

Title	Structure and Properties of the DNA Binding Domain of Interferon Regulatory Factor-2 Studied by Heteronuclear Multidimensional NMR
Author(s)	上垣, 浩一
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3094132">https://doi.org/10.11501/3094132</a>
DOI	10.11501/3094132
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	上 垣 浩 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	Structure and Properties of the DNA Binding Domain of Interferon Regulatory Factor-2 Studied by Heteronuclear Multidimensional NMR (インターフェロン制御因子2のDNA結合ドメイン, 構造と性質)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 京 極 好 正 (副査) 教 授 谷 口 維 紹 教 授 倉 光 成 紀 教 授 崎 山 文 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

Interferon regulatory factor (IRF-1,2) は、IFN- $\beta$  遺伝子及び IFN 誘導遺伝子上流に存在する 6 塩基対 GAA AGT の繰り返し配列に特異的に結合し、転写を促進 (IRF-1) もしくは抑制 (IRF-2) する転写因子である。この IRF の DNA 結合ドメインは既知の DNA 結合蛋白質と一次構造上の相同性がなく、その構造と DNA 認識機構については不明であった。そこで IRF の DNA 結合ドメインの溶液中の構造と、塩基配列認識機構を分子レベルで解明するため以下の一連の実験を行った。DNA 結合ドメインの大量発現系の構築を行い、NMR によって構造解析と DNA との相互作用を調べた。解析には発現効率、精製の簡便さ、溶解度等の理由により IRF-2 を用いた。

#### 1) DNA 結合ドメインの同定と大量発現系の構築 :

DNA 結合状態、非結合状態で IRF-2 のキモトリプシン限定分解を行い、DNA 結合状態でのみ安定な約 14KDa のペプチド断片を得た。このペプチド断片の N 末分析を行った結果、IRF-2 全体の N 末端から 110 アミノ酸残基程度の部分に対応することが判った。更に、部位特異的変異の技術により IRF-2 遺伝子中に終止コドンを導入し、113 アミノ酸残基から成るポリペプチド (IRF-2(113)) の大量産生系を構築した。精製したポリペプチドをゲルシフト法、フットプリント法で検討したところ、塩基配列特異的な DNA 結合活性を持ち、このポリペプチドが DNA 結合の機能ドメインを形成していることが判った。また、pH や温度に対してもこの IRF-2(113) は NMR の測定に充分耐え得る安定な構造ドメインであることが判った。

#### 2) 異種核多次元 NMR による解析 :

NMR を用いた構造解析において、従来の  $^1\text{H}$  2次元 NMR のみではシグナルの重なりが激しく、各シグナルの帰属が困難であった。そこで IRF-2(113) の発現ベクターを取り込ませた大腸菌を M9 最小培地で生育させ、アミノ酸特異的  $^{15}\text{N}$ 、及び  $^{13}\text{C}$  ラベルそして  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  均一ラベルした IRF-2(113) 蛋白質を調製した。アミノ酸特異的  $^{15}\text{N}$ 、及び  $^{13}\text{C}$  ラベルした IRF-2(113) を用いて  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトル測定からアミノ酸タイプ別の帰属を行った。更に主鎖の連鎖帰属は主として  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  均一ラベルした IRF-2(113) を用いて  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  の 3 重共鳴法 3 次元 NMR (HNCA, HN(CO)CA, HNCOC, HCACOC, HN(CA)CO 等) を測定する事で帰属を行った。これら一連の測定により主鎖のほぼ全ての  $^1\text{H}$  核、 $^{15}\text{N}$  核、 $^{13}\text{C}$  核の帰属を行い連鎖帰属を完了した。側鎖は 3D HCCH-TOCSY スペクトルから帰属を行った。3D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  NOESY-HSQC,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  NOESY-HSQC スペクトルから得られる主鎖間の NOE 情報より IRF-2(113) は 4 本の  $\beta$  鎖から成る反平行  $\beta$ -シートと、3 本の  $\alpha$ -ヘリックスを持つ事が明らかとなった。

また、3D  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TOCSY/NOESY-HSQC,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -TOCST/NOESY-HSQ スペクトルの測定から側鎖の  $^1\text{H}$ 核、 $^{13}\text{C}$ 核の帰属と各残基間の NOE の帰属を行い、それらのデータを元に IRF-2(113) の構造計算を行った。

#### 3) 分子動力学計算による3次元構造の構築：

計算の結果、IRF-2(113) は  $\beta$ -シート上に3本の  $\alpha$ -ヘリックスが折り畳まれている構造をしている事が判った。また、この  $\beta$ -シート中の  $\beta$ 鎖の配向は特徴的であった。このような構造を持つ蛋白質はまだ知られて無く、IRFs の DNA 結合ドメインは構造上新しいカテゴリーに分類できる転写因子である事が明らかとなった。

#### 4) DNA との相互作用の解析：

DNA との相互作用は IRF-2 の認識配列 GAAAGTGAAAGT 配列を用いて行った。測定方法は  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC スペクトルのアミド窒素/アミドプロトンのシグナルの変化を追跡した。その結果、2番目 ( $\alpha 2$ ) と3番目 ( $\alpha 3$ ) のヘリックスに変化が集中して観測された。さらに電荷の分布から3番目のヘリックスが DNA の主溝にはまり込む認識ヘリックスである可能性が高い事が判った。

### 論文審査の結果の要旨

上垣浩一君は、マウスのインターフェロン制御因子2と呼ばれる蛋白質の DNA に結合するドメイン部分を同定し、その部分蛋白質を大腸菌内で大量発現させた。発現させた部分蛋白質が DNA に結合する機能を保持していることを確認した後、安定同位体標識 NMR 法を用いて、溶液中の立体構造を決定した。さらに NMR を用いて DNA と結合する部位を同定した。このようにして決められた DNA 結合に必要な構造は、これまでわかっている真核生物の転写制御因子に含まれている DNA 結合モチーフには含まれておらず、新しい認識構造であることが明らかとなった。このことは蛋白質による核酸認識機構に新しい知見を加えたことになり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。