の TBP と同程度であるにもかかわらず、転写活性が著しく減少している変異 TBP が報告されている。このように、多くの生化学的研究から、塩基配列識別には複数のタンパク質による協同的な DNA 結合が重要な役割を果たしているという定性的な知見を得ることができる。では、この協同性はどのようなメカニズムで発揮されるのであろうか。

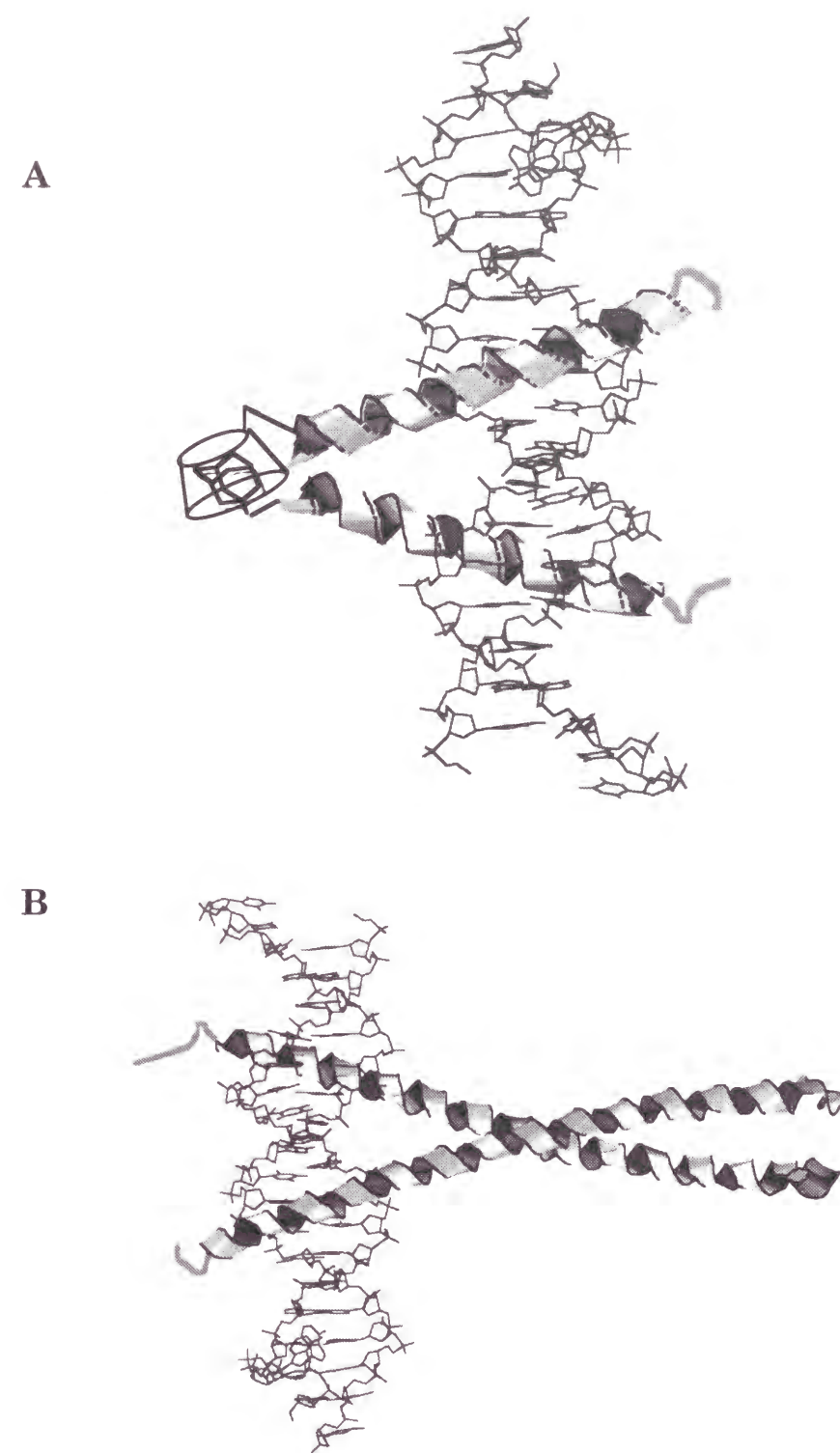
この疑問を解くためには、複数のタンパク質による DNA 結合に関する定量的な解析を要す



**Figure 0-1** Schematic representations showing that transcriptional factors bind cooperatively on the specific DNA sequence and form stable proteins-DNA complex (A). Small difference of DNA sequence causes dramatic decrease in stability of proteins-DNA complex (B).

る。これまでに、定量的な解析を可能にするために、複合体の構成因子の数及び種類がなるべく少ない系が選ばれてきた。なかでも、バクテリアのリプレッサータンパク質とオペレーターとの相互作用の系はいくつかの研究グループによって精力的に調べられている (7)。リプレッサータンパク質では、二分子のリプレッサー二量体が隣り合って存在しているオペレーターに結合する際に協同的に相互作用し、同種四量体-DNA 複合体が形成される。Ptashne らは、二量体とひとつのオペレーターとの複合体形成において得られる各熱力学的パラメーターの数値と、四量体-DNA 複合体形成における値とを比較することで協同性の起源を探究した (8)。この研究から、協同的に四量体-DNA 複合体形成を行うことで二分子の二量体-DNA 複合体形成に比べて、2-3kcal/mol 程度の自由エネルギーの減少が得られることが示された。また、リプレッサータンパク質の二量体は単量体2分子との平衡状態にあるので、二量体タンパク質のオペレーターへの結合も協同的におこなわれていることになる。Ackers らは、二量体タンパク質-オペレーター複合体形成に対する単量体タンパク質間の親和性の影響について検討している (9, 10)。彼等は単量体タンパク質間の親和性を変化させるために、二量体形成部位にアミノ酸置換を施した数種類の変異タンパク質を作成した。そのあと、それぞれの単量体タンパク質間の親和性を測定し、各変異二量体タンパク質-DNA 複合体の安定性との相関性を調べた。しかし筆者は、この単量体タンパク質間の親和性の影響に関して詳細な考察を行うにはリプレッサータンパク質の系は不適切だと考える。なぜなら、タンパク質の DNA への結合によって、二量体形成に関わるタンパク質部分の構造が変化する可能性も十分ある。このタンパク質構造の変化様式が、結合する DNA の塩基配列によっても異なるかもしれない。このような場合、DNA 非存在下で測定した単量体タンパク質間の親和性は、二量体タンパク質-DNA 複合体形成時の単量体タンパク質間の親和性と大きく異なることが予想される。このため、リプレッサータンパク質の系では、二量体タンパク質-DNA 複合体形成時に発揮される協同性に対する、単量体タンパク質間の親和性の役割を純粋に評価できない。そこで、上述した不確定要素を解消した解析系として、著者は個々の相互作用が独立して存在する DNA 結合性二量体ペプチドを用いた (Figure 0-2 A)。

二量体ペプチドの DNA 相互作用部位には、転写活性化因子 GCN4 のベーシック・ロイシ



**Figure 0-2** (A) A possible structure of a complex between the basic region peptide dimer and DNA. (B) An X-ray structure of a complex between the GCN4 b-Zip domain and AP1 (32).

ンジッパー DNA 結合ドメイン内の塩基性領域由来のオリゴペプチドを用いた (Figure 0-2 B)

(11)。このペプチドをリンカーで連結した二量体は GCN4 の認識塩基配列に特異的に結合することが分かっていたので (12)、これを用いることで二量体ペプチドに天然のタンパク質の塩基配列識別能を与えることができる。さらに、このペプチド 2 分子が協同的に DNA 結合をおこなうことを期待して、ペプチド間相互作用部位として、 $\beta$ -シクロデキストリンあるいはそのゲスト分子をペプチドに導入した (13)。ホストゲスト両分子は非共有結合で 1 対 1 の包接錯体を形成するので (14, 15)、特異的タンパク質間相互作用部位の代わりとして機能する。これまでに、ホストゲスト両分子を DNA 相互作用部位であるペプチドの末端に導入した場合、GCN4 結合配列に二量体として協同的に結合することがわかっている (13)。また、 $\beta$ -シクロデキストリンとともに、安定性の異なる包接錯体を形成しうるゲスト分子は数種類存在しているので、リプレッサータンパク質の系と異なり、この系ではゲスト分子の種類を変えることで二量体形成部位の安定性だけが異なる二量体ペプチドが得られる利点がある。

これまでに、上述の非共有結合によって二量化するペプチド以外にも、様々な二量体形成部位を介して共有結合で二量化しているペプチドを用いて、塩基配列識別能に対してペプチド間相互作用がどのような影響を及ぼすのかについて研究がおこなわれている。二量体形成部位として有機鋳型分子を用いた系では、二量体形成部位に対するペプチド 2 分子の 3 次元的位置関係が異なる二量体ペプチドについて調べられた (16-18)。これら二量体ペプチドの塩基配列識別能を比較した結果、二量体形成部位には、ペプチド部分を DNA 結合に適した空間配置に固定する役割があることが示された。この知見は、金属錯体を介して二量化している DNA 結合性ペプチドを用いた研究からも得られている (19-21)。

Zn フィンガータンパク質や Oct-1 といった単量体として塩基配列特異的に DNA に結合するタンパク質も、同一ペプチド鎖内に複数の DNA 結合モジュールを有していることから、共有結合を介した二量体とみなすことができる (22, 23)。このように考えると、塩基配列の識別をおこなうタンパク質のほとんどが、共有結合あるいは非共有結合を介して複数の DNA 結合部位を有していることになる。では、この DNA 結合部位の連結様式の違いが DNA 結合タンパク質の塩基配列識別能に何らかの影響を及ぼしているのだろうか。Pabo らは複数の

Zn フィンガーマチーフをアミノ酸リンカーで連結した Zn フィンガーマチーフ共有結合多量体 (24)、および同じく Zn フィンガーマチーフに Gal4 タンパク質の二量化部位を導入した非共有結合二量体 (25) をそれぞれ作成し、この問題解決を試みようとしている。非共有結合二量体は、亜鉛フィンガードメインの結合配列が隣り合っている DNA に対して協同的に結合した (25)。Gal4 タンパク質は同種二量体を形成するので、1 種類の亜鉛フィンガー/Gal4 融合タンパク質を用いて同種二量体タンパク質の塩基配列識別能を調べるには有効な系である。ところが、2 種類の融合タンパク質を用いて異種二量体タンパク質について DNA 結合を調べる際には問題がある。このとき、系中には 1 種類の異種二量体以外に 2 種類の同種二量体が形成されうるからである。実際、ほとんどの場合、異なる種類のタンパク質が協同的に DNA に結合して塩基配列を識別しているため、異種二量体の塩基配列識別能について検討する必要がある。この点に関してもホストゲスト分子を二量体形成部位に用いることで解決できる。ホストゲスト両分子をそれぞれ別の種類のペプチドに導入することで、系中に 1 種類の異種二量体ペプチドだけを存在させることができるため、異種二量体の塩基配列識別能について調べることができる (26)。また、ホストゲスト分子を導入する位置によって DNA に協同的に結合したときのペプチドの配向を規制できる利点がある (27)。

本研究では、このホストゲスト包接化合物形成を二量体形成に用いる系の利点を生かして、DNA 相互作用部位に変化を引き起こすことなく、二量体形成部位の性質だけを変化させた二量体ペプチドと各種塩基配列 DNA との相互作用を調べた。具体的には、

1. 二量体形成部位の熱力学的安定性が変化した場合
2. 二量体形成部位の平衡反応が存在しない場合

についてモデル系を構築した。2 では、天然のタンパク質と同様の空間配置にペプチドを固定させることができる有機鋳型分子 (16-18) を二量体形成部位にもつ共有結合二量体を用いた。これらの二量体形成部位の性質の異なる二量体ペプチドの、特定の塩基配列に対する結合を比較することで、複合体形成における協同性発現のメカニズムについて検討した。さらに、塩基配列を変化させた場合の二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性の変化を比較することで、二量体ペプチドによる塩基配列識別能に対して二量体形成部位がどのような影響を及ぼすかを検

討した。これらの結果を総合的に解釈することで、実際の複数の生体分子による特定分子の識別において協同性の果たす役割について考察した。

## 第一章

### 二量体ペプチドと DNA の複合体形成における

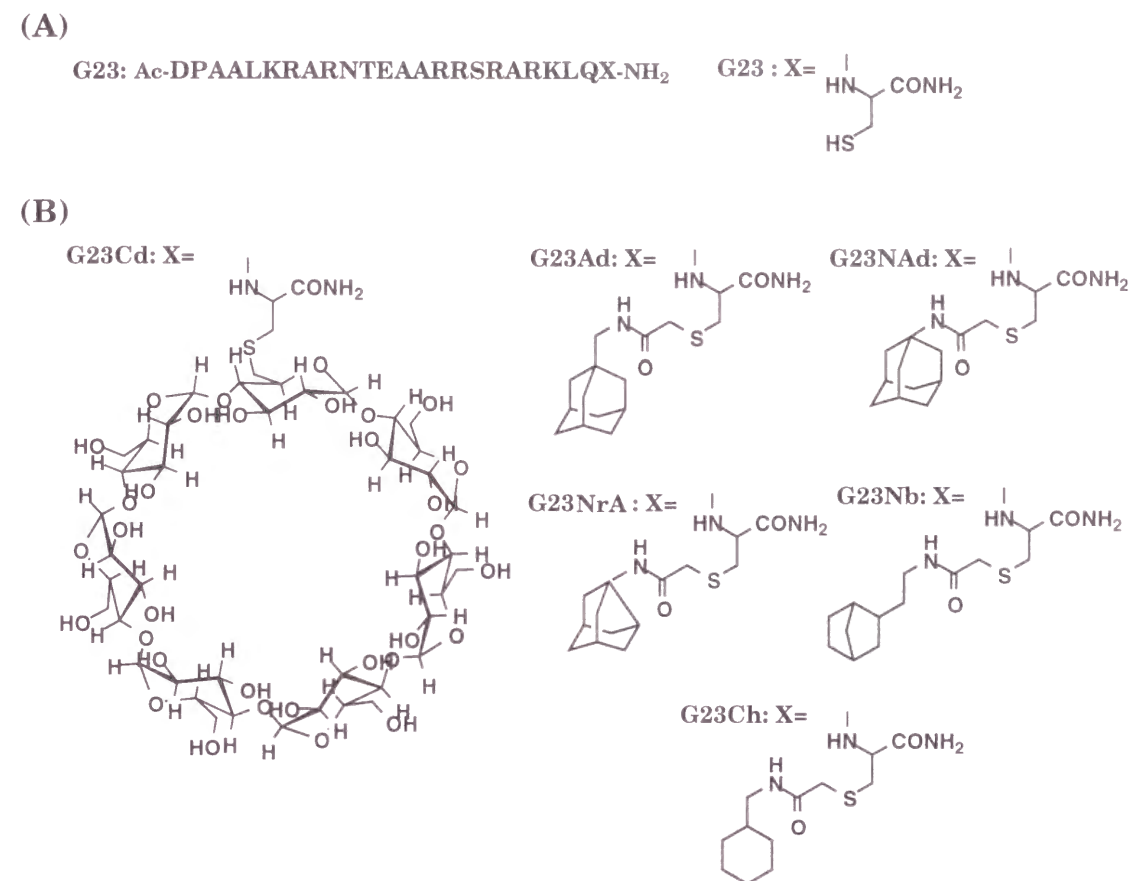
#### 二量体形成部位の熱力学的安定性の役割

二量体タンパク質による DNA 塩基配列識別能は、二量体タンパク質と様々な DNA との複合体の安定性の差によって決定される。序論で考察したように、二量体タンパク質-DNA 複合体の安定性は、DNA-単量体タンパク質間の親和性だけでなく、単量体タンパク質間の親和性によっても支配されていると考えられる。では、タンパク質間の親和性の変化に応じて、二量体タンパク質-DNA 複合体の安定性や二量体タンパク質の DNA 塩基配列識別能はどのように変化するのでしょうか。この疑問を解くために、第 1 章では、ホストゲスト包接化合物を二量体形成部位に持つ二量体ペプチドを用いて、二量体形成部位の熱力学的安定性が、二量体ペプチド-DNA 複合体形成時にみられる協同性および二量体ペプチドの塩基配列識別にどのような影響を及ぼしているかについて考察する。

#### 第一節 ホストペプチドおよび各種ゲストペプチドの設計と合成

$\beta$ -シクロデキストリンは数種類のゲスト分子と熱力学的安定性の異なる包接化合物をする (14, 15)。そこで、二量体ペプチドの二量体形成部位の熱力学的安定性を変化させるために、 $\beta$ -シクロデキストリンとの複合体の解離定数の異なる 5 種類のゲスト分子を、二量体ペプチドの二量体形成部位として用いることにした。5 種類のゲスト分子は、アダマンタン (Ad)、N-アダマンタン (NAd)、ノルアダマンタン (NrA)、ノルボルナン (Nb)、そしてシクロヘキサン (Ch) である (Figure 1-1 B)。Eftink らの実験によると、これら 5 種類のゲスト分子と  $\beta$ -シクロデキストリンとの包接化合物の解離定数は  $1 \times 10^{-5}$  M から  $1 \times 10^{-4}$  M の間に分布しているので (14)、二量体形成部位の解離定数の 10 倍の差が、二量体ペプチドの塩基配列選択的結合および識別能におよぼす効果について検討できると期待した。

DNA 結合部位としてベーシックロイシンジッパータンパク質 GCN4 の塩基性領域由来のペ

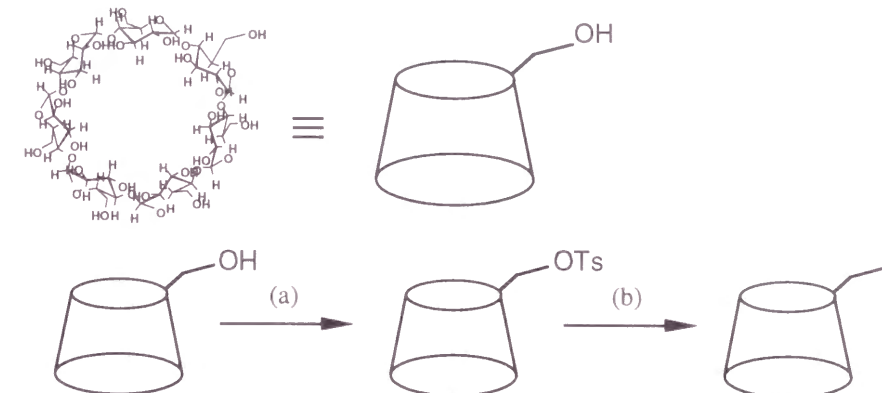


**Figure 1-1** (A) Amino acid sequence for the G23 peptide and (B) structures of the modified C-terminal Cys residue (X). The cysteine residues were modified with 6-deoxy-6-iodo- $\beta$ -cyclodextrin for G23Cd and with bromoacetyl derivatives of the guest molecules for G23Ad, G23NAd, G23NrA, G23Nb and G23Ch. Abbreviations for the amino acid are: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; K, Lys; L, Leu; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr.

