

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	生体高分子構造学講座 (箱嶋敏雄)		
氏名	藤井佳史	提出	平成 11年 1月 7日
題目	Crystallographic studies of transcription factors bound to DNA: IRF-2/DNA and Pap1/DNA complexes. (転写因子/DNA複合体における結晶学的研究; IRF-2/DNA複合体とPap1/DNA複合体)		
<p>要旨</p> <p>IRF-2/DNA複合体</p> <p>インターフェロン制御因子(interferon regulatory factor;IRF)ファミリーはウイルス感染への応答や、インターフェロン誘導遺伝子群の制御に重要であり、そのN末に高い相同性を示すDNA結合領域もっている。その認識配列の多くがGAAANNGAAAというGAAAコア配列がタンデムに並んだものであり、こうしたGAAAの繰り返しが協同してDNA結合や活性を上昇させることは分かっていたが、こうしたタンデムリピートに何分子のIRFが結合し、どのようにして協同効果をもたらすのかは不明であった。今回、我々はIRF-2とタンデムリピートを有するDNAとの複合体の結晶構造を分解能2.2 Åで解析し、これまでGAAAコア配列を認識して結合すると考えられていたものが、実はAANNGAAAを認識していることを初めて明らかにした。我々はこの配列をIRS(IRF recognition sequence)と名付けた。このIRSの5'側のAA(AANNGAAA)はファミリー内で完全に保存されたHis40によって水を介してマイナーグループ側から認識されており、3'側のGAAA(AANNGAAA)は認識ヘリックスα3によって直接または水を介した塩基認識が行われていたことを明らかにした。更に我々は、タンデムリピートがもたらす協同効果がIRF同士の分子間相互作用によるものではなく、IRFがDNAの構造変化を促し次の分子がDNAに結合しやすい状態を誘導していることを明らかにした。こうした協同効果は、以前より様々な転写因子で予測されていたが、我々が構造を通して初めてこの機構を証明することができた。また、認識ヘリックスのC末に金属イオン結合部位を同定し、こうしたモチーフがいくつかのDNA結合蛋白質に共通のものであることを示唆した。また、いくつかのプロモーター上でのIRFを含む転写因子複合体のモデルを作製し、その協調機構を考察した。</p> <p>Pap1/DNA 複合体</p> <p>分裂酵母は出芽酵母より真核生物に近く、ストレス応答のような真核細胞の基本的な機能であるが、複雑で理解しにくい場合のモデル細胞として非常に重要である。ヒトのストレス応答にMAP kinaseを介した経路(JNK/c-Jun and p38/ATF-2)が重要であるように分裂酵母においても同様の機構(Sty/Pap1 and Sty/Atf1)が存在し、酸化・多種薬剤耐性・浸透圧ストレス応答などの機構が明らかになりつつある点でも注目される。分裂酵母由来のPap1は複数の薬剤耐性に重要な転写因子として同定され、ヒトc-Junにホモロジーを持ったロイシンジッパー型(bZIP)の転写因子である。Pap1は特徴的な配列TTACGTAA配列を強く認識し、さらにbZIP領域はこれまで構造解析されているGCN4, c-Jun, c-Fosとは低い相同性しかなく、塩基認識に重要なアミノ酸やその認識配列も上記のものとは異なっていた。今回、我々はPap1とDNAの複合体の結晶構造を分解能2.0 Åで解析し、Pap1特有のアミノ酸であるGlu20とPhe23がいかんしてPap1配列を認識しているかを明らかにした。また、bZIPスーパーファミリー内で完全に保存されたアミノ酸Asn16とArg24のうちAsn16の塩基認識が柔軟性をもち、このアミノ酸が配列に応じて塩基認識を変換する機構がbZIPの認識の多様性に関与していることを示唆した。また、ジッパー領域でのホモあるいはヘテロダイマー化の機構の考察を行い、Pap1がホモダイマーでより存在しやすいことを示唆した。</p>			

論文審査結果の要旨

申請者氏名 藤井 佳史

平成11年1月7日に提出された論文は、X線結晶解析の方法を用いた転写因子、マウス由来のインターフェロン制御因子IRF-2及び分裂酵母Pap1、のDNA結合ドメインと認識DNAオリゴマーとの三次元構造決定とその構造に基づいた分子機能のメカニズムの解明からなる。

三次元構造決定では、試料の調製、結晶化、高分解能の観測強度データの収集ならびに重原子誘導体結晶を用いた重原子同型置換法による位相決定を経て、精度の高い三次元構造の精密化がなされている。特に、通常、良質のデータを得ることが極めて困難な蛋白質/DNA複合体の系においての高い分解能（IRF-2/DNA複合体で分解能2.2Å、Pap1/DNAの分解能2.0Å）での位相決定は、良質な結晶の調製と精度の高い観測強度データの収集において特筆すべきである。また、IRF-2/DNA複合体は結晶学的な非対称単位中に6分子のIRF-2と3分子の二本鎖DNAを含み、総分子量が100KDaに及ぶ複合体であり、巨大複合体の構造解析という観点からも評価できる。X線による原子レベルの三次元構造決定とは、蛋白質やDNAの調製などの生化学実験から、X線強度データ収集などの物理実験、そして位相決定や構造解析における数値計算を含んでいるが、それらの方法についての高い専門的知識と技術を修得していると判断した。

分子機能とそのメカニズムについては、その精度の高い三次元構造に基づいて詳細な構造学的な議論と、多くの関連した生化学的データを引用した機能についての慎重な考察の結果として結論されており、十分な妥当性が認められる。IRF-2/DNA複合体においては、認識配列AA NNGAAAの同定と塩基認識のメカニズムの解明、DNAらせん構造の構造変化を通じたDNA結合の協同性とカリウムイオンを配位した新しいDNA結合モチーフの発見、他の転写因子や基本転写因子との構造的な相互作用の検討に基づいた転写活性化の素過程の考察であり、また、Pap1/DNA複合体においては、認識配列TAA CGTTAの塩基認識のメカニズムを解明することにより、真核細胞に普遍的に存在するDNA結合モチーフの一つであるロイシンジッパーモチーフによる塩基認識の多様性のメカニズムの一つを解明したことである。

以上のように、本論文は転写因子の構造生物学に新しい概念と貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。