

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 稲葉 理美

題目 : Structural dynamics of c-Myb DNA-binding domain and its correlation with function.
(c-Myb DNA 結合ドメインの動的構造と機能との相関)

本研究は、転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインを対象とし、ユニークな構造揺らぎを様々な物理化学的手法により解析し、機能との相関を研究・考察したものである。

Chapter 1: General introduction. (序論)

蛋白質は固有の立体構造と機能を有しており、特異的な「生物学的な揺らぎ」により、個々のダイナミックな機能が発揮される。昨今、蛋白質の構造機能相関解明を目指し、多くの蛋白質の立体構造が X 線結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR) を用いて決定されているが、これらは「揺らぐ」蛋白質の最安定構造や平均構造であり、「揺らぎ」の寄与を含む蛋白質の「実像」解明には至っていない。すなわち、ポストゲノムの重要課題である蛋白質の構造機能相関の解明には、溶液中での揺らぎ—動的構造—に関する知見の獲得が不可欠である。研究対象の転写因子 c-Myb は、N 末端側に DNA 結合領域を、C 末端側に転写活性化および負の制御領域を有する分子量約 7 万の蛋白質である。DNA 結合領域は、アミノ酸配列の異なる 3 つのリピート (R1、R2、R3) より構成され、このうち R2R3 が P_yAAAC^(G/T)G 配列を含む DNA と特異的に結合する。各リピートの立体構造は非常に類似している一方で、アミノ酸配列や物性、役割は大きく異なる。本研究では、機能に重要な「生物学的揺らぎ」に着目し、R2R3 各種変異体を比較対照として、各種物理化学的手法を用いた解析を行った。得られた情報を相互に評価し、動的構造と機能との相関解明を目指した。

Chapter 2: Functional conformer of c-Myb R2R3 revealed from temperature-dependent studies.

(温度変化実験より明らかとなった c-Myb R2R3 の機能構造)

生理条件下での機能構造の解明を目指し、R2R3 の温度変化による構造への影響を詳細に解析した。野生型 R2R3 の円二色性分散 (CD) および示差走査熱量計 (DSC) により得られた pH 7.4 での変性転移温度は 49°C であり、メチル基領域の ¹H-NMR 信号の強度変化からも、ほぼ同程度の転移温度を得た。一方、高磁場側や低磁場側の ¹H-NMR スペクトルでは、生理温度付近で、顕著なブロードニングによる信号の

消失が見られた。それらは R2 由来の信号において、より低温での変化が大きく、その後続くように R3 由来の信号に変化が認められた。これら特徴的な信号の変化は、「熱変性」という蛋白質全体に起こる構造転移の温度より、はるかに低い温度で起こり、その高次構造の少なくとも一部に、特別な揺らぎが生じていることを示唆する。また二次元 NMR による主鎖の交差信号強度は、生理温度付近で C 末端残基を除くほぼすべての残基において 20-30% に低下した。以上より、生理条件下で変性には至らないまでも、側鎖のみならず主鎖そのものが顕著に揺らいだ特異な熱励起構造をとることを示し、これが DNA 結合に深く関わりと考えられる。

Chapter 3: Folding thermodynamics of R2R3 in correlation with its α -helical contents.

(R2R3 のフォールディング熱力学量と α -ヘリックス含量との相関)

pH の異なる様々な溶媒条件下での構造および安定性を解析し、各条件下での構造特性と熱力学量との相関解明を目的とした。CD スペクトルから、弱酸性 pH では、R2R3 特有の α -ヘリックス構造とは異なり、二次構造が大きく崩壊することが明らかとなった。また、pH 上昇に伴い α -ヘリックス含量が増加し、pH 6.5 において約 60% で最大となった。DSC 測定から、pH 5.0 において最も熱安定性が高く、pH 上昇とともに低下した。ギブス自由エネルギーは pH 5.0 で最大となり、一方で、変性エンタルピーおよびエントロピー変化量はともに pH 6.5 で最大となった。さらに、pH 4.5 から 7.5 の範囲において、 α -ヘリックス含量と変性エンタルピー変化量との間で、直線的な相関が認められた。すなわち、蛋白質の構造形成に関わる熱力学量は、ギブス自由エネルギーではなく、エンタルピー変化量として反映されることが明らかとなった。以上より、生理的 pH に近い条件においては、全ての熱力学量が最安定状態とはならないが、この状態が特異的な機能発現に重要であると考えられる。

