



Mechanisms of DNA Recognition by Transcription Factor c-Myb

Oda, Masayuki

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

1998-03-11

(Date of Publication)

2012-07-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2218

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141263>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002218>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	お 織 だ 田 まさ 昌 ゆき 幸 (三重県)
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	博ろ第51号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成10年3月11日
学位論文題目	Mechanisms of DNA Recognition by Transcription Factor c-Myb (転写因子c-MybによるDNA認識機構)
審査委員	主査 教授 赤坂 一之 教授 小野 功 貴 教授 磯野 克 巳 助教授 橋 秀 樹

論文内容の要旨

近年のNMRやX線などによる構造解析技術の目覚ましい進展により、多数の蛋白質-DNA複合体の立体構造が明らかにされている。その結果、我々は蛋白質によるDNAの認識が驚くべき多様性をもってなされていることを知るに至った。同時に、特異的認識のために必要となる蛋白質やDNAの構造変化、水分子の役割など、構造解析だけでは明らかにできないさまざまな問題点を提起している。また個々のアミノ酸及びDNA塩基の役割や、個々のアミノ酸と塩基との相互作用を理解するためには、蛋白質及びDNAの部位特異的変異体を調製して、それらの結合親和性を解析する必要がある。

本研究においては、がん原遺伝子産物 c-MybのDNA結合ドメインを対象として、その人工変異体を遺伝子工学的手法で発現し、これが認識する特異的DNA配列 ((C/T)AAC(G/T)G) 及びそのヴァリエーションを含むオリゴヌクレオチドDNAを化学合成して、両者の相互作用を Filter Binding Assay 及び滴定型カロリメトリー (ITC) を用いて解析した。Filter Binding Assayは強い結合 ($K_a > 10^7 \text{M}^{-1}$) に対して、ITCは弱い結合 ($10^2 < K_a < 10^8 \text{M}^{-1}$) に対してそれぞれ有効であることから、両手法の併用により非特異的なDNA結合から特異的結合までの解析が可能となった。また特にITCは反応のエンタルピー変化を直接観測することから、結合親和性以外にも精度の高い熱力学量の解析が可能となった。これらの測定法を用いてc-Myb蛋白質のDNA結合の強さを定量的に測定することにより、特異的認識と非特異的認識の違いに着目しながら、DNA認識における個々のアミノ酸残基によるDNA塩基の特異的認識様式、結合に伴う蛋白質及びDNAの構造変化の寄与、認識に関与する水分子の役割などの解明を目指した。

c-Myb蛋白質は分子量約7万で、N端側にDNA結合領域を、C端側に転写調節領域を有している。そのDNA結合領域は、各々が52アミノ酸残基よりなる3つの繰り返し配列 (R1, R2, R3) からなっており、このうちR2R3部分が特異的DNA配列に結合する。R2R3単独及びDNAとの複合体の立体構造は既にNMRにより決定されており、R2, R3はそれぞれ3本の α -helixからなり、いずれも3番目のヘリックスが認識ヘリックスとして、特異的にDNA塩基の認識に関与することが示されている。また各繰り返し配列の主鎖構造は極めてよく似ており、さらにR2とR3は共同的にDNA結合に関与す

る。この c-MybR2R3 とオリゴヌクレオチド DNA との相互作用を解析した本論文は 3 章からなり、その概略は以下の通りである。

第 1 章：c-MybR2R3 の Ser187 と、その相互作用部位である標的 DNA 配列最初の塩基（シトシンまたはチミンのピリミジン塩基）について、それぞれ別のアミノ酸及び別の塩基対で置換し、個々のアミノ酸による認識塩基特異性を Filter Binding Assay により解析した。その結果、187 位によるピリミジン塩基特異性は、アミノ酸残基による直接の認識だけでなく、DNA の立体構造全体のために重要であること、すなわち標的 DNA 塩基配列中のピリミジン塩基とそれに続くアデニン塩基という特定の塩基配列に起因する DNA 分子の曲がりやすさ（bendability）が特異的認識のために重要であることが示唆された。また 187 位の各変異体蛋白質における新しい認識様式として、Asn 置換体ではアデニン塩基特異性が、Lys, Arg 各置換体ではグアニン塩基特異性が認められたが、これらはいずれも各アミノ酸がもたらす水素結合能を反映したものであり、アミノ酸-塩基レベルでの認識特異性を実験的に証明できたといえる。

第 2 章：c-MybR2R3 各繰り返し配列の第 3 ヘリックスが特異的認識に関与し、また各繰り返し配列の主鎖構造が互いに類似していることが NMR により明らかにされている。しかし、R2 部分の第 3 ヘリックス以外を R3 配列に置換するとその特異的 DNA 結合活性は失われ、R2 第 1 ヘリックス内の Val103 と Val107 も必須であることが Filter Binding Assay により示された。これら両残基はともに R2 の疎水性コア部分にあり、R3 ではそれぞれ Ile と His になっている。この両 Val 残基は、直接 DNA との相互作用には関与していないものの、R2 独自のパッキング、すなわち R3 とは異なる R2 の構造の柔らかさに不可欠で、DNA 結合に伴う R2 の構造変化が DNA 認識に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

