

氏名	いまにし みき 今西未来
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第495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	新規6-亜鉛フィンガー蛋白質によるDNA湾曲の誘発

論文調査委員 (主査)  
教授 杉浦幸雄 教授 多賀 徹 教授 川 崙敏 祐

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 序章 新規亜鉛フィンガー蛋白質の創製

遺伝子の転写は蛋白質の配列特異的なDNA結合のみならず、離れた塩基対間に存在する蛋白質同士の相互作用によって初めて開始される。この蛋白質間の相互作用を可能にする要因の一つはDNA構造変化である。それ故、任意の塩基配列結合能を有し、さらにDNA湾曲を誘発する新規蛋白質は、人工転写制御因子としての可能性を秘めていると考えられる。これまでに、代表的なDNA結合モチーフの一つである亜鉛フィンガーモチーフを複数個連結させることによって、結合塩基配列の拡張が可能であることが示されてきた。また、ファージディスプレイ法によって任意の塩基配列結合能を有する亜鉛フィンガー蛋白質を選択できることが報告されており、亜鉛フィンガーモチーフは新規蛋白質の創製にとって極めて魅力的である。本研究では、転写因子SplのDNA結合領域に存在する三つの亜鉛フィンガー同士を様々なリンカーで連結することにより、六つの亜鉛フィンガーを有する新規蛋白質を創製し、これらのDNA構造に与える影響およびDNA結合の速度論的特性について検討した。

#### 第一章 ポリグリシンリンカーを有する新規6-亜鉛フィンガー蛋白質による湾曲の誘発

転写因子SplのDNA結合領域に存在する三つの亜鉛フィンガー(Spl(530-623)、以下WTと表す)同士をグリシン4個、7個、10個からなるリンカー配列を用いて連結させた新規蛋白質SplZF6(Gly)<sub>4</sub>, SplZF6(Gly)<sub>7</sub>, SplZF6(Gly)<sub>10</sub>(以下G4, G7, G10と表す)を創製し、リンカーの長さの違いが標的塩基配列の構造に及ぼす影響を様々なゲル電気泳動法によって解析した。WTはGCボックスとよばれる塩基配列に特異的に結合する。そこで、6-亜鉛フィンガー型蛋白質の結合による構造変化が期待される標的塩基配列として、二つのGCボックス間にDNAヘリックスの約1ターンに相当する10塩基対(bp)を挿入した塩基配列を用いた。また、GCボックスを一つだけ含む配列をコントロールとして用いた。10bp離れた二つのGCボックスに対して行ったヒドロキシルラジカルフットプリント法において、G4とWTの切断パターンに違いは見られなかったが、G7, G10ではWTの場合とは異なり、二つのGCボックス間の配列中に強い切断が見られた。G7, G10の結合により二つの結合配列間のマイナーグループが広げられたことが示唆される。また、ゲル電気泳動の移動度の違いを利用してDNA構造変化を検出するPhasing Analysisなどの結果から、リンカーが短いG4では10bp隔てた二つのGCボックスの両側に一分子で結合することはできず、その結合は非特異的であると考えられた。一方、G7とG10は離れた二つのGCボックスに一分子で結合していることが示唆された。さらに、G7とG10の結合によって二つのGCボックス間にDNAの軸の方向性を変える構造変化が生じており、その変化の大きさはG7の方がG10よりも大きく、リンカーの長さはDNA湾曲の方向性に影響を与えることが示唆された。

#### 第二章 電荷の異なるリンカーを有するDNA湾曲亜鉛フィンガー蛋白質の創製：DNA結合の速度論解析

蛋白質の結合に伴って生じる湾曲DNAの安定性は、転写効率に影響を及ぼすことが報告されている。したがって、DNA湾曲を誘発する蛋白質のDNA結合の速度論的特性を考慮することは、転写制御にとって有効であると考えられる。

