



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | DNA結合蛋白質Adaとcondensinの構造生物学的及び生化学的研究                                                                                                            |
| Author(s)    | 瀧之脇, 浩人                                                                                                                                         |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47254">https://hdl.handle.net/11094/47254</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |                                                                                         |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | たきのわきひろと<br>瀧 之 脇 浩 人                                                                   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (薬 学)                                                                               |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 1 0 9 1 号                                                                           |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 3 月 23 日                                                                        |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>薬学研究科分子薬科学専攻                                                        |
| 学 位 論 文 名     | DNA 結合蛋白質 Ada と condensin の構造生物学的及び生化学的研究                                               |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 宇 野 公 之<br>(副査)<br>教 授 田 中 徹 明    教 授 北    泰 行    教 授 今 西    武<br>助教授 大久保忠恭 |

#### 論 文 内 容 の 要 旨

生命の基本過程である転写・複製等の現象は、様々な蛋白質と DNA の相互作用によって厳密に制御されており、その異常はしばしば細胞機能の変化や細胞死を引き起こす。したがって、各蛋白質が、どのようにして適切に DNA 分子の特定の部位を認識し、また、どのような機構で蛋白質-DNA 相互作用を制御しているのか、を解き明かすことは重要である。本研究では、原核生物の DNA の修復と転写過程および真核生物の染色体凝縮過程に着目し、大腸菌由来の DNA 修復蛋白質 Ada とヒト由来の DNA 凝縮蛋白質 condensin の構造生物学的及び生化学的研究を行った。

Ada は、DNA の修復反応に伴うシステイン 1 残基のメチル化により DNA 結合能が大幅に上昇し、DNA 修復蛋白質から転写制御因子へ機能をスイッチさせる蛋白質である。Ada の N 末 16 kDa のドメイン (N-Ada16k) が機能スイッチを行う最小ドメインであることが明らかになっていたが、その活性化の機構は未解明であった。そこで、Ada の機能スイッチ機構を原子レベルで明らかにするためにメチル化型 N-Ada16k の溶液中の立体構造決定を行った。N-Ada16k は、DNA 上のメチル基を自身のシステイン残基へ不可逆的に転移して DNA 損傷を修復する。これまでの構造生物学的知見から、N-Ada16k には、立体構造保持に重要な 1 個の亜鉛イオンが配位していることが知られており、その配位子は 4 つの保存されたシステイン残基 (Cys38、Cys42、Cys69、Cys72) であることが明らかにされていた。しかし、DNA 上のメチル基を受容するメチル化部位の残基については Cys38 もしくは Cys69 が可能性として示唆されていた。そこで、NMR と質量分析の異なる 2 種類の方法を用いることにより、N-Ada16k のメチル化部位の同定を行った。まず、NMR を用いて、N-Ada16k の非メチル化型・メチル化型の主鎖及び側鎖の帰属を行った。選択的な安定同位体標識と HMBC 法を組み合わせた実験の結果、メチル化部位は Cys38 であることが明らかになった。一方、質量分析法によっても、メチル化部位の同定を行った。還元アルキル化とプロテアーゼ処理を行うことで、メチル化されたペプチドフラグメントの検出を行うことができた。さらに、タンデム型質量分析法により、Cys38 が N-Ada16k のメチル化部位であることが示された。このようにして、これまで不明瞭であった N-Ada16k のメチル化部位を疑問の余地無く明らかにした。次に、同定したメチル化部位 (Cys38) を基に、メチル化型 N-Ada16k の溶液構造を決定した。その結果、N-Ada16k が 2 つのサブドメイン、Zn(Cys)<sub>4</sub> 四面体配位 (zinc-thiolate center) を持つ methyl transferase (MTase) サブドメインとヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持つ helical サブドメインから構成されていることを明らかにした。そして、亜鉛イオンに配位した 4 つのシステイン残基のうち、非反応性の 3 つの