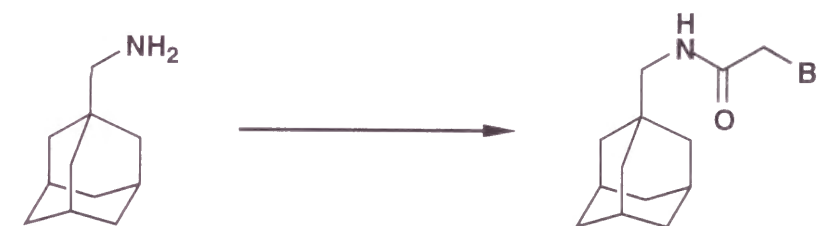


プチド (以下、GCN4 ペプチド) を共通に用いた (Figure 1-1 A) (11)。これまでに、 $\beta$ -シクロデキストリンとアダマンタンからなる二量体形成部位を有する GCN4 ペプチドが二量体で GCN4 の結合配列に特異的に結合することが分かっているので (13)、アダマンタンとは別のゲスト分子を有する二量体ペプチドも GCN4 の結合配列に特異的に結合すると期待した。GCN4 ペプチドは Fmoc 固相合成法によって合成した (28)。GCN4 ペプチドは特異的な DNA 塩基配列結合時にほぼ 100%の $\alpha$ -ヘリックスに構造変化するのだが、ペプチド末端に電荷が残っていると $\alpha$ -ヘリックスを不安定化させる可能性がある (29)。そのため、アミノおよびカルボキシル末端をそれぞれアセチル化、アミド化した。この GCN4 ペプチドに二量化部位である $\beta$ -シクロデキストリンおよび各ゲスト分子を修飾するために、ペプチドのカルボキシル末端にシステインを導入した。システインの側鎖のチオール基に、6 位の水酸基の 1 つをトシル化したのちヨウ素化ナトリウムでヨウ素化した 6-ヨード- $\beta$ -シクロデキストリンを反応させて (30)、 $\beta$ -シクロデキストリンをもつホストペプチドを合成した。またチオール基とプロモアセチル化した各種ゲスト分子のアミン誘導体を反応させることで、各種ゲスト分子をもつゲストペプチドを合成した (Scheme 1, 2)。これらのペプチドではホストおよびゲスト分子はカルボキシル末端に存在するので、DNA に結合する際、ペプチド単量体はカルボキシル末端同志で二量化するよう規制される。ベーシックロイシンジッパー型 DNA 結合ドメインにおいても、ロイシンジッパー部分は塩基性領域のカルボキシル末端側にあるので、本章で用いるすべての二量体ペプチドでの GCN4 ペプチドの配向は天然のタンパク質と同じである。

ここで用いる二量体ペプチドでは、天然に存在するタンパク質とは異なり、塩基配列認識部位と二量体形成部位がそれぞれ独立して機能すると考えられる。そのため、二量化部位を構成するゲスト分子の種類をかえることで、ペプチドの DNA 相互作用の性質を変えることなく、二量体形成部位の熱力学的安定性だけを変化させ、二量体ペプチドの塩基配列識別能の変化を検討できると考えられる。



**Scheme 1** Synthesis of mono-6-deoxy-6-iodo- $\beta$ -cyclodextrin. Reagents: (a) *p*-toluenesulfonyl chloride, dry Pyridine. (b) NaI, dry DMF, 70°C.



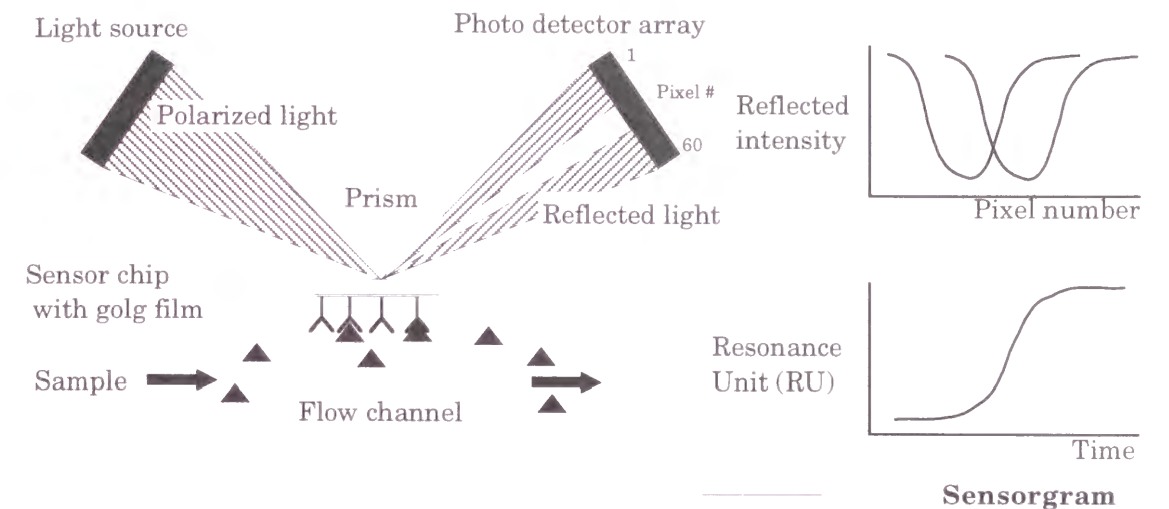
**Scheme 2** Synthesis of N-(bromoacetyl)-1-adamantanemethylamine. Reagents: Bromoacetyl succinimide, 1-Hydroxybenzotriazole, dry DMF, 0°C.

## 第二節 ホストゲスト二量体形成部位の熱力学的安定性の測定

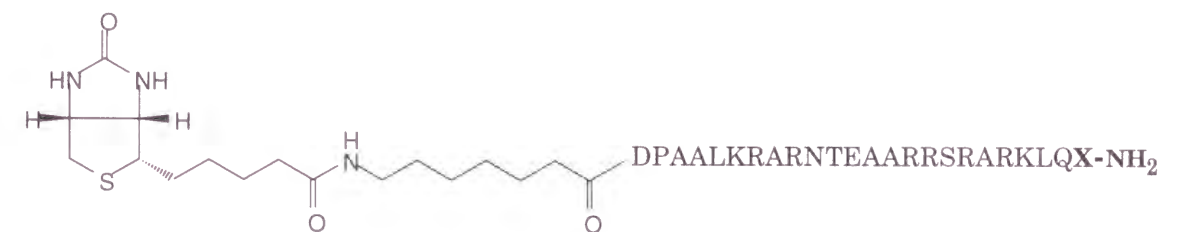
ここで用いた 5 種類のゲスト分子と $\beta$ -シクロデキストリンとの結合定数は、Eftink らによって報告されているが、GCN4 ペプチドへ導入したことによりそれらの値が変化している可能性がある。そこでまず、各ゲストペプチドと $\beta$ -シクロデキストリンをもつホストペプチドの 1 対 1 の複合体の解離定数、すなわち各ペプチド二量体における二量体形成部位の熱力学的安定性を測定した。

測定には、BIACORE 社の BIAcore 2000 を用いた。BIAcore システムは、金属表面に接触している溶液の濃度変化を、光の反射角度（屈折率）の変化として検出する表面プラズモン共鳴現象を応用して解析する（Figure 1-2）（31）。この測定機のセンサー部分では、ガラスの一方の表面に金属の薄膜が施してあり、その薄膜上に対象の分子が固定化される。この測定機は、センサー部分にガラス側から全反射する様々な角度の光を当てて、その反射光の強度が減少する入射光の角度を検出する。この光の減衰は、ガラス表面で生じるエバネッセント波と金属薄膜で生じる表面プラズモン波との波数の一致による共鳴から起こる。減衰する光の角度は金属薄膜の外側に接する溶液の屈折率、すなわち媒体濃度（濃度）に依存しているので、この角度の変化を追うことで、金属薄膜上に固定化されている分子に結合しているサンプル中の相手方の分子の物質量的変動を検出できるのである。この測定器では、屈折率の変化が SPR 信号（単位：RU、1 RU=1pg/mm<sup>2</sup>）の変化として検出される。

センサーチップには金属薄膜表面にリンカーを介してストレプトアビジンをコートしてある Sensor Chip SA を用いた。この表面にホストペプチドを固定化させるために、BG23Cd を合成した（Figure 1-3）。BG23Cd はホストペプチドと同様にカルボキシル末端に $\beta$ -シクロデキストリンを、N末端にビオチンを導入してある。そこでまず、BG23Cd 溶液を流路に加え、非常に安定なビオチン-ストレプトアビジン複合体形成を介してセンサーチップ上に固定化した。このとき BG23Cd の固定化量の異なる 2 つのセンサーチップを調製し、固定化量の違いの影響を検討した。次に、各ゲストペプチド溶液を加え、チップ上のホストペプチドとの結合



**Figure 1-2** The Principles of binding detection with the BIAcore instrument. The SPR phenomenon occurs in the gold film at the tip of a sensor probe. White light passed into the optical fibre of the probe is totally internally reflected at the surface interfaces. Binding events on the surface of the gold film cause changes in the refractive index close to the surface and the wavelength of the reflected light intensity minimum shifts. By monitoring the output spectrum of the reflected light this instrument is able to detect binding occurring at the probe surface.

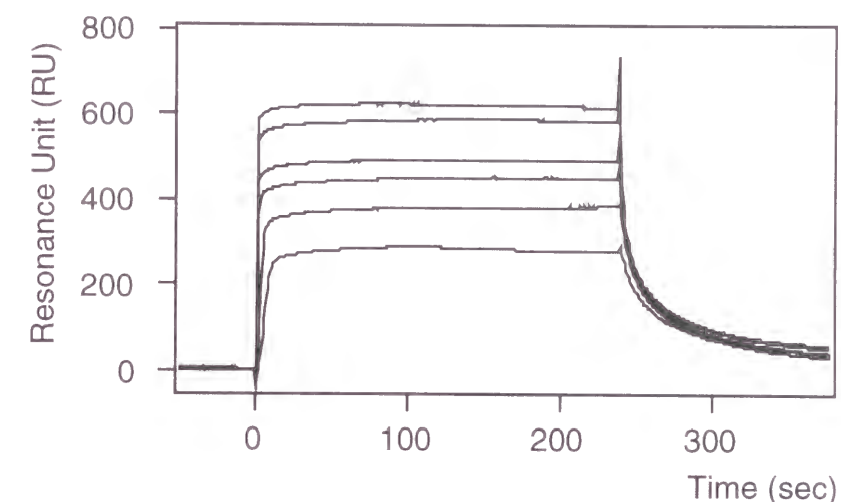


**Figure 1-3** The structure of BG23Cd. X corresponds to the  $\beta$ -cyclodextrin modified Cys residue.

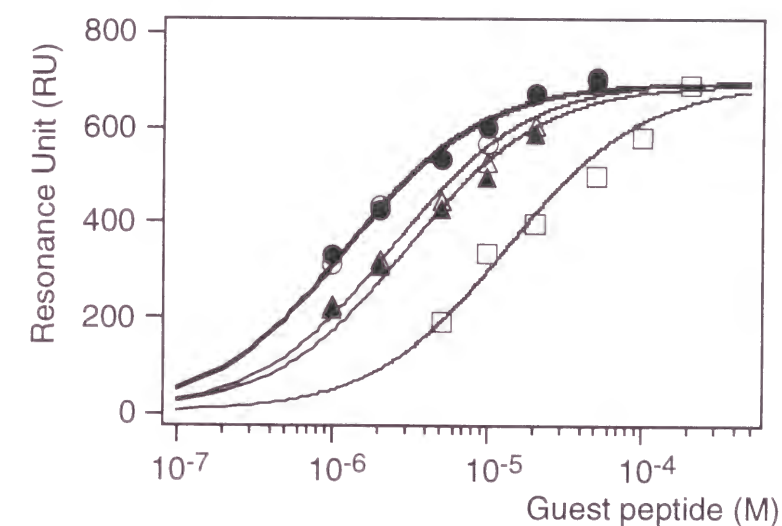
量を RU 値の変化量として検出した。測定時の温度は 10°C に保った。この RU 値には、センサー表面上の金属薄膜、リンカー部分、あるいはストレプトアビジンへのゲストペプチドの非特異的な吸着に起因する変化量もふくまれているので、これを見積もるために表面のストレプトアビジンをビオチン分子でキャッピングしたセンサーチップにゲストペプチド溶液を加えたときの RU 値の変化量も同時に測定した。

Figure 1-4 にアダマンタンを修飾したゲストペプチド溶液を、濃度を 6 点変化させて加えたときのセンサーグラムを示した。このセンサーグラムは、BG23Cd を固定化したセンサーチップにて得られたセンサーグラムから、ビオチン分子でキャッピングしたセンサーチップにて得られたセンサーグラムを差し引いたものである。すべてのゲストペプチドの場合で同様の操作をして得られたセンサーグラムをもとにこれ以降の解析を行なった。0 秒で流路にゲストペプチド溶液を加え、240 秒後に流路をトリス緩衝液（実験の部を参照）に交換した。6 種類の濃度すべてのセンサーグラムが、ゲストペプチド溶液を加えてから 50 秒後にはプラトーに達していることから、この時点でホストゲスト両分子間の結合反応が平衡状態となっていることが分かる。また、アダマンタン以外のゲスト分子を持つペプチド溶液を加えた場合でも、240 秒以内でホストペプチドとの結合反応は平衡に達した。

そこで、5 種類のゲストペプチドにおいて、ゲストペプチドの濃度に対して平衡時の RU 値をプロットした滴定曲線に対して、1:1 複合体形成の理論式（等式 1、実験の部参照）を最小二乗法でフィッティングを行ない（Figure 1-5）、それぞれの二量体形成部位の解離定数を算出した（Table 1-1）。これらの値は、BG23Cd 固定化量の異なるセンサーチップを用いた場合でも、ほとんど一致していた。アダマンタンと N-アダマンタンではほぼ等しい解離定数が、ノルアダマンタンとノルボルナンではアダマンタンと N-アダマンタンの場合の 2~2.5 倍、シクロヘキサンではアダマンタンの約 10 倍の解離定数が得られた。



**Figure 1-4** Sensorgram showing the interactions between G23Ad and G23Cd at various concentrations at 10 °C. Serial injections of G23Ad at concentrations from bottom 1, 2, 5, 10, 20, 50  $\mu$ M over the surface with G23Cd immobilized are shown.



**Figure 1-5** Comparison of the binding of G23Ad, G23NAd, G23NrA, G23Nb and G23Ch to G23Cd. The response at equilibrium was plotted versus the concentration for G23Ad/G23Cd (open circles), G23NAd/G23Cd (filled circles), G23NrA/G23Cd (open triangles), G23Nb/G23Cd (filled triangles) and G23Ch/G23Cd (open squares). The curves represent the titration binding isotherms calculated from equation 1 using the mean dissociation constants obtained from individual experiments (see Experimental Section).