前章において、10個のグリシンからなるリンカーを有する6-亜鉛フィンガー蛋白質が10bp離れた二つの結合サイトに結合し、DNA構造変化を誘発することが明らかとなった。そこでリンカーのアミノ酸残基数は10に保ち、電荷を有するアミノ酸であるアルギニン、又はグルタミン酸を新たに導入した新規蛋白質 SplZF6(GR)4、及び SplZF6(GE)4 を創製し、DNA構造に及ぼす影響と DNA 結合における速度論的特性を SplZF6(Gly)10 と比較した。メチル化干渉法、Phasing Analysis の結果から、これらの蛋白質の塩基認識や、DNA 構造に及ぼす影響はリンカーの電荷の違いによらずほとんど等しいことが明らかとなった。一方、表面プラズモン共鳴の原理に基づく BIAcore システムを利用した測定から、各蛋白質の DNA 結合の速度論的特性に関して興味深い結果が得られた。すなわち、結合速度定数は SplZF6(GE)4 が最も小さいが、解離速度定数は SplZF6(Gly)10 が最も大きいという知見が得られた。DNA との相互作用には、リンカーの電荷のみならず、フレキシビリティも関わっている可能性がある。これらの蛋白質が DNA 認識や DNA 構造変化の点ではほとんど同じ性質を示すにもかかわらず、リンカーの違いによって、湾曲 DNA と蛋白質との複合体の安定性に違いが生じていることが示唆された。

これらの結果は、DNA 湾曲を誘起する新規亜鉛フィンガー蛋白質の分子設計に価値ある知見を示したと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

遺伝子の転写は蛋白質の配列特異的な DNA 結合のみならず、離れた塩基対間に存在する蛋白質同士の相互作用によって初めて開始される。この蛋白質間の相互作用を可能にする要因の一つは DNA 構造変化である。それ故、任意の塩基配列結合能を有し、さらに DNA 湾曲を誘発する新規蛋白質は、人工転写制御因子としての可能性を秘めていると考えられる。本研究では、転写因子 Spl の DNA 結合領域に存在する三つの亜鉛フィンガー (WT) 同士を様々なリンカーで連結することにより、六つの亜鉛フィンガーを有する新規蛋白質を創製し、これらの DNA 構造に与える影響および DNA 結合の速度論的特性について検討し、以下のような価値ある知見を得た。

まず、リンカーの長さの影響を調べるために、二つの WT をグリシン 4 個、7 個、10 個からなるリンカー配列を用いて連結させた新規蛋白質 SplZF6(Gly)4、SplZF6(Gly)7、SplZF6(Gly)10 をデザインし、これらが標的塩基配列の構造に及ぼす影響を様々なゲル電気泳動法によって解析した。WT は GC ボックスとよばれる塩基配列に特異的に結合する。そこで、6-亜鉛フィンガー型蛋白質の結合による構造変化が期待される標的塩基配列として、二つの GC ボックス間に DNA ヘリックスの約 1 ターンに相当する 10 塩基対 (bp) を挿入した塩基配列を用いた。ヒドロキシルラジカルフットプリント法の結果から、SplZF6(Gly)7、SplZF6(Gly)10 の結合により二つの結合配列間のマイナーグループが広げられたことが示唆された。また、ゲル電気泳動の移動度の違いを利用して DNA 構造変化を検出する Phasing Analysis の結果から、リンカーが短い SplZF6(Gly)4 では 10bp 隔てた二つの GC ボックスの両側に一分子で結合することはできず、その結合は非特異的であるが、SplZF6(Gly)7、及び SplZF6(Gly)10 は離れた二つの GC ボックスに一分子で結合していることが示唆された。また、SplZF6(Gly)7、SplZF6(Gly)10 の結合によって二つの GC ボックス間に DNA の軸の方向性を変える構造変化が生じており、その変化の大きさは SplZF6(Gly)7 の方が SplZF6(Gly)10 よりも大きく、リンカーの長さは DNA 湾曲の方向性に影響を与えることが示された。

さらに、リンカーのアミノ酸残基数は 10 に保ち、電荷を有するアミノ酸であるアルギニン、又はグルタミン酸を新たに導入した新規蛋白質 SplZF6(GR)4、及び SplZF6(GE)4 を創製し、DNA 構造に及ぼす影響と DNA 結合における速度論的特性を SplZF6(Gly)10 と比較した。蛋白質の結合に伴って生じる湾曲 DNA の安定性は、転写効率に影響を及ぼすことが報告されており、DNA 湾曲を誘発する蛋白質の DNA 結合の速度論的特性を考慮することは、転写制御にとって有効であると考えられる。メチル化干渉法、及び Phasing Analysis の結果から、これらの蛋白質の塩基認識や、DNA 構造に及ぼす影響はリンカーの電荷の違いによらずほとんど等しいことが明らかとなった。一方、BIAcore システムを利用した速度論的解析から、リンカーの違いによって、湾曲 DNA と蛋白質との複合体の安定性に違いが生じていることが示唆された。

以上、本研究で得られた成果は、DNA 湾曲を誘起する新規亜鉛フィンガー蛋白質の分子設計に価値ある知見を示したと考えられる。

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。