Chapter 4: Thermodynamic effects of multiple conformations of R3 on stability and DNA binding of R2R3.

(R3 の構造多型性が R2R3 の安定性や DNA 結合に及ぼす熱力学的寄与)

R3 の I155L/I181L 変異体は、多型構造をとることが NMR 解析により報告されており、これは置換アミノ酸側鎖の構造エントロピーの増大に起因すると考えられている。本研究では、R2R3 変異体を用いて、これらの構造多型性が安定性や DNA 結合に及ぼす影響を、熱力学的に解析した。CD および DSC による熱変性解析から、I155L の熱安定性は野生型と同程度であったのに対し、I155L/I181L では明らかに低下した。また、野生型の変性中点温度における熱力学量の比較から、I155L/I181L では野生型と比べ、変性エントロピー変化量が相対的に小さかった。さらに、等温滴定熱量計を用いた DNA 結合解析から、I155L/I181L では結合エントロピー量に依存した結合定数の低下が認められた。以上より、I155L/I181L では DNA 結合前の立体構造の揺

らぎが大きくなり、これが熱安定性や DNA 結合のエントロピー量に反映されたものと考えられる。すなわち、側鎖の構造エントロピーの増大が、蛋白質の立体構造や機能に反映され、これらを定量的に実証したと言える。

Chapter 5: Thermodynamic effects of a linker region between R2 and R3 on stability and structural dynamics of R2R3.

(R2R3 間リンカー領域が及ぼす構造安定性と熱力学的特性)

R2 と R3 の両リピートは、N139-P140-E141 の短いリンカーで繋がれ、独立した構造を有する。本研究では、この 3 残基から成るリンカー部位に着目し、P140 を Ala もしくは Gly に置換した変異体に加え、これら 3 残基全てを Gly に置換した変異体を構築し、リンカーの柔軟性変化が及ぼす構造安定性への影響を熱力学的に解明することを目指した。CD スペクトルから、いずれの変異体も野生型と同様の二次構造を示すことが明らかとなった。一方 DSC 測定から、全ての変異体において熱安定性の低下が認められ、それらは変性エンタルピー変化量に依存することが示された。一般にループやリンカー部位に局在する Pro 残基は、変性状態のエントロピー準位を低くすることにより、天然状態の安定性を高くする。これを踏まえると、Pro から Ala もしくは Gly の変異によって、変性状態のみならず天然状態でのエントロピー準位も高くなったと考察できる。以上より、リンカー部位に存在する Pro 残基は、各リピートの配向を決定し、機能発現に最適な構造を維持すると考えられる。

Chapter 6: General discussion and Conclusion. (総括と結論)

転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインを対象とし、比較対照となる変異体を用いて、各部位に着目した動的構造機能解析を行った。同蛋白質は、生理条件に近い温度における R2 の顕著な揺らぎが機能に必須である一方で、R3 やリンカー領域の構造揺らぎの増大は、安定性の低下のみならず、機能の低下をもたらすことが明らかとなった。さらに生理的 pH 条件下においては、熱力学的にも最安定な構造をとらないまでも、これらが機能と深く関わる状態であることが示された。以上、生理的条件下で生物が機能する環境に応じ、個々の蛋白質の機能が巧妙に制御されるよう、各蛋白質の構造が溶液中で揺らいでいることを、その一例として転写因子 c-Myb を対象として、各種物理化学的手法を用いて精査し、動的構造と機能との相関を明らかにした。