

氏 名	しら いし やす ひさ 白 石 泰 久
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 595 号
学位授与の日付	平成 18 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	構造的特徴を基にした新規亜鉛フィンガータンパク質の創製と機能

論文調査委員 (主 査) 教 授 二 木 史 朗 教 授 藤 井 信 孝 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

序論

生体内で重要な機能を司るタンパク質に関して、その構造・機能相関を理解し、その知見を基にして新規な機能性分子の創製を行うことは、今後の生命科学の重要課題の1つになると思われる。本研究では、近年遺伝子治療への応用が強く期待されている亜鉛フィンガータンパク質に注目した。これまでの研究では、塩基認識に直接関与する α -ヘリックス領域に関するもののみが先行し、他の構造領域に関する知見は極めて少ない現状にある。そこで、亜鉛フィンガータンパク質の全体構造を、1) 認識に関与する α -ヘリックス領域、2) 亜鉛フィンガードメイン間の連結領域、3) 骨格構造を形成する β -ヘアピン領域という形で、その構造的な特徴を基に分割して捉え、それぞれの構造領域において多様な変異体を創製し解析していくことで、以下に示すような亜鉛フィンガータンパク質の構造—機能相関に関する多くの新しい知見を得た。

第一章 DNA の両鎖の塩基を認識する新規亜鉛フィンガータンパク質のデザイン

亜鉛フィンガータンパク質は一般的に、 α -ヘリックスのN末側から-1, 3, 6番目のアミノ酸残基を用いて、DNAの片方の鎖の連続する3塩基を認識する。さらに2番目のアミノ酸残基が、DNAの反対鎖の塩基認識に関与している。既存の亜鉛フィンガータンパク質の認識コードの開発は、3塩基認識を中心に行われてきているが、十分な結合親和性と特異性が得られない配列の存在が報告されている。そこで本章では、この限界を超えるために、反対鎖の塩基認識に注目して、新しい認識様式の構築を行うことにした。

反対鎖の認識に寄与するポジションには、セリン残基とアスパラギン酸残基が多く見られる。ヒト由来のSp1亜鉛フィンガーでも、そのN末側のFinger 1とC末側のFinger 3が、それぞれセリン残基とアスパラギン酸残基を有している。そこで、この2つの亜鉛フィンガードメインを基にして、2番目のポジションにセリン残基とアスパラギン酸残基を有する多様な変異体を調製した。その結果、DNAの両鎖にわたる5つのグアニンを認識するもの、並びに反対鎖の塩基を強く認識するものといった、既存の亜鉛フィンガータンパク質に見られない新規な塩基認識を有する亜鉛フィンガータンパク質の創製に成功した。

第二章 連結領域の配列変換に伴う亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合能の変化

連結領域内の2つのヒスチジン残基間からなる領域は、その中のアミノ酸数が3つのもの(HX₃H型)と4つのもの(HX₄H型)が多く存在しており、それぞれ₃10-ヘリックス構造と α -ヘリックス構造を形成している。HX₃H型では、続くリンカー配列としてTGEKPが高く保存されていると共に、上述した典型的な3塩基認識をとる。一方で、HX₄H型では、続くリンカー配列も塩基認識様式も極めて多様である。そこで、この領域の構造的な違いによるDNA結合能への影響を検討するために、HX₃H型としてSp1亜鉛フィンガー、HX₄H型としてGLI亜鉛フィンガーを選択して、それぞれのヒスチジン残基間の領域を相互に変換した変異体を調製して、そのDNA結合能を野生型と比較した。さらに続くリンカー配列との組み合わせによる影響についても検討を行った。

ゲルシフト法の結果より、Sp1亜鉛フィンガーではHX₃Hに変換することで、著しくDNA結合親和性が低下することが明らかになった。さらにDNase I フットプリント法により、その結合特異性が低下していることも示唆された。逆にGLI亜鉛フィンガーでは、DNA結合親和性の低下は軽微なものであり、結合様式にも顕著な変化は見られなかった。これらの結果は、3塩基認識を有する亜鉛フィンガータンパク質におけるHX₃H-TGEKPの高い保存性の意義を示すものと考えられる。さらにSp1亜鉛フィンガーにおいては、続くリンカー配列を変換することで、そのDNA結合能がさらに多様に変化することも明らかになった。以上の成果は、連結領域も亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合能を制御する上で、重要なターゲットになりうることを示すものと考えられる。