### 第三節 二量体形成部位の熱力学的安定性と

#### 二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性の相関

前節において得られた、ホストペプチドと各ゲストペプチドの間の二量体形成部位の熱力学的安定性に関するデータをもとに、各二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性を比較することで、二量体形成部位の熱力学的安定性が二量体ペプチド-DNA 複合体形成に及ぼす影響について検討できる。

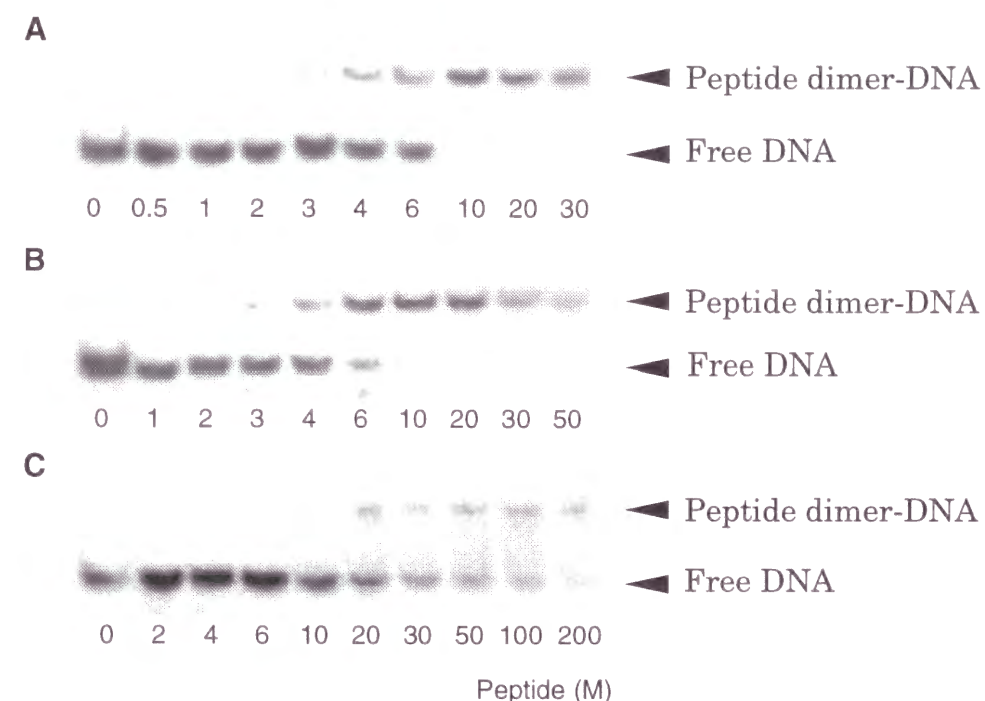
DNA は、GCN4 タンパク質の特異的認識配列 AP-1 (5'-ATGACTCAT-3') を含む 2 本鎖 DNA、AP20 を用いた。GCN4 タンパク質のベーシック・ロイシンジッパー DNA 結合ドメインは、DNA 相互作用部位である塩基性領域のカルボキシル末端にあるロイシンジッパー部分で二量化する (32-34)。過去の報告によると、GCN4 ペプチドの C 末端どうしを、ジスルフィド結合 (12, 35-37) や金属錯体 (19-21) で二量化させたペプチドも AP-1 配列に安定に結合する。また、 $\beta$ -シクロデキストリンとアダマンタンからなる二量体形成部位を有する GCN4 ペプチドが二量体で GCN4 の結合配列に特異的に結合することが示されている (13)。よって、ここで用いる 5 種類の二量体ペプチドも、カルボキシル末端に導入したホストゲスト両分子間で二量化するので、AP-1 配列に安定に結合すると期待した。

ペプチドの DNA 結合はゲルシフトアッセイによって調べた (38, 39)。ゲルシフトアッセイでは、5'末端を  $^{32}\text{P}$  放射標識した DNA を用いた。そして、反応溶液中のペプチドが結合している DNA と結合していない DNA を、ゲル電気泳動での移動度の違いを利用して分離し、それぞれの DNA の存在比を定量した。この定量は、ゲルに対する感光によって生ずる X 線フィルム上の各バンドの濃さを定量することにより行なった。

Figure 1-6 に、前節で求めた二量体形成部位の解離定数が異なる 3 種類の二量体ペプチドと、 $^{32}\text{P}$  で標識した AP20 DNA との結合をゲルシフトアッセイで調べた際の感光した X 線フィルムの図を示す。ホストペプチドおよび各ゲストペプチドを、AP20 DNA と共存させたところ、ここに示した 3 種類の全ての場合で、単量体ペプチドと DNA との複合体形成を經由せ

Guest Peptide	K d (M)
G23Ad	$1.34 \pm 0.25 \times 10^{-6}$
G23NAd	$1.32 \pm 0.19 \times 10^{-6}$
G23NrA	$2.68 \pm 0.42 \times 10^{-6}$
G23Nb	$3.09 \pm 0.47 \times 10^{-6}$
G23Ch	$1.47 \pm 0.33 \times 10^{-5}$

**Table 1-1** Equilibrium dissociation constants for the G23-guest/G23Cd complexes determined by the surface plasmon resonance technique.



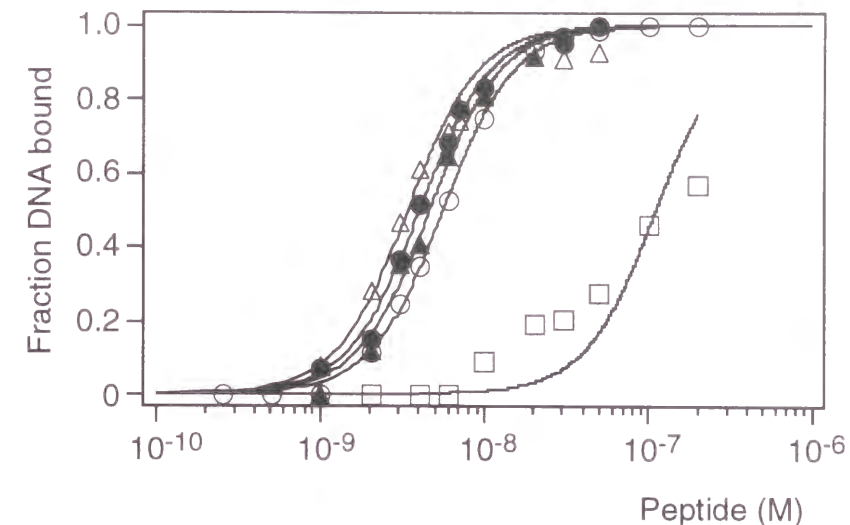
**Figure 1-6** Autoradiograms showing the electrophoretic mobility shift titrations of G23Ad/GCd (A), G23Nb/GCd (B), G23Ch/GCd (C) to AP20. Binding reactions were carried out as described in the experimental section.

ずに、協同的に二量体ペプチドと DNA の複合体が形成された。しかしアダマンタンおよびノルボルナンをもつ二量体ペプチドに比べて、シクロヘキサンの場合では、二量体ペプチドの DNA 結合量の変化がペプチド濃度の変化に対してなだらかであり、また、DNA 結合が飽和点に達しなかったことから、安定な二量体ペプチド-DNA 複合体は効率よく形成されていないと考えられる。

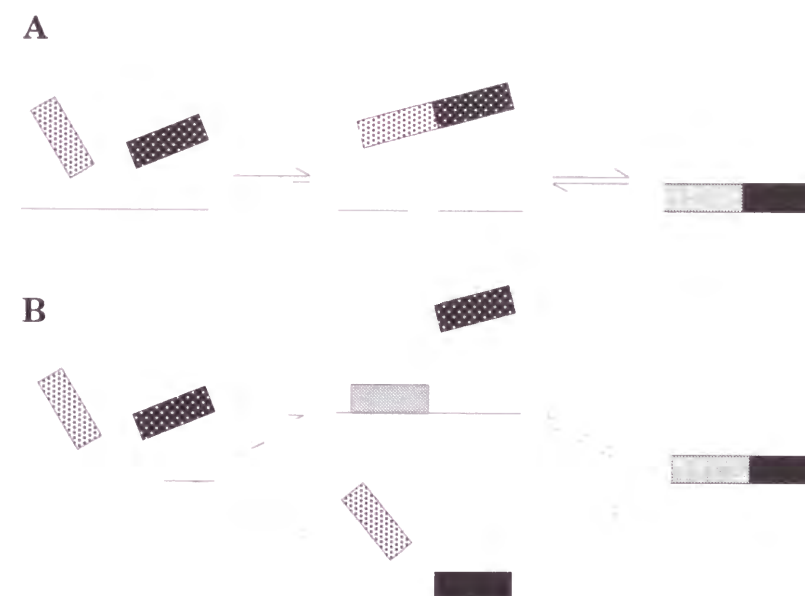
ゲルシフトアッセイから得られた滴定曲線 (Figure 1-7) に対して、2分子のペプチドが会合したのち1分子の DNA と結合するという平衡反応 (Figure 1-8 A) をもとにした理論式 (等式 17、実験の部参照) を用いてフィッティングを行い、各二量体ペプチドと DNA 複合体形成における自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) を求めた (Table 1-2)。第2節にて得られた解離定数を考慮すると、ゲルシフトアッセイで用いる  $10^{-9}$  から  $10^{-7}$  M のペプチド濃度では95%以上のペプチドが2量化せずに単独で存在しているので、ホストペプチドとゲストペプチドはそれぞれ別々に DNA に結合し、DNA 上で2量体を形成するという平衡式 (Figure 1-8 B) も考えられる。この結合様式は LexA タンパク質 (40) やベーシックロイシンジッパー型ドメイン (41, 42) の DNA 結合に関しても提唱されている。しかし、ゲルシフトアッセイにおいて二量体ペプチド-DNA 複合体由来のバンドしか観察されなかったことから、本研究では Figure 1-8 A の平衡式をもとにフィッティングを行なった。

ペプチド間の二量体形成部位の解離定数、 $K_{d1}$  に、第2節で求めた各二量体形成部位の解離定数を導入し、フィッティングで  $K_{d2}$  を求め、両解離定数をもとに単量体ペプチドが二量体ペプチド-DNA 複合体を形成する際の自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) を算出した (Table 1-2)。二量体形成部位の安定性が、解離定数で2から2.5倍、自由エネルギー変化で0.5 kcal/mol の差があった4種類の二量体ペプチドでは、AP20 への結合における自由エネルギー変化の違いも0.6 kcal/mol 程度であった。一方、これら4種類の二量体ペプチドと比べて、二量体形成部位の解離定数が5から10倍大きいシクロヘキサンを導入した二量体ペプチドでは、極端に AP20 DNA との複合体の安定性が低くなった。

以上の結果から、二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性は二量体ペプチド間の熱力学的安定性によって支配されているようである。GCN4 ペプチドを DNA 結合部位にもつ二量体ペプ



**Figure 1-7** Semilogarithmic plots show the fraction of  $^{32}\text{P}$ -labeled AP20 DNA bound to G23Ad/G23Cd (open circles), G23NAd/G23Cd (filled circles), G23NrA/G23Cd (open triangles), G23Nb/G23Cd (filled triangles) and G23Ch/G23Cd (open squares) as a function of peptide concentrations. The data points represent the average of three experiments. The sigmoidal curves represent the titration binding isotherms calculated from equation 17 using the mean dissociation constants obtained from individual experiments.



**Figure 1-8** Complex formation of peptide dimers and DNAs can be described by two kinds of pathways. Two kinds of rectangles show G23-guest and GCd peptides and lines correspond to DNAs. In the case of (A), peptide dimer formation precedes DNA binding of peptide monomers, and the order is reverse in (B).

チドが AP20 に安定に結合するためには、最低でもノルボルナンとβ-シクロデキストリンで構成される二量化部位の解離定数 ( $3.09 \times 10^{-6}$  M) 程度の熱力学的安定性が必要であることがわかった。しかしながら、さらに低い二量化部位の解離定数をもつアダマンタンや N-アダマンタンをもつ二量体ペプチドでは、AP20 DNA との複合体の安定性が増加するどころか少し減少していることから、二量化部位の熱力学的安定性が高ければ高いほど DNA との複合体が安定になるとは限らないことがわかった。

#### 第四節 塩基配列識別能

本節では、二量体形成部位の熱力学的安定性の異なる二量体ペプチドの塩基配列識別能を検討する。ここでは、第3節において AP20 DNA に安定に結合することが分かった4種類の二量体ペプチドのうち、二量体形成部位の解離定数が一番小さいアダマンタンと、一番大きいノルボルナンをもつ2種類について塩基配列識別能を比較した。

ここでは、AP-1 に変異を加えた塩基配列を含む2種類の DNA を用いた (Figure 1-9) 。AP-1 配列のまん中の GC 塩基対のとなりに CG 塩基対を挿入した CRE 配列 (5'-ATGACGTCAT-3')、および CRE 配列のまん中にさらに GC 塩基対を挿入した CGG 配列 (5'-ATGACGGTCAT-3') である。CRE 配列は AP-1 配列と共に、GCN4 タンパク質の特異的認識配列であり、GCN4 タンパク質は両塩基配列に同程度の親和性を有している (43-45)。CRE 配列は 10 塩基対からなる完全な回文配列であり、2つの GCN4 単量体ペプチドが特異的に認識する、5塩基対からなるハーフサイト配列を C2 対称に配した配列となっている。ハーフサイト配列の間の塩基対の数が異なる3種類の配列を有する DNA (AP20、CRE21、CGG22) を用いて二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性がどのように変化するかを調べることで、2種類の二量体ペプチドのハーフサイト間塩基配列の識別能を評価できると考えた。

ゲルシフトアッセイで求めた滴定曲線に対して、第2節で得られた二量体形成部位の解離定数および第3節と2:1複合体形成の理論式 (等式 17、実験の部参照) を用いてフィッティングを行い (Figure 1-10)、各二量体ペプチドと DNA 複合体形成における自由エネルギー

Peptide Dimer	$K_{d1}$ (M)	$K_{d2}$ (M)	$\Delta G$ (kcal/mol)
G23Ad/GCd	$1.34 \pm 0.25 \times 10^{-6}$	$2.32 \pm 0.06 \times 10^{-11}$	-20.9
G23NAd/GCd	$1.32 \pm 0.19 \times 10^{-6}$	$1.22 \pm 0.06 \times 10^{-11}$	-21.3
G23NrA/GCd	$2.68 \pm 0.42 \times 10^{-6}$	$4.31 \pm 0.47 \times 10^{-12}$	-21.5
G23Nb/GCd	$3.09 \pm 0.47 \times 10^{-6}$	$6.93 \pm 0.59 \times 10^{-12}$	-21.1
G23Ch/GCd	$1.47 \pm 0.33 \times 10^{-5}$	$8.48 \pm 2.77 \times 10^{-10}$	-17.6

**Table 1-2** Equilibrium dissociation constants  $K_{d1}$  and  $K_{d2}$  for the G23Ad/G23Cd, G23NA/G23Cd, G23Nb/G23Cd, G23NrA/G23Cd and G23Ch/G23Cd complexes with AP20.  $K_{d1}$  and  $K_{d2}$  are dissociation constants of peptide dimers and peptide dimer-DNA complexes, respectively.  $K_{d1}$  were determined by the surface plasmon resonance technique.  $K_{d2}$  were determined by electrophoretic mobility shift titrations.  $\Delta G$  were calculated for 277 K. All values reported represent the means of at least three determinations  $\pm$  SEM.

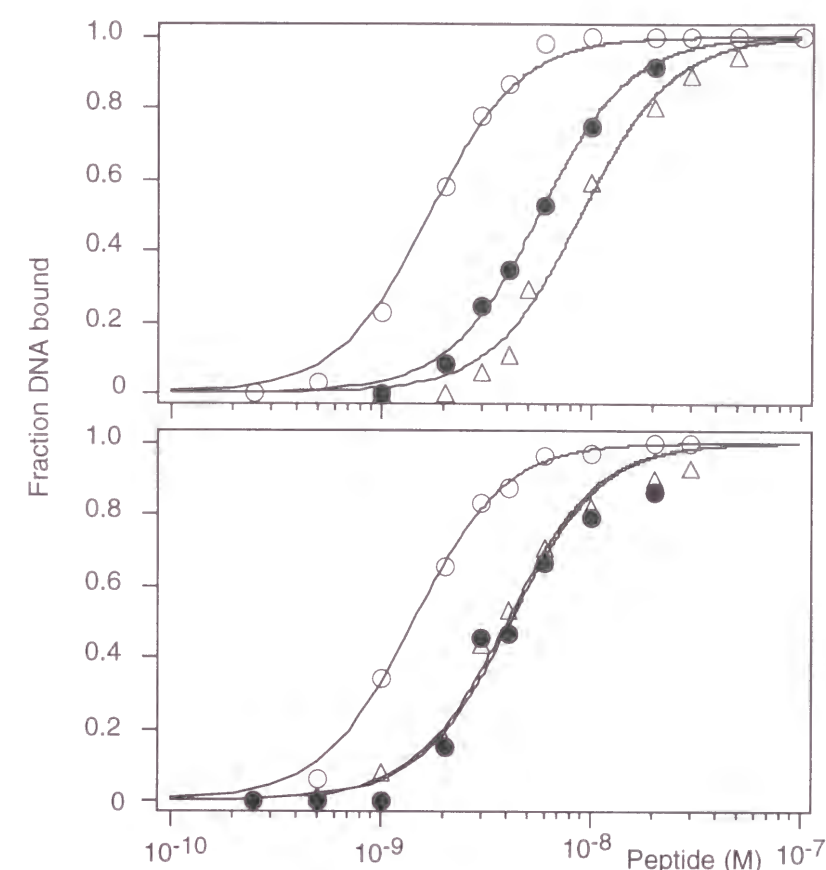
AP20 : 5'- CGG ATGAC TCAT TTTTTTTC -3'  
 CRE21 : 5'- CGG ATGACGTCAT TTTTTTTC -3'  
 CGG22 : 5'- CGG ATGACGGTCAT TTTTTTTC -3'

**Figure 1-9** Nucleotide sequences of the top strands of AP20, CRE21 and CGG22 DNAs.

変化 ( $\Delta G$ ) を求めた (Table 1-3)。そして、二量体ペプチドの塩基配列識別能を評価するために、AP20 との結合時の自由エネルギー変化に対する、CRE21 および CGG22 との結合時の自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G$ ) を算出した (Table 1-3)。アダマンタンあるいはノルボルナンを有する二量体ペプチドはともに CRE21 に最も強く結合した。CRE21 への結合における  $\Delta\Delta G$  は両方の二量体ペプチドの場合で等しかったのに対して、さらに変異を加えた CGG22 DNA への結合における  $\Delta\Delta G$  の値には有為な違いが確認された。

この結果は、二量体形成部位の熱力学的安定性の違いが、二量体ペプチドの塩基配列識別能に差を生じさせることを示唆している。またこの塩基配列識別能の差は、最も安定な CRE21 との複合体の安定性の差ではなく、それよりも不安定な CGG22 との複合体の安定性の差に起因していた。

ここで用いた二量体ペプチドはともに、AP-1 よりも CRE に対してより安定に結合していたが、この識別能の起源は何であろうか。天然の GCN4 タンパク質では両方の塩基配列に対してほぼ等しい安定性を示す (43-45)。また、これまでに多くのグループが、様々な二量体形成部位を導入した GCN4 二量体ペプチドを用いてこれら 2 種類の塩基配列に対する識別能を評価しているが、どちらの配列により安定に結合するかはそれぞれ場合で異なっている。ジヒドロフェナンスレン誘導体をもつ共有結合二量体ペプチドは、AP20 および CRE21 に対して、それぞれ  $3.5 \times 10^{-10}M$ 、 $2.5 \times 10^{-10}M$  の解離定数で結合する (17)。GCN4 ペプチドにグリシン-グリシン-システイン (Gly-Gly-Cys) のリンカーを導入して、ジスルフィド結合で連結させた二量体ペプチドも、CRE と AP-1 配列に対して同程度の親和性を示す (12, 19-21, 35)。一方、金属錯体を介して共有結合で二量化した GCN4 ペプチドは、AP-1 配列よりも CRE 配列に対してかなり高い特異性 ( $\Delta\Delta G=3.3$  kcal/mol) を有していた (19-21)。これらの報告を考慮すると、 $\beta$ -シクロデキストリンとゲスト分子からなる二量体形成部位における非共有結合という相互作用様式が、AP-1 配列よりも CRE 配列に対してより安定に結合することの原因ではないようである。むしろ、二量体形成部位の構造に依存した、2つのペプチドの配置や自由度、そしてペプチド間の距離という要因が原因であると考えの方が道理にあう。これは、 $\beta$ -シクロデキストリンとゲスト分子からなる包接化合物や遷移金属錯体といった、



**Figure 1-10** Semilogarithmic plots show the fraction of  $^{32}P$ -labeled CRE21 (open circles), AP20 (filled circles) and CGG22 (open triangles) bound to G23Ad/G23Cd (top) and G23Nb/G23Cd (bottom) as a function of peptide concentrations. The data points represent the average of three experiments. The sigmoidal curves represent the titration binding isotherms calculated from equation 17 using the mean dissociation constants obtained from individual experiments.

