



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	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3094132">https://doi.org/10.11501/3094132</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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11219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誘導遺伝子の上流に存在する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意がなく、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末端分析を行った結果、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)) の大量発現系を構築した。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, HNCO, HCACO, 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。この様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, これまでに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。