第 3 章：c-MybR2R3 の標的塩基配列を含むオリゴヌクレオチド DNA に対する結合を ITC により測定したところ、結合に伴うエンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) はともに温度依存的で、比熱変化 (ΔC_p) は $-0.6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ となり、さらに両者は補償しあって自由エネルギー変化 (ΔG) は各温度でほぼ一定という典型的な特異的結合反応の挙動を示した。 ΔC_p の値は主に結合に伴うアミノ酸残基の Accessible Surface Area の変化 (ΔA) に依存すると考えられているが、c-MybR2R3-DNA 複合体の NMR による立体構造をもとに ΔA を見積もり実験値と比較したところ、得られる計算値は実験値より大きくなり、 ΔA 以外の寄与も無視できないことを示す結果となった。この差異は他の結合反応でも報告されていたが、その原因の定量的な評価はなされていなかった。今回 c-MybR2R3 の特異的及び非特異的 DNA 結合におけるイオン強度依存性の解析結果から、結合に伴い DNA から解離する陽イオンの水和の寄与を明らかにすることができた。また非特異的 DNA 結合においては、「 ΔH 」が小さく、主に ΔS の寄与により複合体が形成されることが明らかになった。さらに c-MybR2R3 のアミノ酸置換体 11 種類と、標的塩基配列中の塩基置換体 13 種類のオリゴヌクレオチド DNA との相互作用の ITC 解析の結果、各認識部位での熱力学量や認識に関与する水分子の寄与、あるいは蛋白質各部位（認識ヘリックス、疎水性コア、R2 と R3 をつなぐリンカー部分）の役割についても解明することができた。

以上本研究は、蛋白質による DNA 認識において、個々の認識部位及び個々のアミノ酸残基の役割を詳細かつ定量的に明らかにしただけでなく、DNA の構造変化の重要性、認識に必要な蛋白質の構造及び構造変化の重要性を示し、蛋白質と DNA との分子認識機構の理解を深めたものである。蛋白質と DNA との相互作用において、その第一段階では主に塩基性アミノ酸と DNA リン酸基との静電的相互作用により解離定数にして μM 程度の非特異的複合体が形成され、第二段階でアミノ酸-塩

基レベルでの水素結合や疎水結合形成により解離定数にしてnM以下の特異的複合体が形成されるものと考えられている。本研究で得られた結果をもとに、さらにこの考察を進めると、第一段階はまさにエントロピー依存的で、結合の ΔH 、 ΔC_p ともに溶液中のイオン強度の影響を強く受けるもの(本論文第3章)であった。さらにここから特異的結合に至るためには、認識に直接関与するアミノ酸残基による塩基の特異的認識(本論文第1章)というエンタルピー依存的なものはもちろんのこと、その場に応じた蛋白質やDNAの構造変化(本論文第1, 2章)や、認識のための水分子の関与(本論文第3章)などが必要となってくる。これらはいずれも特異的認識のために不可欠で、いずれかが欠けても十分な認識特異性は得られないことが明らかになった。さらに本論文第3章に示したDNA認識に関するカロリメトリー解析は、DNA認識における熱力学的データとしてもこれまでの報告例の中で最も詳細なものであり、かつ ΔC_p に関する全く新しい知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

【要旨】

近年NMRやX線などによる構造解析技術の目覚ましい進展により、多数の蛋白質-DNA複合体の立体構造が明らかにされつつある。その結果、蛋白質のDNA認識機構の多様性が明らかになり、今後解明されるべき興味深い問題を数多く提示している。それらの興味深い問題として、結合に伴う蛋白質及びDNAの構造変化、認識に関与する水分子の役割、認識機構の熱力学的解析、さらに、新たな認識能を有する人工蛋白質のデザイン、などが挙げられる。本論文においては、がん原遺伝子産物である蛋白質c-MybのDNA結合ドメインを対象として、上述の問題点に着目しながら、そのDNA認識機構の詳細な解明を行ったものである。

c-Mybは特異的DNA配列((C/T)AAC(G/T)G)に結合する蛋白質で、DNA塩基配列の転写調節因子であり、そのDNA認識部位は3つの繰り返し配列(R1, R2, R3)からなっている。本研究はこのc-MybR2, R3のDNA認識機構について、数多くの変異型蛋白質と変異型オリゴヌクレオチド(以下DNAと称する)を調製し、それらの相互作用を主に Filter Binding Assay法及び滴定型カロリメトリー(Isothermal Titration Calorimetry: ITC)を用いて詳細に解析したもので、その概略は以下の通りである。

第一章ではc-MybR2R3のSer187、及びこれと相互作用する標的DNA塩基配列最初の塩基対チミン-アデニン塩基対を、それぞれ10種の別のアミノ酸及び別の塩基対で置換した試料について Filter Binding Assay法により解析し、この塩基対が、187位のアミノ酸残基による直接の認識だけでなく、DNAの立体構造全体の認識のために重要であることが判明した。

第二章では、c-Mybの繰り返し配列の一つであるR2内において、DNAの特異的認識及び協同性には、第1ヘリックス部分のVal103とVal107のアミノ酸がR2の立体構造保持に重要な役割を果たしていること、またR2の第1ヘリックス部以外はR3のそれで置き換え可能であることを示した。この結果から、このようにして得たc-Mybは、DNAへの特異的結合性を有した人工の蛋白質として機能することが明らかとなった。

第三章では、c-MybR2R3とDNAとの結合の熱力学を、滴定型カロリメーター(ITC)により詳しく解析し、結合に際してDNAから解離する陽イオンの水和の寄与が重要であること、また、c-MybR2R3のリンカー部が、R2とR3が協同的にDNAに結合する上で重要であることが示された。

以上、本研究は、がん原遺伝子産物である蛋白質c-MybのDNA結合ドメインを対象として蛋白質のDNA認識機構の詳細な解明を行い、結合におけるアミノ酸配列及び塩基配列特異性の分子機構を詳細に明らかにし、さらに新たな認識能を有する人工蛋白質デザインの可能性をも示したもので、構造生物学の分野における価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。