Peptide Dimer_DNA	$K_{d2}$ (M)	$\Delta G$	$\Delta\Delta G$
G23Ad/GCd_AP20	$2.32 \pm 0.06 \times 10^{-11}$	-20.9	-
_CRE21	$2.13 \pm 0.15 \times 10^{-12}$	-22.2	-1.3
_CGG22	$5.97 \pm 0.65 \times 10^{-11}$	-20.4	+0.5
G23Nb/GCd_AP20	$6.93 \pm 0.59 \times 10^{-12}$	-21.1	-
_CRE21	$6.68 \pm 0.39 \times 10^{-13}$	-22.4	-1.3
_CGG22	$4.76 \pm 0.46 \times 10^{-12}$	-21.3	-0.2

(kcal/mol; 277K)

**Table 1-3** Equilibrium Dissociation Constants  $K_{d2}$  and the Binding Free Energy for the G23Ad/G23Cd and G23Nb/G23Cd Complexes with AP20, CRE21 and CGG22.

比較的かさ高い二量体形成部位をもつ二量体ペプチドと、Gly-Gly-Cys リンカーやジヒドロフェナンスレン誘導体などの、構造も小さくかつ比較的自由度が高い二量体形成部位をもつ二量体ペプチドとでは、AP-1、CRE 両配列への識別能が異なっていることから支持される。

## 第五節

### 協同的相互作用エネルギーの起源

アダマンタンを導入した GCN4 単量体ペプチドと1つのハーフサイトを有する DNA (HS) の複合体の熱力学的安定性、 $\Delta G(\text{G23Ad-HS}) = -9.2 \text{ kcal/mol}$  ( $4^\circ\text{C}$ ) (11) と、ここで得られた二量体ペプチド-DNA 複合体の熱力学的安定性 ( $\Delta G(\text{G23guest-GCd-HS})$ ) をもとに、すべての二量体ペプチド-DNA 複合体の協同的形成に要する相互作用エネルギーを見積もった (Table 1-4)。これらの値をもとに、協同的な二量体ペプチド-DNA 複合体形成、そして二量体ペプチドの塩基配列識別能の起源を考察する。この協同的相互作用エネルギー ( $\Delta G_{\text{coop}}$ ) は、以下のように表される。

$$\Delta G_{\text{coop}} = \Delta G(\text{G23guest-GCd-HS}) - \Delta G(\text{G23guest-HS}) - \Delta G(\text{GCd-HS})$$

この計算の際、ホストペプチドとすべてのゲストペプチドは、等しい自由エネルギー変化 ( $\Delta G = -9.2 \text{ kcal/mol}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) でハーフサイト DNA に結合すると仮定した。ほとんどの複合体において、協同的相互作用エネルギー ( $\Delta G_{\text{coop}}$ ) は  $2.5\text{--}3.1 \text{ kcal/mol}$  の範囲に含まれていた (Table 1-4)。この値は、リプレッサー・タンパク質の協同的 DNA 結合 (8) やオリゴヌクレオチドの協同的な 3 重鎖形成 (46-51) の場合に得られた協同的相互作用エネルギーとほぼ等しいものであった。一方、第3節でも言及したように、シクロヘキサンを二量化部位にもつ二量体ペプチドと AP20 との複合体形成では協同的相互作用エネルギーが得られていないことから ( $\Delta G_{\text{coop}} = +0.8 \text{ kcal/mol}$ )、この系において安定な二量体ペプチド-DNA 複合体を協同的に形成するためには、 $7 \text{ kcal/mol}$  以上の  $\beta$ -シクロデキストリンとゲスト分子間の結合自由エネルギーが必要なようである。しかしこの値は、塩基配列認識部位として GCN4 の塩基性領域由来のペプチドを用いた場合であって、ハーフサイトとの親和性や塩基配列識別能の

	$\Delta G(\text{host-guest})^a$	$\Delta G(\text{coop})^b$	$\Delta G(\text{anti-coop})^c$
G23Ad/G23Cd/AP20	-7.4	-2.5	4.9
G23Ad/G23Cd/CRE21	-7.4	-3.8	3.6
G23Ad/G23Cd/CGG22	-7.4	-2.0	5.4
G23Nb/G23Cd/AP20	-7.0	-2.7	4.3
G23Nb/G23Cd/CGG22	-7.0	-2.9	4.1
G23Nb/G23Cd/CRE21	-7.0	-4.0	3.0
G23NAd/G23Cd/AP20	-7.5	-2.9	4.6
G23NrA/G23Cd/AP20	-7.1	-3.1	4.0
G23Ch/G23Cd/AP20	-6.1	0.8	6.9

**Table 1-4.** Estimated Cooperative Interaction Energy (kcal/mol) for Dimer-DNA Complexes. <sup>a</sup>  $\Delta G(\text{host-guest})$  were determined by the surface plasmon resonance technique as described in Experimental Section. <sup>b</sup>  $\Delta G(\text{coop})$  were determined as  $\Delta G(\text{G23guest-G23Cd-DNA}) - \Delta G(\text{G23Ad-HS}) - \Delta G(\text{G23Cd-HS})$  with  $\Delta G(\text{G23guest-G23Cd-DNA})$  values taken from Tables 1-2 and 1-3 and  $\Delta G(\text{G23Ad-HS}) = \Delta G(\text{G23Cd-HS}) = -9.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . <sup>c</sup>  $\Delta G(\text{anti-coop})$  were calculated as  $\Delta G(\text{coop}) - \Delta G(\text{host-guest})$ .



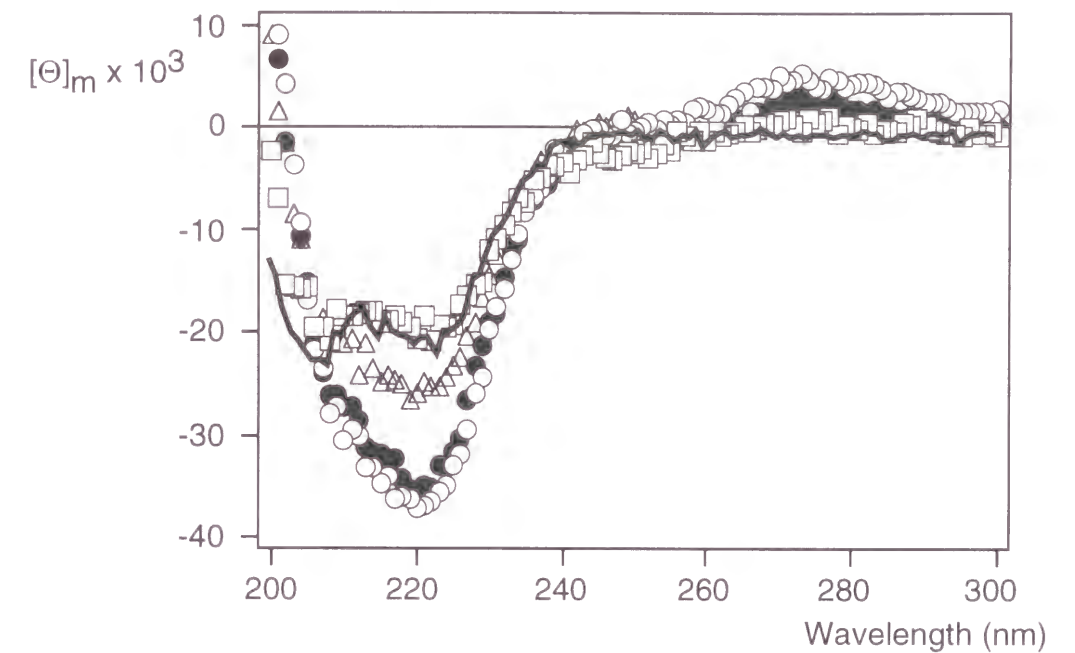
異なる、他のベーシックロイシンジッパータンパク質由来のペプチドを用いた場合には違う結果が得られるかもしれない。この点について明らかにするには、さらなる研究が必要である。

ここで用いた二量体ペプチド-DNA 複合体形成の系では、二量体形成部位であるホストゲスト錯体形成によって得られるエネルギー ( $\Delta G$  (host-guest); Table 1-4) が協同的相互作用エネルギーのもとになっているのだが、その大部分は失われている ( $\Delta G$  (anti-coop); Table 1-4)。この協同的結合を妨げる相互作用は何であろうか。

Schepartz らの報告によると、GCN4 二量体ペプチドによるハーフサイト間にある塩基対の数の識別には、ペプチド内の二量体形成部位が修飾されている付近が関与しているようである

(21)。GCN4 ペプチドは非特異塩基配列 DNA と相互作用してもヘリックス性の低い構造のままであるが、特異塩基配列 DNA と結合すると完全な $\alpha$ -ヘリックスを形成することが分かっている (12, 32-35, 52-55)。そこで、AP20, CRE21 ならびに CGG22 の3種類の DNA 上でのアダマンタンを持つ二量体ペプチド (G23Ad/GCd) のヘリックス性を円二色性偏光スペクトル測定によって調べてみた (Figure 1-11)。測定用の溶液にはペプチドが4  $\mu$ M、DNA が5  $\mu$ M それぞれ含まれているので、これまで得られている二量体ペプチド-DNA 複合体に関する熱力学的パラメーターから、溶液中のすべての二量体ペプチドは DNA 上に結合していることになる。全くランダムな塩基配列を持つ DNA (NON) を共存させても二量体ペプチドは全く構造変化しなかったが、CRE21 に結合した場合は、過去に GCN4 のベーシックロイシンジッパードメインペプチド (32, 52-55) や他の GCN4 ペプチド二量体 (12, 13, 19, 20, 35) の場合で観察されたような、ほぼ100%の $\alpha$ -ヘリックス構造が確認された。そして、この二量体ペプチド-DNA 複合体の安定性の順序は、それに対応する DNA に結合したときの二量体ペプチドのヘリックス性の順序と一致していた。いいかえれば、ヘリックス性の減少に伴い、 $\Delta G$  (anti-coop)の値が増加していた。この円二色性偏光スペクトル測定の結果と Schepartz らの報告から、ペプチド内の二量体形成部位が修飾されている付近で、 $\alpha$ -ヘリックス構造が変形していることが、二量体ペプチドの協同的 DNA 結合を妨げる要因の一つであると考えられる。

この $\alpha$ -ヘリックス構造の変形は、二量体ペプチドが DNA と結合する際に、(1) 2つの



**Figure 1-11** Circular dichroism difference spectra for G23Ad/G23Cd in the absence or presence of various DNA indicate that G23Ad/G23Cd is helical when bound to the CRE21, AP20 or CGG22 DNA. Spectra in the absence of DNA (solid line), and in the presence of CRE21 (open circles), AP20 (filled circles), CGG22 (open triangles), and NON (open squares). Spectra of the peptides in the presence of oligonucleotides were calculated as the difference between the bound spectrum and a spectrum of the respective free oligonucleotide. CD spectra were obtained as described in the Experimental Section.

ハーフサイト DNA 内の特定の面と2つの単量体ペプチド内の特定のアミノ酸との特異的な相互作用、および(2)二量化部位であるホストゲスト錯体形成という、3つの特異的相互作用から最大の安定化エネルギーを得るための結果であると考えられる。2つのハーフサイト間に塩基対が挿入された CGG22 のような場合は、変形する $\alpha$ -ヘリックス構造の範囲が広がるのに対して、ハーフサイト間が狭くなっている AP20 上では、ペプチドの末端同志の立体障害が生じるためにその部分での $\alpha$ -ヘリックス性が減少するのかもしれない。

第一章の研究では、本来注目していた二量体形成部位の熱力学的安定性が、二量体ペプチドの協同的 DNA 結合や塩基配列識別能を決定する重要な要因であることを示しただけでなく、DNA とは直接結合しない、二量体形成部位やそれを導入しているペプチドの末端付近の構造的要因も二量体ペプチドの塩基配列識別能に影響を及ぼすという興味深い知見が得られた。

## 第二章

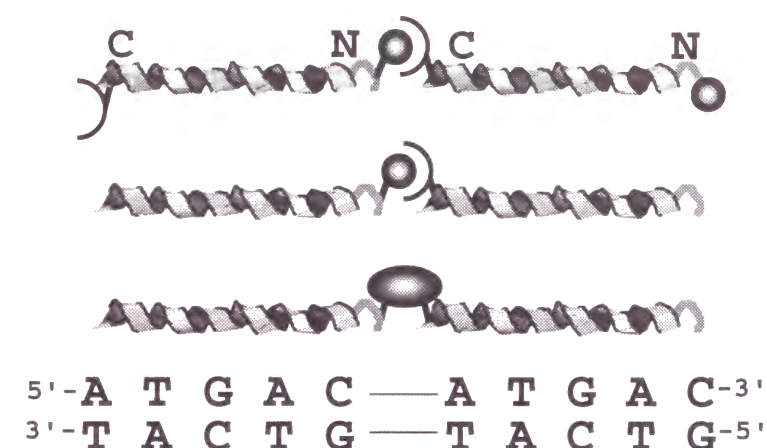
### 非共有結合および共有結合により二量体を形成したペプチドの DNA 塩基配列認識

特定の塩基配列部分を認識する際にみられる、タンパク質群-DNA 複合体の安定性は、各タンパク質-DNA 間、およびそれぞれのタンパク質間に存在する多くの会合平衡によって支配されている。一方で、単量体として塩基配列特異的に DNA に結合するタンパク質のほとんどは、同一ペプチド鎖内に複数の DNA 結合モジュールを有していることから、共有結合を介した多量体とみなすことができる。このように、多くの DNA 結合タンパク質は、共有結合あるいは非共有結合によるタンパク質間相互作用部位を有していると考えられる。では、これらタンパク質間の会合平衡の存在がタンパク質群による DNA 認識機構をどのように変化させるのであろうか。第 2 章では、この問題について追究するために、ホストゲスト相互作用によって二量化する非共有結合ペプチド二量体および有機銻型分子を介して二量化する共有結合ペプチド二量体を用いて、二量体ペプチドの DNA 結合における協同性、および塩基配列識別能が、単量体ペプチド間での会合平衡の有無によってどのように変化するかを検討する。

#### 第一節 非共有結合および共有結合二量体ペプチドの設計と合成

単量体ペプチド間の解離反応を失わせた場合の、二量体ペプチドの塩基配列識別能への影響を調べるために、1 種類の共有結合ペプチド二量体と 2 種類の非共有結合ペプチド二量体を設計した (Figure 2-1, 2-2)。すべてのペプチド二量体において、塩基配列認識部位として、ベーシック・ロイシンジッパータンパク質 GCN4 の塩基性領域由来のペプチドを共通に用いた。

二量化部位として、共有結合二量体ではジヒドロフェナンスレン誘導体を用いた (Figure 2-2)。このジヒドロフェナンスレン誘導体をもつ共有結合二量体は、GCN4 タンパク質と同



**Figure 2-1** Schematic representations showing the binding orientation of GAdCd (top), GAd/GCd (middle) and G<sub>2</sub>RDHP (bottom) dimers to a direct repeat of two GCN4 binding half-sites (T2). The helices denote the basic region peptides and N and C indicate the N-terminal and C-terminal of the peptide, respectively. Half-circles, filled spheres and a filled oval represent the artificial dimerization domains,  $\beta$ -cyclodextrin, the adamantyl group and 9,10-dihydrophenanthrene derivative, respectively.