第三章 β -ヘアピン領域の改変による亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合能の制御

β -ヘアピン領域は、そのターン構造が個々の亜鉛フィンガードメインごとに異なるだけでなく、多様なバックボーンリン酸との相互作用にも関与することが構造解析により明らかにされている。統計的な解析によると、大きく2つに分類可能であると言われており、1つは3塩基認識を行うものに見られるもの、もう1つはGLI亜鉛フィンガーといった特徴的な認識様式を有するものに見られるものである。これらの違いがDNA結合能に及ぼす影響について検討を行うために、Sp1亜鉛フィンガーとGLI亜鉛フィンガー間で、 β -ヘアピン領域を変換した変異体をデザインし、そのDNA結合能の変化を解析した。

非常に興味深いことに、Sp1亜鉛フィンガーでは、 β -ヘアピン領域の変換に伴い、DNA結合親和性が野生型の10倍以上も高くなる一方で、GLI亜鉛フィンガーでは、完全にDNA結合能が失われた。これらの結果は、 β -ヘアピン領域も亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合において、重要な役割を担っていることを示唆している。今後 β -ヘアピン領域と α -ヘリックス領域の組み合わせを改変することで、さらに多様な塩基認識様式を構築できるものと思われる。

以上の研究成果により、これまで機能面での知見が少なかった α -ヘリックス領域以外の構造領域が、DNA結合能に重要な役割を担っていることを明らかにした。これに加えて、亜鉛フィンガータンパク質の塩基認識の拡張に成功すると共に、野生型よりも高いDNA結合能を有する変異体の創製にも成功し、新しい亜鉛フィンガータンパク質の設計に価値ある知見を与えた。

論文審査の結果の要旨

本研究では、構造的特徴を基に、亜鉛フィンガータンパク質の全体構造を、1) 認識に関与する α -ヘリックス領域（通称、認識ヘリックス）、2) 亜鉛フィンガードメイン間の連結領域、3) 骨格構造を形成する β -ヘアピン領域という形で分割して捉え、それぞれの構造領域について独創的な研究を展開することで、以下に示すような価値ある知見を得た。

第一章では、認識ヘリックス領域に注目した。既存の亜鉛フィンガータンパク質の認識配列の拡張に関する研究は、一方のDNA鎖の3塩基認識様式を基に進められている。これとは一線を画し、近年、明らかにされた反対鎖の塩基認識に注目して、3塩基認識とは異なる新しい認識様式の構築を試みた。反対鎖の認識に寄与するポジションに高く保存されているセリン残基とアスパラギン酸残基に焦点をあて、既存の亜鉛フィンガータンパク質に見られない反対鎖の塩基認識を中心とした新規な塩基認識様式の開発に成功した。この成果は、これまで認識困難であった配列を認識可能とする新規亜鉛フィンガータンパク質の創製に貢献するものと期待される。

第二章では、連結領域に関する研究を展開した。連結領域内の2つのヒスチジン残基からなる領域は、その中のアミノ酸残基数が、3つ（HX₃H型）と4つ（HX₄H型）のものが主に存在しており、それぞれ3₁₀-ヘリックス構造と α -ヘリックス構造を形成している。この構造変化による影響を検討し、Sp1亜鉛フィンガーではHX₃H型からHX₄H型に変換することで、DNA結合親和性が著しく低下することを明らかにすると共に、DNase I フットプリント法により、その結合特異性も低下することを示した。この結果は、3塩基認識を有する亜鉛フィンガータンパク質の連結領域において、HX₃H-TGEKPの組み合わせが高く保存されていることの意義を示すものと言える。また後に続くリンカー配列との組み合わせにより、DNA結合能に多様な変化を与えることも明らかにした。これら一連の成果は、亜鉛フィンガータンパク質のDNA結合能を制御していく上で、ドメイン間の連結領域が1つの有力なターゲットになりうることを提示するものと考えられる。

第三章では、これまでDNA結合への寄与が明らかにされていない β -ヘアピン領域に焦点をあてた。この領域は、DNA

のバックボーンリン酸と多様な相互作用を形成していることが、近年の構造解析により明らかにされている。そこで、そのバックボーンリン酸との相互作用が大きく異なる Sp1 と GLI 亜鉛フィンガーを基に、それぞれの β -ヘアピン領域を相互変換した変異体を調製して、その DNA 結合能を野生型と比較した。その結果、Sp1 亜鉛フィンガーにおいて、野生型よりも高い結合親和性と特異性を賦与すると共に、GLI 亜鉛フィンガーの DNA 結合能が、 β -ヘアピン領域に強く依存するものであることを明らかにした。これらの結果より、これまで単に骨格構造と捉えられてきた β -ヘアピン領域が、亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合を規定する重要な構造因子であるという結論を導いた。

以上、本研究は、新しい視点から亜鉛フィンガータンパク質の構造・機能相関に取り組み、多くの有益な知見を提供したと考えられる。

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。

更に、平成18年2月28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。