システイン残基が  $\text{NH}\cdots\text{S}$  水素結合を形成できることを見出した。一方、Cys38 の近傍には水素結合供与体が全く存在していなかった。そのため、Cys38 は固有の求核性を維持することができ、メチル化 DNA を選択的に修復することができると考えられた。また、蛋白質/DNA 複合体を用いた NMR 実験の結果、システイン残基のメチル化後、MTase サブドメインが新たに配列特異的に DNA に結合することを明らかにした。MTase サブドメインのメチル化前後での立体構造を比較したところ、これまで提唱されていた顕著な立体構造変化は観測されなかった。蛋白質表面電荷の比較より、zinc-thiolate center 周辺の負電荷がメチル化型で著しく減少していることを見出した。このことから、非メチル化型 MTase サブドメインでは DNA と zinc-thiolate center の間に生じる負電荷の静電反発力によって、DNA との相互作用が抑制されていると考えられた。そして、Cys38 のメチル化に伴う蛋白質-DNA 間の静電反発力の減少により、メチル化型 MTase サブドメインが配列特異的に DNA に結合するというモデルを提案した。

一方、condensin は、細胞分裂期において、染色体を凝縮させ、ゲノム情報を正確且つ均等に娘細胞へと分配させるために必須な巨大なヘテロ 5 量体である。condensin の研究は細胞レベルでの研究が主で、個々の構成蛋白質の正確な機能についてはほとんど知られていないのが現状であった。そこで、これまで顕微鏡レベルでの解析が主体であった condensin の各構成蛋白質の会合様式に着目し本研究を行った。condensin の各構成蛋白質間の相互作用様式に関しては、2 種類の SMC 蛋白質 (hCAP-E、hCAP-C) がヘテロダイマーを形成すること、3 種類の non-SMC 蛋白質 (hCAP-H、hCAP-G、hCAP-D2) がヘテロ 3 量体を形成することが報告されている。しかしながら、それ以外の会合様式はほとんど明らかにされていない。そこで、condensin の相互作用部位として重要と考えられているヒト由来 SMC 蛋白質 hCAP-E および hCAP-C のヒンジドメインの会合様式、さらに hCAP-C と 3 種類の non-SMC 蛋白質との会合様式の解析を行った。まず、hCAP-E および hCAP-C のヒンジドメインの会合様式を定量的に解析するため、大腸菌を用いた大量発現系を構築した。そして、ヒンジドメインの超遠心分析により、溶液中で hCAP-C のヒンジドメインがモノマーとして存在し hCAP-E のヒンジドメインがホモダイマーを形成すること、両者を混合すると速やかにヘテロダイマーを形成することを見出した。このことは、細胞中で活性な condensin の hCAP-E/hCAP-C ヘテロダイマーが hCAP-E ホモダイマーと hCAP-C モノマーより形成されることを示唆した。また、hCAP-E のヒンジドメインを利用した免疫沈降法解析により、細胞内における hCAP-C と non-SMC 蛋白質の会合様式を解析し、hCAP-C に hCAP-H と hCAP-D2 が結合することを見出した。以上の知見に基づき、condensin ヘテロ 5 量体の形成過程モデルを提案した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究で申請者は NMR を主とした構造生物学的及び生化学的アプローチにより生命の基本過程である転写・複製に関連した 2 種類の DNA 結合蛋白質 Ada と condensin の機能解明を行った。DNA 修復活性及び転写制御活性を持つ大腸菌由来 Ada 蛋白質に関しては、DNA 修復型及び転写制御型の溶液中の立体構造を高分解能で決定し DNA 修復反応の機構を解明した。また様々な DNA 複合体の NMR 解析の結果、Ada 蛋白質の転写制御因子への機能スイッチ機構のモデルを提出した。さらに DNA 修復反応に伴うメチル基の受容残基に関して NMR と MS を用いてこれまでに報告されていた受容残基の誤りを是正した。細胞分裂期に染色体凝縮活性を有するヒト由来 condensin に関しては、超遠心分析法と免疫沈降法を用いて構成サブユニット及びドメインの解析を行い condensin ヘテロ 5 量体の形成過程モデルを提案した。

上記の成果は転写・複製機構の解明に向けた基盤となるもので医薬品の作用、制御機序に関して有用な知見を与えるものと考えられ博士（薬学）の学位論文として相応しいものと認める。