様の塩基配列識別能をもつようにデザインされている (16-18)。ジヒドロフェナンスレン部分の、リンカーを介して GCN4 ペプチドを連結している 9 位と 10 位の水酸基に立体異性があり、これにより GCN4 ペプチドが GCN4 タンパク質内の塩基性領域部分と同様の空間配置に存在するように規制されている。

一方、非共有結合二量体ではβ-シクロデキストリンとアダマンタンからなるホストゲスト包接化合物を二量体形成部位として用いた (13, 26, 27)。アダマンタンを選んだ理由は、第 1 章でも示したように、DNA 結合部位として GCN4 ペプチドを有する二量体ペプチドが特定の塩基配列 DNA と結合するために必要な安定性を、二量体形成部位に与えることができるからである (13)。ここでは、DNA 結合ペプチドおよび二量体形成部位が同じである、二種類の非共有結合二量体を設計、合成した。異種二量体ペプチド (13, 26) はアダマンタンをもつペプチド (GAd) とβ-シクロデキストリンをもつペプチド (GCd) から、また同種二量体ペプチド (27) は同一の GCN4 ペプチド内にアダマンタンとβ-シクロデキストリンもつ GCN4 ペプチド (G2AdCd) 2 分子から構成されている (Figure 2-1)。G2AdCd のように 1 ペプチド内にホストゲスト両分子を修飾するためには、ゲスト分子をあらかじめ特定のアミノ酸の側鎖に導入しておいて、ホスト分子を固相合成および脱保護した後から化学修飾するのが得策である。ここでは、側鎖のε-アミノ基にアダマンタン酢酸を縮合した Fmoc リジン誘導体 Lys(Ad)を合成し、固相合成で GCN4 ペプチドに導入した後 (28)、ペプチド内のシステインに、6 位をヨウ素化したβ-シクロデキストリンを反応させて G2AdCd ペプチドを合成した。G2Ad や GCd でも、同様の手法でホストゲスト分子を導入した。また、同種二量体ペプチドではペプチド単量体が C 末端と N 末端で二量化するので、他の二量体でも同様の配向で二量化するように C 末端と N 末端にそれぞれの二量化部位を導入した。

同種二量体ペプチドを構成する GAdCd は、ペプチド両末端にホストゲスト分子をもつことから、分子内でホストゲスト錯体を形成した環状構造をとることが期待された (Figure 2-3)。そしてこの仮説は円二色性偏光 (CD) スペクトル測定によって証明された (Figure 2-4)。アダマンタンしかもたない GAd が、その CD スペクトルが 222 nm 付近で [θ] 値が -26000 (deg cm<sup>2</sup> / dmol) 程度の極小値をもつことから、部分的にα-ヘリックス構造をとっている

**GAdCd:** Ac-DXAALKRARNTAARRSRARKLQZ-NH<sub>2</sub>

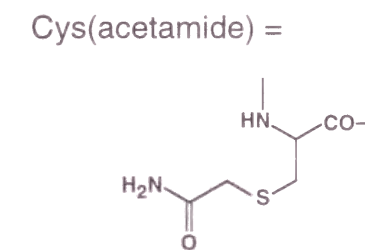
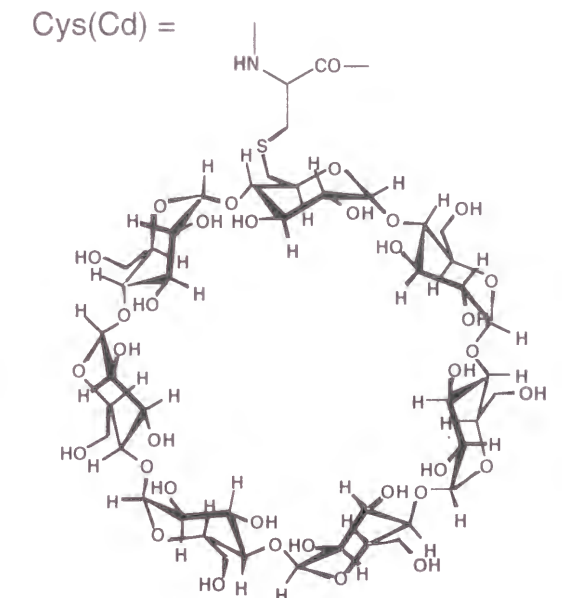
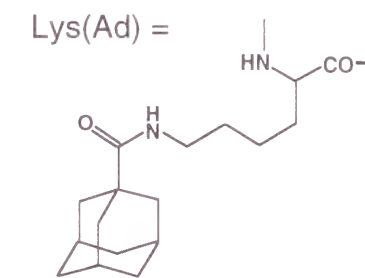
X = Lys(Ad), Z = Cys(Cd)

**GAd:** Ac-DXAALKRARNTAARRSRARKLQZ-NH<sub>2</sub>

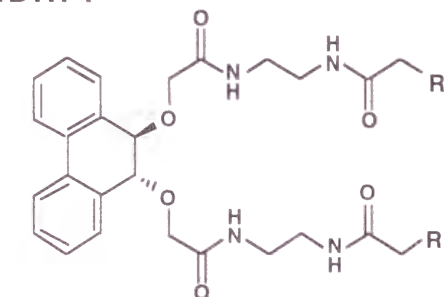
X = Lys(Ad), Z = Cys(acetamide)

**GCd:** Ac-DXAALKRARNTAARRSRARKLQZ-NH<sub>2</sub>

X = Pro, Z = Cys(Cd)



**G<sub>2</sub>RDHP:**



**R<sub>1</sub>** = Ac-DPAALKRARNTAARRSRARKLQC-NH<sub>2</sub>

**R<sub>2</sub>** = Ac-CPAALKRARNTAARRSRARKLQ-NH<sub>2</sub>

**Figure 2-2** Structures and amino acid sequences for the basic region peptide dimers with covalent (G<sub>2</sub>RDHP) and noncovalent (GAd/GCd and GAdCd) dimerization domains. Abbreviations for the amino acid are: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; K, Lys; L, Leu; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr.

のに対して、GAd に $\beta$ -シクロデキストリンを導入した GAdCd は、222 nm 付近で-10000 (deg cm<sup>2</sup> / dmol) 程度の吸収しか示さないことから、GAd よりも $\alpha$ -ヘリックス性が低い構造をとっていることがわかる。この GAdCd 溶液をアダマンタン酢酸で滴定したところ、アダマンタン酢酸の濃度が高くなるにつれて、CD スペクトルの 220 nm 付近での吸収が増加し、かつスペクトルの形状が GAd ペプチドのものに近づいてきた。この結果は、溶液中に加えたアダマンタン酢酸と GAdCd ペプチドの $\beta$ -シクロデキストリンとの間でホストゲスト錯体が形成すると、GAdCd ペプチドの $\alpha$ -ヘリックス性が増加することを反映しており、GAdCd ペプチドが環状構造と部分的 $\alpha$ -ヘリックス構造の間で平衡状態にあること、そしてその平衡が環状構造の方に大きく偏っていることを示唆している (Figure 2-4 B)。この GAdCd ペプチドが二量体で DNA に結合するためには、環状構造から分子内錯体を解離した状態へ構造を変化させる必要があるのに対して、異種二量体ペプチドを形成する G23Ad/GCd ペプチドは、溶液中で部分的 $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていることから、この 2 種類の非共有結合二量体を用いることで、単量体ペプチドの構造変化という要因が二量体ペプチドの塩基配列識別能におよぼす影響を明らかにできる。

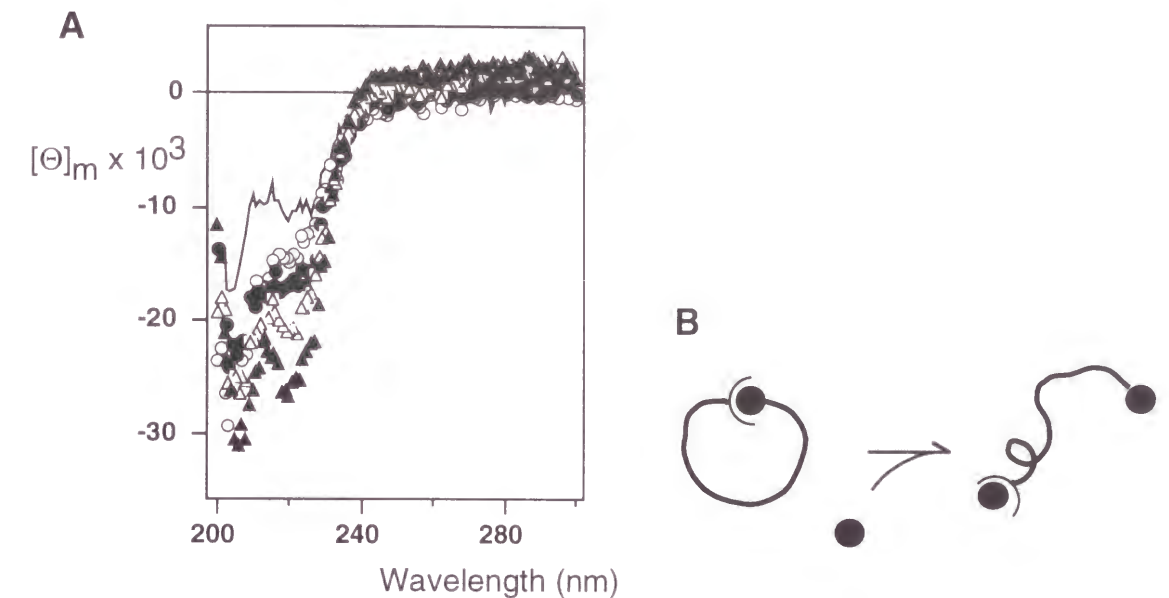
次節では、同じ DNA 結合ペプチドをもちながら二量化部位だけが異なるこれら 3 種類のペプチド二量体の塩基配列認識を比較することで、二量化という平衡反応が存在する場合、さらに二量化に伴うペプチドの構造変化の平衡反応が存在する場合に、二量体ペプチドの塩基配列識別能がどのように変化するかについて検討した。

## 第二節 二量体形成部位の解離平衡と二量体ペプチドの塩基配列識別能の相関

3 種類の共有結合および非共有結合ペプチド二量体の塩基配列識別能を調べるために、4 種類の塩基配列 DNA を用意した (Figure 2-5)。第 1 章で用いた、カルボキシル末端どうしで二量化するペプチド二量体は、回文配列 CRE (5'-ATGAC GTCAT -3') を特異的に認識した。その際、各単量体は 5'-ATGAC-3' の 5 塩基対からなるハーフサイトを特異的に認識していると考えられるので、本章で用いる N 末端と C 末端で二量化するペプチド二量体は 5'-ATGAC



**Figure 2-3** A schematic representation illustrating that GAdCd can form two types of structures, the intramolecular inclusion complex and a partial  $\alpha$ -helix. Half-circles and filled ovals represent  $\beta$ -cyclodextrin and the adamantyl group, respectively.



**Figure 2-4** (A) Circular dichroism difference spectra for GAdCd in the absence or presence of 1-adamantaneacetic acid: spectra of GAdCd in the absence of 1-adamantaneacetic acid (solid line) and in the presence of 10 mM (open circles), 100 mM (filled circles), and 500 mM (open triangles) 1-adamantaneacetic acid and the spectrum of GAd (filled triangles). CD spectra were obtained as described in the Experimental Section. (B) A schematic representation showing that the intramolecular inclusion complex dissociates in the presence of 1-adamantaneacetic acid.

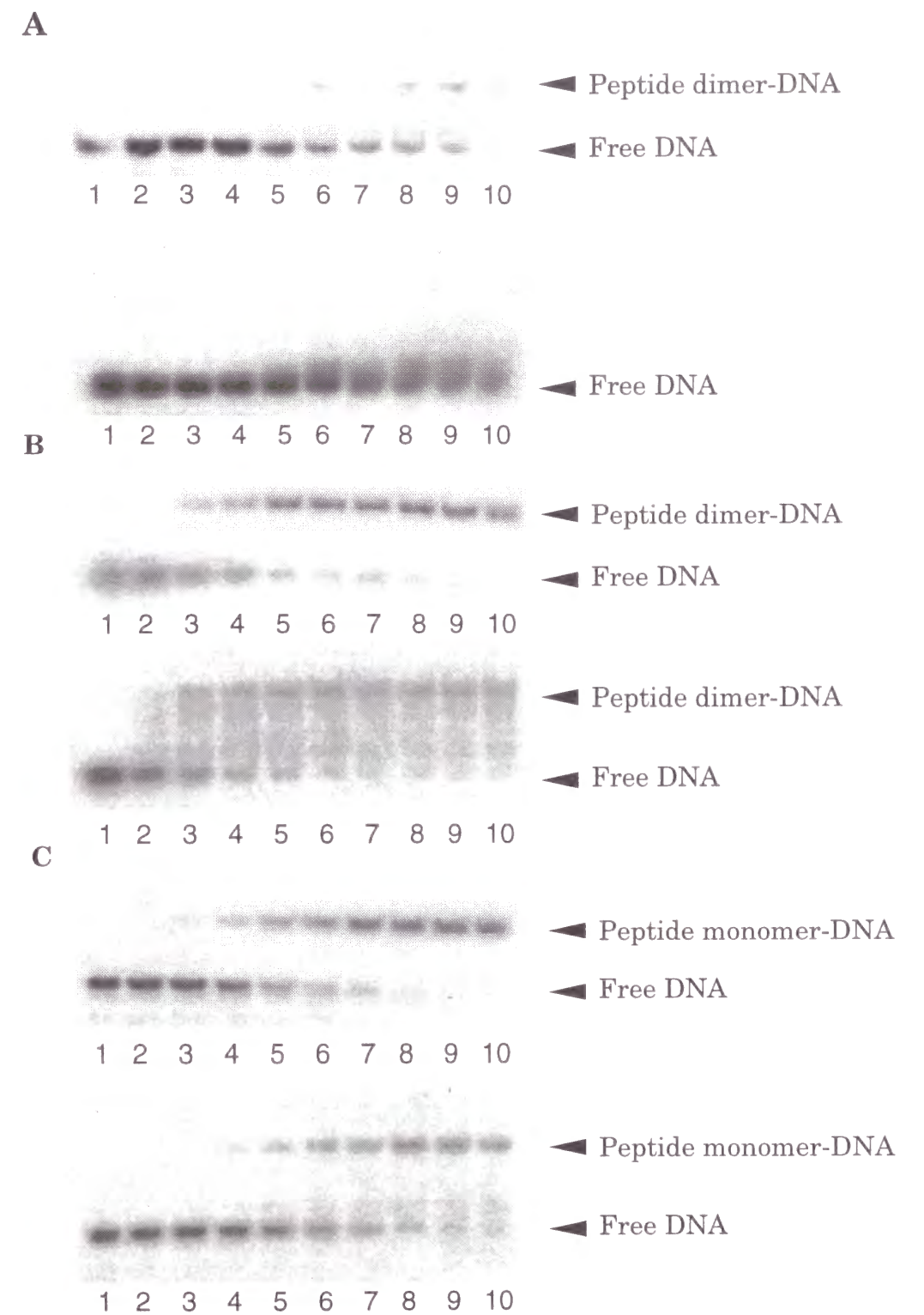
**T2:** 5'-CGGATGACATGACTTTTTTTC-3'  
**G3A:** 5'-CGGATGACATAACTTTTTTTC-3'  
**HS:** 5'-CGGATGACACTGCTTTTTTTC-3'  
**T2S:** 5'-CGGATGACCATGACTTTTTTTC-3'

**Figure 2-5** A specific DNA sequence for peptide dimers consisting of a direct repeat of two GCN4 binding half-sites (T2) and its mutated DNA sequences (G3A, HS, T2S). G3A and HS contain mutations within the half-site of 1 and 3 base pairs, respectively. T2S possesses an additional base-pair between two half-sites.

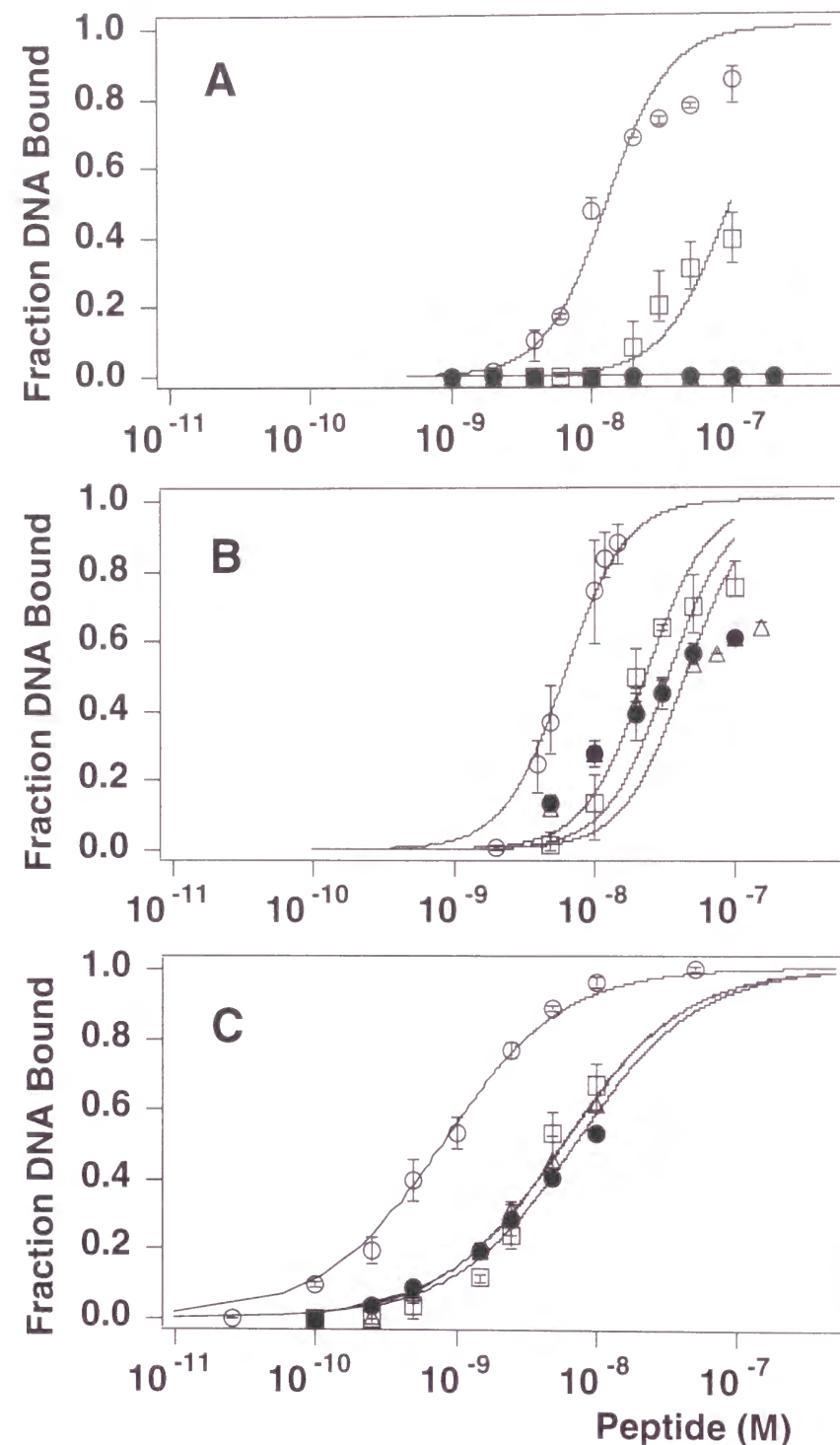
ATGAC -3'という繰り返し配列 (T2 配列) に対して安定に結合すると期待される。このことは、GCN4 ペプチドの N 末端と C 末端をジスルフィド結合で連結した多量体ペプチドがこの繰り返し配列に安定に結合したという、Goddard らの報告からも支持される (36, 37, 41)。この T2 配列を含む T2 DNA に加えて、T2 配列に変異を加えた 3 種類の塩基配列を含む DNA を設計した。G3A と HS はそれぞれ、T2 配列の 1 つのハーフサイト内に 1 あるいは 3 塩基対の変異をもつ配列、そして T2S は T2 配列のハーフサイト間に 1 塩基対を挿入した配列である。前者は、二量体ペプチド内のペプチド部分が直接接して認識する DNA 部分において、後者は、第 1 章で言及したように、二量体形成部位によって直接結合せずに間接的に認識されている部分において、それぞれ変異をもつ配列となっている。これら性格の異なる変異をもつ塩基配列 DNA とそれらの原形の T2 DNA を用いて、各二量体ペプチドの塩基配列識別能を評価した。

