

氏 名	岡 上 雅 子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学位記番号	博 甲 第 153 号
学位授与の日付	平成 9 年 7 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	工学科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	二量体ペプチドによる DNA 認識：二量体形成部位の立体構造による DNA 塩基配列識別能の変化
審 査 委 員	(主査) 教授 村上 章 教授 木村良晴 教授 渡邊隆夫 京都大学 教授 牧野圭祐

論文内容の要旨

転写因子などの DNA 結合性タンパク質の多くは二量体を形成してその機能を発現する。二量化することによって、各々の単量体中にある DNA と直接接触する部分は、互いに二回対称な関係にある配置にある程度固定される。そして、このタンパク質二量体中にある DNA と直接接触する二つの部分の配置が、タンパク質二量体による DNA 塩基配列特異的な認識を促進しているのではないかと考えられる。本研究は、二量化に伴って生じる DNA と直接接触する二つの部分の立体的な制限が、タンパク質のもつ塩基配列識別能に及ぼす影響を評価するために、転写調節タンパク質の DNA 結合部位のみを取り出し、二つの DNA 接触ペプチドの配置を人工的に規制した二量体ペプチドを構築し、その機能を解析したものである。

第 1 章は、DNA 結合タンパク質をその構造から解析し、このような DNA 結合性タンパク質の構造的特徴をふまえて合成した共有結合性ペプチド二量体分子の有用性について述べている。

第 2 章は、人工二量体形成部位として、分子内に C_2 対称軸をもち、あらかじめその絶体配置が明らかな鋳型分子を用い、これにベーシックロイシンジッパー型タンパク質の一つである GCN4 の DNA 結合部位由来のペプチド鎖を 2 個、共有結合で結合することにより、二つのペプチド鎖の立体的な配置を規制した二量体ペプチドの合成について述べている。合成過程において、ペプチド鎖を鋳型分子に結合する際の位置、および鋳型分子の構造に違いを持たせることにより、二つのペプチド鎖の配置を系統的に変化させた。このようにして、タンパク質二量体モデルを構成する要素は殆ど同じであるが、それぞれの分子内での配置が異なる 6 つのペプチド二量体を得た。

第 3 章は、先に合成した二量体ペプチドの DNA への結合挙動を調べている。ペプチドのアミノ酸配列は GCN4 の DNA 結合領域に由来するオリゴペプチド 23 残基を用いている。これらのペプチド二量体はいずれも、天然の GCN4 が特異的に認識する塩基配列である 5'-ATGACTCAT-3'、5'-ATGACGTCAT-3' に対して、同じ結合能で結合することがゲルシフトアッセイより明らかになった。ペプチド二量体がこれらの回文配列 DNA を配列特異的に認識していることは DNaseI フットプリンティング法によって確かめられた。CD スペクトル測定より、ターゲット DNA 配列結合時の二量体ペプチドはアルファヘリカルなコンフォメーションをとっていることが示された。

第 4 章は、人工二量体形成部位として C_2 キラルな鋳型分子のエナンチオマーを用い、天然のベーシックロイシンジッパータンパク質とは異なった二量体配置をもったペプチド二量体の DNA 結合を調べた結果を述べている。ペプチドの N 末端から 6 番目の位置で二量化したペプチド二量体は、GCN4 が二量化して認識する塩基配列、CRE (5'-ATGACGTCAT-3') 中に存在する二つのハーフサイト (5'-ATGAC-3')

のポラリティを逆にした回文配列を配列特異的に認識することがわかった。しかし、ペプチドモノマーの N 末端で二量化したペプチドダイマーはこの反転配列を認識しなかった。ペプチドの N 末端から 6 番目でつないだペプチド二量体の反転配列 DNA に対する塩基配列特異的な結合は DNaseI フットプリンティングによって確かめた。二量体形成部位のキラリティの違いは特異的な DNA-N6 二量体ペプチド複合体の安定性には影響を及ぼさなかった。

第 5 章ではタンパク質二量体モデルの二量体配置の違いが、ターゲット DNA 配列以外の配列に対する親和性にどのような影響を及ぼすのかについて検討した結果が述べられている。GCN4 が認識する DNA 配列のハーフサイトを用いて、二つのハーフサイト間のスパーサー塩基配列を変化させた DNA を合成し、これらに対する GCN4 の認識ヘリックスを有する二量体ペプチドの結合挙動の変化を調べた。その結果、スパーサー塩基配列を挿入した塩基配列に対する二量体ペプチドの結合能は減少し、結合時の認識ヘリックスの構造も特異的な結合の場合とは異なることがわかった。これは、スパーサー塩基配列を挿入したことにより、二つのハーフサイト間の距離が遠くなってしまったために、二つの認識ヘリックスが各々のハーフサイト上の最適な位置に配置できなくなったために生じた結果であると考えられる。更に、スパーサー塩基配列の種類の違いによっても二量体ペプチドの結合能及び結合時の認識ヘリックスの構造に違いがみられた。この結果はスパーサー塩基配列がタンパク質との結合能の調節のみならず、結合タンパク質-DNA 複合体の構造の調節を行なっている可能性を示している。

本論文で示された結果は、これまでの「タンパク質と DNA の直接接触する部分の相補性で塩基配列特異的な結合を説明できる」という概念の研究とは大きく異なるものである。この結果は DNA 塩基配列に直接接触していない二量体形成部位の構造をデザインすることによって、認識する DNA 塩基配列が自由に設定できる人工 DNA 結合性タンパク質合成への可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

申請者岡上雅子氏は、平成 6 年 4 月 1 日より現在まで本学大学院工芸科学研究科機能科学専攻生物機能科学講座博士後期課程に所属し、DNA 結合性タンパク質の作用機序に関する研究に従事してきた。今般、これまでの研究結果を総合し、「二量体ペプチドによる DNA 認識：二量体形成部位の立体構造による DNA 塩基配列識別能の変化」という題目で学位申請論文を提出しているが、この論文は下に示したレフりー付きの国際的に評価の高い欧文学術雑誌に報告された 2 編の論文の内容をまとめたものである。この 2 編のうち 1 編は申請者が筆頭著者であり、本学の学位規定による資格を満足している。また学位申請論文に記載された研究内容は、上記要旨にまとめたように、遺伝子中の特異的塩基配列を認識して結合する二量体タンパク質のモデル化とその認識能の評価に関するものであり、この結果は転写因子等の高次構造を形成して機能するタンパク質の高い遺伝子認識能を解明するうえで非常に優れた新しい方法論を提供するものである。よって本審査委員会は、岡上雅子氏から提出された学位申請論文が本学の学位授与に値する十分に高い程度を持っていると結論する。

発表論文

1. Sequence-specific DNA binding by covalently constrained peptide dimers of the basic leucine zipper protein GCN4. M. Okagami, M. Ueno, K. Makino, M. Shimomura, I. Saito, T. Morii, and Y. Sugiura, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 3, 777-784 (1995).

2. Factors governing the sequence-selective DNA binding of geometrically constrained peptide dimers. T. Morii, Y. Saimei, M. Okagami, K. Makino, and Y. Sugiura, *Journal of the American Chemical Society*, 119, 3649-3655 (1997).