第 1 章と同様にゲルシフトアッセイによって、3 種類の二量体ペプチドと 4 種類の塩基配列 DNA の組み合わせから得られる、12 種類の二量体ペプチド-DNA 複合体形成を調べた (Figure 2-6)。この実験を 3 回以上繰り返し、その結果得た平均値をもとに滴定曲線をプロットした (Figure 2-7)。これら滴定曲線をもとに各 DNA に対する二量体ペプチドの親和性を比較すると、当初の期待通り、すべての二量体ペプチドが、T2 DNA に対してもっとも安定に結合し、それに変異を加えた DNA に対しては T2 DNA よりも低い親和性を示していたことから、これら 4 種類の塩基配列 DNA を用いて 3 種類の二量体ペプチドの塩基配列識別能を評価できると考えた。T2 DNA の変異配列の中でも、ハーフサイト内に変異を持つ 2 種類の DNA (HS と G3A) に対して、非共有結合二量体のうち同種二量体が、ここで調べたペプチド濃度範囲では全く結合を示さないという顕著な例もみられたが、この点については後に述べる。

これら滴定曲線の形状を比較すると、傾きの程度に違いがあることがわかる。全体の傾向として、2 種類の非共有結合二量体がともに、共有結合二量体よりも狭いペプチド濃度の範囲で各 DNA に対する結合がほぼ完了していた。すなわち、二量化という平衡反応の存在によって、二量体ペプチドによる DNA 結合の ON/OFF を達成させるのに必要なペプチドの濃度変化の範囲が小さくなることが示された。実際、転写や複製などの ON/OFF も、それに関与する



**Figure 2-6** Autoradiograms showing the electrophoretic mobility shift titrations of GAdCd (A), GAd/GCd (B), and G<sub>2</sub>RDHP (C) to T2 (top) and G3A (bottom). Binding reactions were carried out as described in the Experimental Procedures. (A) No G<sub>2</sub>AdCd was added to the reaction in lane 1. G<sub>2</sub>AdCd concentrations in lane 2-9 (top), respectively, were 1, 2, 4, 6, 10, 20, 30 and 50 nM for T2, and in lane 2-9 (bottom), respectively, were 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 and 150 nM in the case of binding to G3A. (B) No peptide was added to the reaction in lane 1. Concentrations of G<sub>2</sub>Ad/GCd in lane 2-9 (top), respectively, were 0.5, 1, 1.5, 3, 5, 7.5, 10 and 20 nM for T2, and in lane 2-9 (bottom), respectively, were 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 and 150 nM for G3A. (C) No G<sub>2</sub>RDHP was added to the reaction in lane 1. Concentrations of G<sub>2</sub>RDHP in lane 2-10 (top), respectively, were 0.025, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 nM for T2, and in lane 2-10 (bottom), respectively, were 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 7.5 and 10 nM for G3A.



**Figure 2-7.** Semilogarithmic plots showing the fractions of  $^{32}\text{P}$ -labeled T2 (open circles), G3A (filled circles) and HS (open triangles), bound to the GAdCd (**A**) GAd/GCd (**B**) and  $\text{G}_2\text{RDHP}$  (**C**) dimers as a function of peptide concentration. The solid curves represent the best fit for the titration data obtained as described in Experimental Procedures.

タンパク質のごくわずかな濃度変化によっておこなわれていることから、今回の二量体ペプチドを用いた実験結果から、生体内制御の鋭敏さが、複数のタンパク質間の非共有結合相互作用に起因することが示唆された。

この滴定曲線の傾きの違いは、二量体ペプチドの塩基配列識別能を決定する要因の一つである。3種類の二量体ペプチドが、80%の T2 DNA に結合するのに必要なペプチド濃度において、変異配列 DNA にどの程度結合するかを比較してみると、共有結合二量体および異種二量体ではすべての変異配列に対してそれぞれ 30% および 20%、そして同種二量体では、T2S DNA に対しては 20%、HS DNA および G3A DNA に対しては 0% であった。これらの数値の比較から、非共有結合二量体の方が塩基配列識別能が高いことが示唆された。

滴定曲線に対してそれぞれの複合体形成の理論式をフィッティングして、自由エネルギー変化を算出した (Table 2-1)。フィッティングの際、共有結合二量体の場合は 1 対 1 複合体形成の平衡式 A に基づく等式 21、非共有結合異種二量体の場合は 1 対 1 対 1 の複合体形成の平衡式 B に基づいた等式 17、そして非共有結合同種二量体の場合は 2 対 1 の複合体形成の平衡式 C に基づいた等式 34 をそれぞれ用いた (実験の部参照) (Figure 2-7)。得られた値をもとに、最も安定な複合体を形成する T2 DNA における自由エネルギー変化とその各変異配列 DNA における自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G_{\text{HS}}$ ,  $\Delta\Delta G_{\text{G3A}}$ ,  $\Delta\Delta G_{\text{T2S}}$ ) を算出し、比較することで、各二量体ペプチドの塩基配列識別能を検討した (Table 2-2)。同種二量体ペプチドは HS DNA と G3A DNA に対して、ペプチド濃度を 200 nM まであげても全く結合が確認されなかったため、これら複合体が形成される時の自由エネルギー変化を、200 nM で 50% の DNA が二量体ペプチドと結合した場合の  $\Delta G$  ( $= -17.8 \text{ kcal/mol}$ ) 以上の値とした。

共有結合二量体と 2 種類の非共有結合二量体では、すべての変異配列 DNA で後者の方が高い自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G$ ) を示した。この結果と、滴定曲線の傾きの違いから、二量体形成が平衡反応によって支配されている方が、二量体ペプチドの塩基配列識別能が高くなると思われる。しかし、第 1 章で得られた結論を考慮すると、二量体形成部位の構造の違いがここでの二量体ペプチドの塩基配列識別能の差に影響をおよぼしている可能性がある。また、これまでのタンパク質 (24)、ペプチド (19-21、27) ならびに合成ポリアミド (56) の多

Peptide Dimer	$\Delta G$ (kcal/mol; 277K)			
	T2	G3A	HS	T2S
G <sub>2</sub> RDHP	-11.5	-10.4	-10.3	-10.4
GAd/GCd	-20.8	-18.5	-18.9	-19.3
GAdCd	-20.0	>-17.2	-20.4	-17.9

**Table 2-1** Free energy change associated with head-to-tail dimer complex formation for GAdCd, GAd/GCd, and G<sub>2</sub>RDHP with T2, G3A, HS, and T2S.  $\Delta G$  were calculated for 277 K.

Peptide Dimer	Selectivity (kcal/mol; 277K)		
	$\Delta\Delta G_{G3A}$	$\Delta\Delta G_{HS}$	$\Delta\Delta G_{T2S}$
G <sub>2</sub> RDHP	1.1	1.2	1.1
GAd/GCd	2.3	1.9	1.5
GAdCd	>2.8	>2.8	2.1

**Table 2-2** Differences of free energy change associated with head-to-tail dimer complex formation for GAdCd, GAd/GCd, and G<sub>2</sub>RDHP with G3A, HS, and T2S for T2.

量体と DNA との相互作用に関する研究からも、DNA 結合部位を連結するリンカー部分は複合体全体の安定性を大きく左右する要因であることが報告されている。ところが、二量体形成部位の構造の違いの影響が最も反映すると推測されるハーフサイト間への 1 塩基対挿入による自由エネルギー変化の差 ( $\Delta\Delta G_{T2S}$ ) が共有結合二量体では、1.1 kcal/mol、非共有結合異種二量体では 1.5 kcal/mol と、その差が 0.4 kcal/mol しかなかった。第 1 章の結果では、この 2 種類の二量体ペプチドと同様の GCN4 ペプチドを DNA 結合部位にもつ G23Ad/GCd ペプチド二量体では、AP20 と CRE21 との間での自由エネルギー変化の差が 1.3 kcal/mol、CRE21 と CGG22 との間では 1.8 kcal/mol であり、G23Nb/GCd 二量体の場合でもそれらの値が 1 kcal/mol 以上であったため、今回もこの程度の値になると推測していたが、実際はその半分以下であった。また、この 0.4 kcal/mol という値は、共有結合二量体と非共有結合異種二量体との間の  $\Delta\Delta G_{HS}$  の差 (2.3-1.1=1.2 kcal/mol)、や  $\Delta\Delta G_{G3A}$  の差 (1.9-1.2=0.7 kcal/mol) よりも小さいものであり、仮に二量体形成部位の構造の違いが二量体ペプチドの塩基配列識別能の差に有為に影響をおよぼしているならば、前者の値の方が大きくなるとも考えられる。以上の議論をもとにすると、ペプチドが今回のように N 末端と C 末端で二量化している場合、二量体形成部位の構造の違いが二量体ペプチドの塩基配列識別能に大きく影響をおよぼさないと推測されるが、この点については同じ構造の二量体形成部位をもつ共有結合および非共有結合二量体を用いてさらに検討する必要があるだろう。

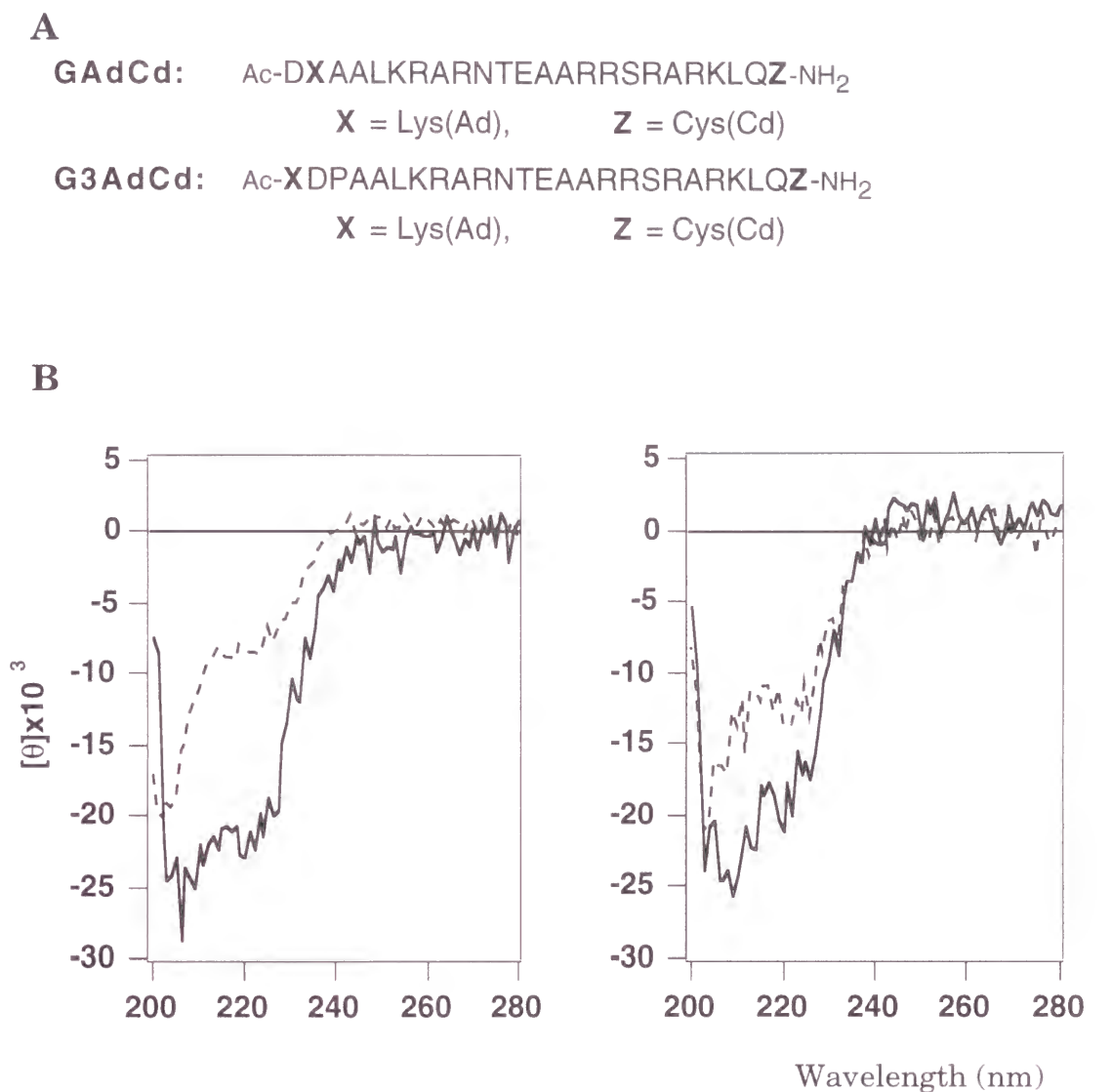
2 種類の非共有結合二量体のうち、滴定曲線の比較から明らかであったように、同種二量体はハーフサイト内の変異に対して抜群に高い識別能をもつことが、 $\Delta\Delta G$  の値からも示された。この結果から、二量体形成という平衡反応に加えて、ペプチドの構造変化という別の平衡反応を存在させることで、二量体ペプチドの塩基配列識別能が劇的に上昇することが明らかとなった。



### 第三節 ペプチドの構造変化と二量体ペプチドの塩基配列識別能の相関

前節では、二量体形成に伴うペプチド単量体の構造変化という別の平衡反応を存在させることで、二量体ペプチドが、ペプチド部分が直接結合するハーフサイト内の1塩基対の変異に対しても高い識別能を発揮するという、興味深い知見が得られた。では、この構造変化の平衡の偏り、すなわち環状構造の安定性が変わること、ペプチド二量体の塩基配列識別能は変化するのであろうか。

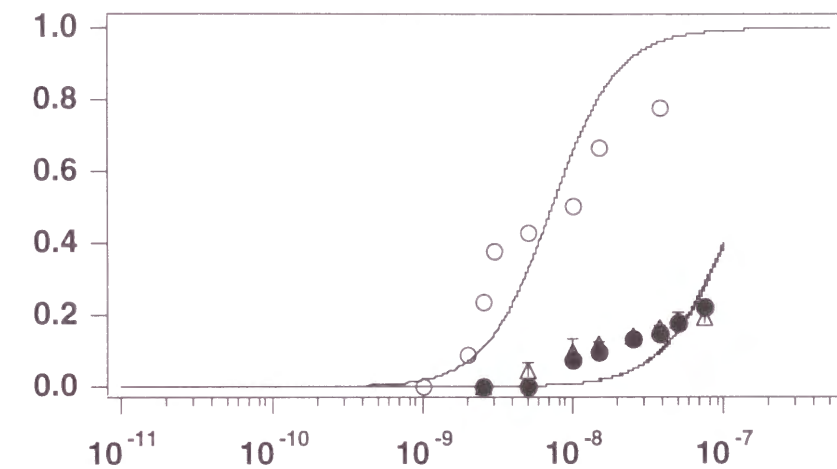
この点について検討するために、G3AdCd ペプチドを設計、合成した (Figure 2-8 A)。G3AdCd も GCN4 ペプチドの N 末端にアダマンタン、C 末端にβ-シクロデキストリンを有するので、GAdCd と同様に、環状構造と部分的α-ヘリックス構造の間で平衡状態にある。G3AdCd では、GAdCd とは2残基分ずれた位置にアダマンタンを側鎖にもつリジンが導入されているのだが、その結果、GAdCd の場合よりも構造変化の平衡反応が部分的α-ヘリックス側に偏っていた。このことは、この2種類のペプチドと、そこからβ-シクロデキストリンを除いた構造をもつペプチド (GAd および G3Ad) の CD スペクトルを測定することによってわかった (Figure 2-8 B)。CD スペクトルの 220 nm での[θ] 値の絶対値と、その波長付近でのスペクトル形状から溶液中のペプチド構造のヘリックス性を評価できる。G3AdCd の CD スペクトルは、222 nm 付近でヘリックス構造特有の極小値をもち、ペプチドのヘリックス性の指標となる 222 nm での[θ] 値の絶対値が 13000 程度であるのに対して、GAdCd ではスペクトル形状が同様の波長付近で水平になってはいるが下向きのカーブにはなっておらず、222 nm での[θ] 値の絶対値も 8000 程度しかなかった。この 222 nm での[θ] 値の差は、両ペプチドの環状構造のヘリックス性、部分的α-ヘリックス構造のヘリックス性、そして両構造の存在比率に依存するのだが、23 残基のペプチドである GAdCd と G3AdCd の環状構造にはほとんどヘリックス性はないと考えられる。また、β-シクロデキストリンを除いた構造をもつペプチド (GAd および G3Ad) は 222 nm においてほぼ等しいθ値を示したことから、GAdCd と G3AdCd の部分的α-ヘリックス構造のヘリックス性は同程度であると考えられる。よって、GAdCd と G3AdCd の 222 nm での[θ] 値の差は、環状構造と部分的α-ヘリックス構造の存



**Figure 2-8** (A) Structures and amino acid sequences for GAdCd and G3AdCd. (B) Circular dichroism spectra of GAd and GAdCd (left), and G3Ad and G3AdCd (right). Spectra of the basic region peptides possessing only the adamantyl group (GAd and G3Ad, solid lines) and both β-cyclodextrin and the adamantyl group (GAdCd and G3AdCd, broken lines).

在比率を反映しているといえる。ここで新たに合成した G3AdCd の構造変化の平衡は、GAdCd よりも部分的 $\alpha$ -ヘリックス側に偏っていることが示されたわけである。

次に G3AdCd と GAdCd の塩基配列識別能を比較した (Figure 2-9) 。ここでも、第 2 節で用いた 4 種類の塩基配列 DNA について検討した。T 2 DNA に対しては、両ペプチド二量体とも同程度の親和性を示したが、GAdCd が全く結合しなかったハーフサイト内に変異をもつ HS DNA や G3A DNA に対して G3AdCd は二量体で結合していた。以上の結果から、GAdCd 二量体ペプチドの高い塩基配列識別能の起源は、ペプチドの構造変化という平衡反応が存在することに加えて、構造変化する前の環状構造の安定性が高いことであることがわかった。



**Figure 2-9** Semilogarithmic plots showing the fractions of  $^{32}\text{P}$ -labeled T2 (open circles), G3A (filled circles) and HS (open triangles) bound to the G3AdCd dimer as a function of peptide concentration. The solid curves represent the best fit for the titration data obtained as described in Experimental Procedures.

## 総括

本研究では生体分子間の識別能を支える要因を探求することを目的とした。この識別の過程で、複数の生体分子による協同的な複合体形成みられることから、協同的複合体形成を支配する要因について知ることは、生体分子間の識別機構を理解する上で基礎的な知見を提供すると考えられた。そこで筆者は、協同的複合体形成をともなう生体分子間の識別について調べるために、天然の生体分子間の相互作用に存在する複雑な要因を含まない一方で、天然の生体分子と同等の分子認識能を有する分子群として、2つの DNA 結合ペプチドにホストゲスト相互作用を導入した二量体ペプチドを設計した。本研究では、この非共有結合ペプチド二量体に加えて、有機鋳型分子を二量体形成部位に有する共有結合ペプチド二量体について、DNA との複合体形成を調べることで、(1) 二量体形成部位の熱力学的安定性および(2) 二量化部位の会合平衡が、ペプチド二量体-DNA 複合体形成時にみられる協同性、および二量体ペプチドの塩基配列識別能にどのような影響を及ぼしているかについて検討した結果、以下のような興味深い知見を得た。

### 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 (57)

二量体ペプチドでは、ペプチドに導入するゲスト分子の種類を変えることで、二量体形成部位の安定性が異なる二量体ペプチドを得ることができる。本研究では 5 種類の二量体ペプチドを用いて、それぞれの二量体の熱力学的安定性が、二量体ペプチドの協同的 DNA 結合と塩基配列識別に及ぼす影響について検討を行った。その結果、二量体ペプチドが特異的な塩基配列 DNA に対して協同的に結合し、安定な DNA 複合体を形成するためには一定値以上の二量体の熱力学的安定性が必要であることがわかった。一方で、二量体の安定性が高いほどタンパク質二量体と特異的 DNA の複合体の安定性が高くなるわけでないことも明らかとなった。また、二量体形成部位にしき

い値以上の熱力学的安定性を有する 2 種類の二量体ペプチドで DNA 塩基配列識別能の差がみられた。その識別能の差が非特異的塩基配列 DNA に対する、両ペプチド二量体の親和性の差に起因することが示された。

### 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 (58)

複合体の安定性はそれぞれの分子間の会合平衡によって支配されていると考えられるが、その会合平衡の存在が複合体形成における協同性発現や分子間の識別においてどのような役割を果たしているのだろうか。この問題を追求するために、ホストゲスト錯体形成を介して非共有結合で二量化する二量体ペプチドと、2分子の DNA 結合ペプチドを有機鋳型分子を介して共有結合で二量化する二量体ペプチドの DNA 相互作用を比較した。その結果、二量体形成を非共有結合によって平衡反応にすることで、より小さいペプチド濃度変化で二量体ペプチドの DNA 結合が完了し、二量体ペプチドの DNA 塩基配列識別能が上昇することが示された。さらに、単量体ペプチドに DNA 結合性および DNA 非結合性の 2 つの構造の平衡を存在させることで、二量体ペプチドが協同的に DNA に結合する際の塩基配列識別能が上昇することがわかった。この結果は、実際のタンパク質でも塩基配列識別能に構造変化という要因が重要な役割を果たしている可能性を提示するものである。

これまでの研究では複数のタンパク質の塩基配列識別において、DNA-タンパク質間相互作用の重要性が注目されていたが、本研究では DNA とは直接相互作用しないタンパク質間相互作用も、協同的な複合体形成や複数のタンパク質の塩基配列の識別に重要な役割を果たしていることを示された。これらの知見は、タンパク質による DNA 塩基配列の識別に限らず、生体機能の制御に関わる生体分子間の相互作用を理解する上で重要な概念を提示すると考えられる。

## 実験の部

### 第一章に関する実験

#### 試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸と PyBOP (Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) は Novabiochem から、HOBt (1-Hydroxybenzotriazole) はナカライテスクから、Fmoc-PAL-PEG 樹脂は PerSeptive Biosystems からそれぞれ購入した。ナカライテスクから購入したジメチルホルムアミドを水素化カルシウムで乾燥した後、ニンヒドリン (4-5 g) を加え減圧蒸留した。モレキュラーシーブス 4Å を加えて保存した。DNA 合成用の Nucleoside phosphoramidite は PerSeptive から、N-Hydroxysuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate は Vector Laboratories, Inc. から、T4 ポリヌクレオチドキナーゼは New England Biolab から、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ Adenosine-5'-triphosphate (>6000 Ci/mmol) は Amersham からそれぞれ購入した。アミノ酸分析用の AccQ Taq Chemistry Package は Waters から購入した。すべての実験にて Milli-Q 水を用いた。他のすべての試薬は精製せずにそのまま用いた。

#### 装置

逆相 C-18 カラム (20 x 250 mm, Ultron VX-Peptide, Sinwa Chemical Industry) はペプチド精製用に用いた。分析用には、逆相 C-18 カラム (4.6 x 150 mm, Ultron VX-Peptide, Sinwa Chemical Industry) を用いた。オリゴヌクレオチドは逆相 C-18 カラム (6 x 150 mm, Ultron VX-Nucleotide, Sinwa Chemical Industry) を用いて精製した。表面プラズモン共鳴スペクトルは Pharmacia BIAcore2000 biosensor を用いて測定した。イオンスプレー式質量分析は Perkin-Elmer Sciex API III を用い、陽イオンモードで測定した。

#### G C N 4 塩基性領域由来ペプチドの合成

Fmoc 固相合成法によって化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.16mmol/g) を用いた。縮合は、樹脂に対して 2.5 当量の Fmoc アミノ酸、2.5 当量の HOBt、2.5 当量の PyBOP、そして 3.75 当量の N-メチルモルフォリンを加え、30 から 60 分攪拌することでおこなった。但し、カルボキシル基が Pfp 基で活性化されている Fmoc アミノ酸を用いる場合は HOBt だけを加え、Dhbt 基で活性化されている Fmoc アミノ酸を用いる場合は他には他に

何も加えずに縮合反応をおこなった。N 末端のアミノ酸の Fmoc 基を脱保護した後、N-アセチルイミダゾールをもちいてペプチドの N 末端をアセチル化した。反応の進行は、各縮合反応終了後、カイザーテストで確かめた。樹脂からの切り出しおよび脱保護は、氷上、窒素雰囲気下にて、TMSBr (1.35 mL)、チオアニソール (1.2 mL)、エタンジチオール (0.6 mL)、m-クレゾール (0.2 mL) を縮合後の樹脂に加え、氷上にて 3 時間攪拌した。ろ過後、樹脂をトリフルオロ酢酸で洗浄し、ろ液を減圧濃縮した。氷上にて水を加え 30 分間攪拌し、エーテル抽出で精製した後、ゲルろ過 (G-10 Sephadex, 5% 酢酸-水) を行ない、最後に逆相クロマトグラフィー (移動相 A, 0.1% トリフルオロ酢酸-水; 移動相 B, 0.1% トリフルオロ酢酸-水/50% アセトニトリル; グラジエント、50-75% 移動相 B (40 分); 流速、6mL/min) で精製した。

#### ホストペプチド (GCd) の合成

##### Mono-[6-O-tosyl]- $\beta$ -cyclodextrin (1) の合成

ピリジン (50 mL) に溶かした  $\beta$ -シクロデキストリン (5.7g, 5mmol) に室温にて *p*-トルエンスルフォニルクロリド (478 mg, 2.5mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した後に、減圧濃縮した。残さに氷水 (50 mL) を加えた後、析出した結晶をろ過し、氷水で洗浄した。再結晶 (水) を行ない、**1** (2.2 g, 36%) を得た。

##### Mono-6-deoxy-6-iodo- $\beta$ -cyclodextrin (2) の合成

ジメチルホルムアミド (10 mL) に溶かした **1** (2.0 g, 1.5 mmol) を、アルゴン雰囲気下にてヨウ素化ナトリウム (2.5 g, 6.0 mmol) に加えた。遮光し、70°C に加熱しながら 4 時間攪拌した。室温まで冷却後、ゲルろ過 (Sephadex G-10, 5% 酢酸) で精製した。発色試験 (硫酸 : アニスアルデヒド : エタノール : 酢酸 = 2.5 : 90 : 2.7 : 1) で陽性のフラクションを集め、減圧濃縮後、再結晶 (水 : エタノール = 2 : 1) を行ない、**2** (1.1 g, 59%) を得た。

#### GCd の合成

リン酸二ナトリウム溶液 (0.5 M, pH 9.0, 400  $\mu$ L)、ジメチルホルムアミド (400  $\mu$ L)、水酸化ナトリウム (1 M, 60  $\mu$ L) に溶かした **2** (124 mg, 100  $\mu$ mol) に、氷上および窒素雰囲気下にて、水 (200  $\mu$ L) に溶かした G C N 4 ペプチド (10 mg) を加え、攪拌した。反応の進行を逆相クロマトグラフィー (0.05% トリフルオロ酢酸、10-40% アセトニトリル) で確認した後、2-メルカプトエタノール (100  $\mu$ L) を加えて攪拌した。15 分後、酢酸 (100  $\mu$ L) を加えて pH 試験紙で酸性を確認後、ゲルろ過 (G-10 Sephadex; 5% 酢酸-水) を行なった。ニンヒドリン発色したフラクションを回収し、逆相クロマトグラフィー (移動相 A, 0.05%

トリフルオロ酢酸-水；移動相 B、0.05% トリフルオロ酢酸-水/50% アセトニトリル；流速、5mL/min；グラジエント、20-80%B（35分））を行ない、回収したフラクション（溶出時間、18分）をトリエチルアミンで中和した後、生じた塩を Sep-pak C-18 カラムで除いた。凍結乾燥し GCd（5.5 mg, 38%）を得た。この固体を pH 8 の 1/10xTE 緩衝液（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA）に溶かし、アミノ酸定量分析によって濃度を決定した。最終生成物の同定は <sup>1</sup>H-NMR、アミノ酸分析およびイオンスプレー式質量分析によって行なった。

#### 各種ゲストペプチド（G23Ad, G23NAd, G23NrA, G23Nb, G23Ch）の合成

N-(bromoacetyl)-1-adamantanemethylamine (3)およびプロモアセチル化した各種ゲスト分子のアミン体

ジクロロメタン（8 mL）に溶かしたプロモアセテート（2.8 g, 20 mmol）に、氷上にてジクロロメタン（8 mL）に溶かした DCC（ジクロロヘキシルカルボジイミド；10 mmol）を加えて 2.5 時間攪拌した後、吸引ろ過を行なった。冷ジクロロメタンで洗い、減圧濃縮した後、ジメチルホルムアミド（8 mL）を加えた。そこに、ジメチルホルムアミド（8 mL）に溶かしたアダマンタンメチルアミン（100 mg, 1.2 mmol）を加え、室温にて 30 分間攪拌した後、4-ジメチルアミノピロリドン（0.15 g, 1.21 mmol）を氷冷下にて加えた。反応液が黄色から赤紫色に変化した後に、室温に戻しさらに 1 時間攪拌した。吸引ろ過および減圧濃縮後、ジクロロメタン（10 mL）を加え、炭酸水素ナトリウム（4%）、クエン酸（10%）で洗った。有機層を分離した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した後に、シリカゲルクロマトグラフィー（ジクロロメタン）によって精製し、3（95.0 mg, 27.4%）を白色の油状物質として得た。他のプロモアセチル化した各種ゲスト分子のアミン体は、アダマンタンメチルアミンのかわりに、アミノアダマンタン、アミノノルアダマンタン、2-アミノエチルノルボルナン、シクロヘキシルアミンを用いて、合成した。

#### G23Ad および各ゲストペプチド

リン酸緩衝液（pH 9.0, 0.5 M, 600 μL）と水酸化ナトリウム（1 N, 50 μL）を混ぜた溶液に、氷上、窒素雰囲気下にて、ジメチルホルムアミド（200 μL）に溶かした 3（17 mg, 60 mmol）を加えた後、さらに、水（200 μL）に溶かした GCN4 ペプチド（10mg, 3.6 mmol）を加え、1 時間攪拌した。反応液に 2-メルカプトエタノール（100 μL）を加えた後、酢酸（100 μL）をくわえ、ゲルろ過（Sephadex G-10, 5% 酢酸-水）によって精製した。ニンヒドリン反応のあるフラクションを回収し、逆相クロマトグラフィーで精製し、G23Ad（8mg, 74%）を得た。他のゲストペプチドも 3 のかわりに、プロモアセチル化した各種ゲスト分子のアミン体を用いることで合成した。最終生成物の同定は <sup>1</sup>H-NMR、アミノ酸分析およびイオンスプレー式質量分析によって行なった。

#### ビオチン化したホストペプチドの合成

GCN4 塩基性領域由来ペプチドの合成時の N-アセチルイミダゾールのかわりに、N-Hydroxysuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate をペプチドの N 末端に縮合した。脱保護および精製後、GCd の場合と同様にβ-シクロデキストリンを C 末端に修飾した。

#### 二量体形成部位の解離定数の測定

BIAcore biosensor の操作原理はすでに報告されている（31）。トリス緩衝液（20 mM Tris-HCl, 150 mM KCl）を測定時およびサンプル調製時に用いた。N 末端をビオチン化したホストペプチドを、ストレプトアビジンでコートされたセンサーチップ（SA, Pharmacia Biosensor）上に、レスポンス・ユニットが約 800 になるまでインジェクトした。また、センサーチップ表面に対するゲストペプチドの吸着量を測定するために、ビオチンを固定化したセンサーチップも用意した。測定は、6 通りの濃度の各種ゲストペプチドの溶液（1, 2, 5, 10, 20, 50 μM）を 12 分間流路に流した後、トリス緩衝液を 18 分間流すことで行なった。流速は毎分 30 μL であり、測定時の温度は 10° C に設定した。毎回の測定の後、トリス緩衝液に溶かしたβ-シクロデキストリンをインジェクトして、センサーチップ上に結合したゲストペプチドを除き、次の測定を行なった。

データの解析は BIAevaluation version 3.0 を用いた。得られたすべてのセンサーグラムから、ビオチンが固定化されているセンサーチップから得られたセンサーグラムを差し引いて解析を行なった。ゲストペプチド濃度に対して平衡時のレゾナンス・ユニットをプロットし、1 式

$$R = (R_{max} \cdot C) / (K_{d1} + C) \quad [1]$$

を用いて最小二乗法で解析を行ない、解離定数を算出した。R は平衡時のレスポンス・ユニット、Rmax はレスポンス・ユニットの最大値、そして C はゲストペプチドの濃度である。

#### オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドは PerSeptive 社の DNA 合成装置を用いて固相フォスファアミダイド法により合成した。縮合後、20%アンモニア水によってカラムから切り出し、55°C で 8 時間放置した。減圧濃縮後、Ultron VX-Nucleotide カラムを用いて、逆相クロマトグラフィーで精製した。溶出はトリエチルアミン-酢酸緩衝液（pH 7.0, 0.1 M）中、5-30%アセトニトリルの直線濃度勾配（40 分、流速毎分 1 mL）で行なった。減圧濃縮後、酢酸（80%）を加えて 30 分間室温に放置下後に、さらに減圧濃縮を行ない、最後に逆相クロマトグラフィーで精製した。凍結乾燥後、pH 8 の 1/10xTE 緩衝液（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA）に溶かした。

## ゲルシフトアッセイ

オリゴヌクレオチドの 5'末端標識

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (>6000 Ci/mmol)と T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) を用いて、オリゴヌクレオチドの 5'末端の放射標識反応を行なった後、Sep-pak で精製した。減圧濃縮後、4 倍当量の相補鎖の非標識オリゴヌクレオチドを加え、アニーリング反応条件下 (25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) にて、85°C で 1 分間放置後、室温に徐冷した。

ゲルシフト電気泳動

標準的な反応は、結合反応条件下 (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 4 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA (pH 8.0), 6% sucrose) にて、様々な濃度のホストペプチドとゲストペプチド、および約 20 pM の 5'末端標識した 2 本鎖オリゴヌクレオチドを加えた全量 20 μL の溶液内で行なった。すべての結合反応において、ホストペプチドとゲストペプチドの濃度が等しくなるように設定した。各温度で 30 分間放置した後、各反応溶液の 8 μL を 10%非変性アクリルアミドゲル (アクリルアミド : ビスアクリルアミド = 29 : 1) に直接ロードし、各温度で TBE 緩衝液中 (20 mM Tris-HCl, 20 mM boric acid, 0.1 mM EDTA) にて電気泳動を行なった。電気泳動は、ATTO 社の AE-6410 gel boxes キットで行ない、泳動温度は、水-メタノール混合液の循環による温度コントローラーによって制御した。泳動後のゲルを、Bio-Rad 社の Model 583Gel Dryer で乾燥した後、-70°C で約 12 時間 X 線フィルム (Fuji Medical X-ray Films RX) に感光させた。

ゲルシフト電気泳動データの解析

現像したフィルムを、Deskscan II と NIH-image (version 1.55) で解析し、各バンドの濃さを定量した。G23Cd、ゲストペプチド、そして DNA の 3 因子からなる複合体形成は次の平衡反応によるものとして解析した。



また、この平衡関係において、以下のような関係式が成り立つ。

$$[G]_t = [G] + [CG] + [CGD] \quad [4]$$

$$[C]_t = [C] + [CG] + [CGD] \quad [5]$$

$$[D]_t = [D] + [CGD] \quad [6]$$

$$K_{d1} = [G][C]/[CG] \quad [7]$$

$$K_{d2} = [CG][D]/[CGD] \quad [8]$$

G、C、そして D はそれぞれ、反応溶液中に単独で存在する各ゲストペプチド、G23Cd、そし

て DNA の濃度を示す。CGD はペプチド二量体-DNA 複合体の濃度を、[G]<sub>t</sub>、[C]<sub>t</sub>、そして[D]<sub>t</sub> は、反応溶液中に存在するすべての各ゲストペプチド、G23Cd、そして DNA の濃度を示す。K<sub>d1</sub> および K<sub>d2</sub> はペプチド二量体およびペプチド二量体-DNA 複合体のそれぞれの解離定数を表している。等式 7 と 8 から得られる、

$$K_{d1}K_{d2} = [G][C][D]/[CGD] \quad [9]$$

に等式 6 を代入し、次式を得た。

$$[CGD] = [G][C][D]_t / (K_{d1}K_{d2} + [G][C]) \quad [10]$$

等式 4 と 5 をあわせて、

$$[CG] = [G]_t + [C]_t - [G] - [C] - 2[CGD] \quad [11]$$

を導いた。本結合反応条件では[C]<sub>t</sub> >> [CGD]かつ[G]<sub>t</sub> >> [CGD]なので、[C]<sub>t</sub> - [CGD]と[G]<sub>t</sub> - [CGD]はそれぞれ、[C]<sub>t</sub>と[G]<sub>t</sub>に等しいとすると、等式 11 は

$$2[CG] = [G]_t + [C]_t - [G] - [C] \quad [12]$$

と近似できる。ここに等式 7 を代入することで

$$2[G][C]/K_{d1} = [G]_t + [C]_t - [G] - [C] \quad [13]$$

を求め、さらに本実験条件に基づいた等式、[G]<sub>t</sub> = [C]<sub>t</sub> および[G] = [C]を代入して

$$[G]^2 + K_{d1}[G] - K_{d1}[G]_t = 0 \quad [14]$$

を求め、さらに変形して、

$$[G] = \{-K_{d1} + (K_{d1}^2 + 4K_{d1}[G]_t)^{1/2}\} / 2 \quad [15]$$

を得た。二量体ペプチドが結合している DNA フラクシオン (Θ) は

$$\Theta = [CGD] / [D]_t \quad [16]$$

と表されるので、ここに、等式 10 と 15 および[G] = [C]を代入することで、

$$\begin{aligned} \Theta &= [C][G] / (K_{d1}K_{d2} + [G][C]) \\ &= [G]^2 / (K_{d1}K_{d2} + [G]^2) \\ &= 1 / [1 + 2K_{d2} / \{K_{d1} + 2[G]_t - (K_{d1}^2 + 4K_{d1}[G]_t)^{1/2}\}] \end{aligned} \quad [17]$$

を導いた。K<sub>d2</sub> の値は、ゲルシフト電気泳動から得られたΘ値を、理論式 17 を用いて、非直線最小二乗法で求めた。各ペプチド二量体の K<sub>d1</sub> の値には Table 1-1 の値を導入した。解析ソフトには IgolPro 2.02 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego OR) を用いた。

## 第二章に関する実験

### 共有結合二量体 G<sub>2</sub>RDHP の合成

引用文献 24 の実験項に基づいて合成した。ただし、鋳型分子との縮合において、Figure 2-2 に示したようにシステインの位置が異なる 2 種類の GCN4 の塩基性領域由来ペプチドを用いた。

## 非共有結合同種二量体 (GAdCd, G3AdCd) の合成

N $\alpha$ -Fmoc-N $\epsilon$ -adamantyl-L-lysine の合成、GAd および G3Ad の合成、そして GAdCd および G3AdCd の合成は、引用文献 11 に従っておこなった。

## ゲルシフトアッセイ

オリゴヌクレオチドの 5'末端標識およびゲルシフト電気泳動

第 1 章に関する実験でのゲルシフトアッセイの方法に準じて行った。

## ゲルシフト電気泳動データの解析

現像したフィルムを、Deskscan II と NIH-image (version 1.55) で解析し、各バンドの濃さを定量した。

- (1) 共有結合ペプチド二量体と DNA からなる 1 : 1 複合体形成の場合  
結合反応は次式に従う。



$$K_d = (P)(D) / PD \quad [19]$$

P、D、PD はそれぞれ共有結合ペプチド二量体、2 本鎖 DNA、ペプチド二量体-DNA 複合体を表し、 $K_d$  はこの平衡反応を支配する解離定数を意味する。ペプチド二量体が結合している DNA フラクション ( $\Theta$ ) :

$$\Theta = [PD] / ([D] + [PD]) \quad [20]$$

に等式 19 を代入すると、

$$\Theta = [P]_t / (K_d + [P]_t) \quad [21]$$

が求まる。 $[P]_t$  は共有結合ペプチド二量体の全濃度である。 $K_d$  の値は、ゲルシフト電気泳動から実験的に得られた  $\Theta$  値を理論式 21 に代入し、非直線最小二乗法で求めた。解析ソフトには IqolPro 2.02 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego OR) を用いた。

- (2) 非共有結合ペプチド異種二量体と DNA からなる 2 : 1 複合体形成の場合  
第 1 章のゲルシフト電気泳動データの解析法と同様に行った。

- (3) 非共有結合ペプチド同種二量体と DNA からなる 2 : 1 複合体形成の場合  
結合反応は次式に従う。



また、この平衡関係において、以下のような関係式が成り立つ。

$$[G]_t = [G] + 2[G_2] + 2[G_2D] \quad [24]$$

$$[D]_t = [D] + [G_2D] \quad [25]$$

$$K_{d1} = [G]^2 / [G_2] \quad [26]$$

$$K_{d2} = [G_2][D] / [G_2D] \quad [27]$$

$[G]$  および  $[D]$  はそれぞれ、反応溶液中に単独で存在するペプチドおよび DNA の濃度を示す。 $G_2D$  はペプチド二量体-DNA 複合体の濃度を、 $[G]_t$  および  $[D]_t$  は、反応溶液中に存在するペプチドおよび DNA の全濃度を示す。 $K_{d1}$  および  $K_{d2}$  はペプチド二量体およびペプチド二量体-DNA 複合体のそれぞれの解離定数を表している。等式 26 と 27 から得られる、

$$K_{d1} K_{d2} = [G]^2 [D] / [G_2D] \quad [28]$$

に等式 25 を代入し、次式を得た。

$$[G_2D] = [G]^2 [D]_t / (K_{d1} K_{d2} + [G]^2) \quad [29]$$

本結合反応条件では  $[G]_t \gg [G_2D]$  なので、 $[G]_t - [G_2D]$  は  $[G]_t$  に等しいとすると、等式 24 は、

$$[G_2] = ([G]_t - [G] - 2[G_2D]) / 2 \\ = ([G]_t - [G]) / 2 \quad [30]$$

と近似できる。ここに等式 26 を代入することで

$$2 [G]^2 / K_{d1} = ([G]_t - [G]) / 2 \quad [31]$$

を求め、さらに変形して、

$$[G] = \{-K_{d1} + (K_{d1}^2 + 16 K_{d1} [G]_t)^{1/2}\} / 8 \quad [32]$$

を得た。二量体ペプチドが結合している DNA フラクション ( $\Theta$ ) は

$$\Theta = [G_2D] / [D]_t \quad [33]$$

と表されるので、ここに、等式 29 と 32 および  $[G] = [C]$  を代入することで、

$$\Theta = [G]^2 / (K_{d1} K_{d2} + [G]^2) \\ = 1 / [1 + 8 K_{d2} / \{K_{d1} + 4[G]_t - (K_{d1}^2 + 8 K_{d1} [G]_t)^{1/2}\}] \quad [34]$$

を導いた。 $K_{d2}$  の値は、ゲルシフト電気泳動から得られた  $\Theta$  値を、理論式 34 を用いて、非直線最小二乗法で求めた。各ペプチド二量体の  $K_{d1}$  の値には Table 1-1 の値を導入した。解析ソフトには IqolPro 2.02 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego OR) を用いた。

## 円二色性偏光 (CD) スペクトル測定

日本分光社の J-720 spectrometer を用いて CD スペクトルを測定し、このとき同社の PTC-343 temperature controller によって、セルを 4°C にて一定に保った。1 mm セルを用いた。測定条件は、波長範囲 : 200-300 nm、感度 : 200 mdeg、解像度 : 1 nm、積算回数 :

32 回、バンド幅 : 1 nm、レスポンス : 0.5sec.、スキャン速度 : 100nm/min とした。測定用溶液の測定は、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、4 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA (pH 8.0)、そして 4 μM ペプチドとした。

## 引用文献

1. Goodsell, D. S. *TIBS* **1991**, *16*, 203.
2. Goodrich, J. A.; Cutler, G.; Tijan, R. *Cell* **1996**, *84*, 825.
3. Woobe, C. R.; Struhl, K. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 3859.
4. Kim, J. L.; Burley, S. K. *Nature Struct. Biol.* **1994**, *1*, 638.
5. Wefald, F. C.; Devlin, B. H.; Williams, R. S. *Nature* **1990**, *344*, 260.
6. Kim, T. K.; Hashimoto, S.; Kelleher III, R. J.; Flanagan, P. M.; Kornberg, R. D.; Horikoshi, M.; Roeder, R. G. *Nature* **1994**, *369*, 252.
7. Ptashne, M. A. Genetic Switch; Blackwell Scientific Publications and Cell Press: Palo Alto, CA, **1986**.
8. Johnson, A. D.; Poteete, A. R.; Lauer, G.; Sauer, R. T.; Ackers, G. K.; Ptashne, M. *Nature* **1981**, *294*, 217.
9. Burz, D. S.; Beckett, D.; Benson, N.; Ackers, G. K.; *Biochemistry* **1994**, *33*, 8399.
10. Burz, D. S.; Ackers, G. K.; *Biochemistry* **1994**, *33*, 8406.
11. Hurst, H. C. *Protein Profile* **1994**, *1*, 123.
12. Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6871.
13. Ueno, M.; Murakami, A.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575.
14. Eftink, M. R.; Andy, M. L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H. D.; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765.
15. Inoue, Y.; Hakushi, T.; Liu, Y.; Tong, L.-H.; Shen, B.-J.; Jin, D.-S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 475.
16. Morii, T.; Shimomura, M.; Morimoto, M.; Saito, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1150.
17. Okagami, M.; Ueno, M.; Makino, K.; Shimomura, M.; Saito, I.; Morii, T.; Sugiura, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 777.
18. Morii, T.; Saimei, Y.; Okagami, M.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3649.
19. Cuenoud, B.; Shepartz, A. *Science* **1993**, *259*, 510.
20. Cuenoud, B.; Shepartz, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1154.
21. Palmer, C. R.; Sloan, L. S.; Adrian, J. C., Jr.; Cuenoud, B.; Paolella, D. N.; Schepartz, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8899.
22. Pavletich, N. P.; Pabo, C. O. *Science* **1991**, *252*, 809.
23. Klemm, J. D.; Rould, M. A.; Aurora, R.; Herr, W.; Pabo, C. O. *Cell* **1994**, *77*, 21.



24. Kim, J. S.; Pabo, C. O. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 2812.
25. Pomerantz, J. L.; Wolfe, S. A.; Pabo, C. O. *Biochemistry* **1998**, *37*, 965.
26. Ueno, M.; Sawada, M.; Makino, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11137.
27. Morii, T.; Yamane, J.; Aizawa, Y.; Makino, K.; Sugiura, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011.
28. Atherton, E.; Sheppard, R. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 165.
29. Fairman, R.; Shoemaker, K. R.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. *Proteins* **1989**, *5*, 1-7.
30. Melton, L. D.; Slessor, K. N. *Carbohydr. Res.* **1971**, *18*, 29.
31. Jönsson, U. D.; Fagerstam, L.; Roos, H.; Rönnberg, J.; Sjölander, S.; Stenberg, E.; Stahlberg, R.; Urbaniczky, C.; Ostlin, H.; Malmqvist, M. *Biothechniques* **1991**, *11*, 520.
32. Ellenberger, T. E.; Brandl, C. J.; Struhl, K.; Harrison, S. C. *Cell* **1992**, *71*, 1223.
33. König, P.; Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 139.
34. Keller, W.; König, P.; Richmond, T. J. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 657.
35. Talanian, R. V.; McKnight, C. J.; Kim, P. S. *Science* **1990**, *249*, 769.
36. Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard, W. A., III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1992**, *89*, 9094.
37. Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard, W. A., III. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6287.
38. Freid, M.; Crothers, D. M. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 6505.
39. Gamer, M. M.; Revzin, A. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 3047.
40. Kim, B.; Little, J. W. *Science* **1992**, *255*, 203.
41. Park, C.; Campbell, J. L.; Goddard, III., W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4235.
42. Metallo, S. J.; Schepartz, A., *Nature Struct. Biol.* **1997**, *4*, 115.
43. Metallo, S. J.; Schepartz, A. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 143.
44. Sellers, J. W.; Vincent, A. C.; Struhl, K. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 5077.
45. Paoletta, D. N.; Palmer, C. R.; Schepartz, A. *Science* **1994**, *264*, 1130.
46. Distefano, M. D.; Shin, J. A.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5901.
47. Colocci, N.; Distefano, M. D.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4468.
48. Distefano, M. D.; Dervan, P. B. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 1179.
49. Colocci, N.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 785.
50. Colocci, N.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4781.
51. Szewczyk, J. W.; Baird, E. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6778.
52. Weiss, M. A.; Ellenberger, T.; Wobble, C. R.; Lee, J. P.; Harrison, S. C.; Struhl, K. *Nature* **1990**, *347*, 575.
53. Weiss, M. A. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8020.
54. O'Neil, K. T.; Shuman, J. D.; Ampe, C.; DeGrado, W. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 9030.
55. Saudek, V.; Pasley, H. S.; Gibson, T.; Gausepohl, H.; Frank, R.; Pastore, A. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1310.
56. Mrksich, M.; Parks, M. E.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983.
57. Aizawa, Y.; Sugiura, Y.; Ueno, M.; Mori, Y.; Imoto, K.; Makino, K.; Morii, T. *Biochemistry* in press.
58. Aizawa, Y.; Sugiura, Y.; Morii, T. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1626.

## 謝辞

終わりに臨み、終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 杉浦幸雄教授に深く感謝の意を表します。

常に誠意ある御指導を直接賜り、また研究の楽しさを教えて戴きました京都大学化学研究所 森井 孝博士（現京都大学エネルギー理工学研究所）に心より感謝致します。

種々有益な御助言ならびに御激励を頂きました京都大学化学研究所 大塚雅巳助教授（現熊本大学教授）、桑原 淳博士（現徳島大学助教授）、上野 勝博士（現静岡大学）、上杉志成博士（現ベイラー医科大学助教授）、実験の一部に御協力頂いた山根潤二修士、澤田 守修士、種々御討議頂いた京都大学化学研究所生体反応設計 II 部門ならびに京都工芸繊維大学生体高分子研究室の方々に心より感謝致します。

表面プラズモン共鳴を原理とする測定器の使用の機会を御提供下さり、また種々有益な御助言ならびに御激励を頂きました生理学研究所 井本敬二教授、森 泰生助教授、ならびに液性情報研究部門の方々に感謝致します。ペプチド自動合成機の使用の機会を御提供下さいました京都工芸繊維大学 村上 章教授に感謝致します。学生生活の最後の半年間、鍛錬の場を御提供下さいました京都大学エネルギー理工学研究所 牧野 圭祐教授ならびに生体エネルギー研究部門の方々に感謝致します。また、本研究の一部は日本学術振興会より援助を受けたものであり、感謝致します。

大学および大学院時代を通して御助言ならびに御激励を頂きました先輩方々、お互いに切磋琢磨し合えた友人に感謝致します。

最後に、私が学問の道を進むことを理解し、常に温かく見守ってくれた両親、兄弟、そして妻 早織に心から感謝します。