

特殊なDNA構造に結合する新規タンパク質の同定とその立体構造予測に関する研究

●胡桃坂 仁志

早稲田大学理工学部 電気・情報生命工学科

〈研究の目的と進め方〉

生命活動に必須である、特殊なDNA構造を識別して結合するタンパク質を、配列情報から同定して、その高次構造と機能を予測するための基礎的な情報を得ることを目的とする。研究の進め方を図1に示す。

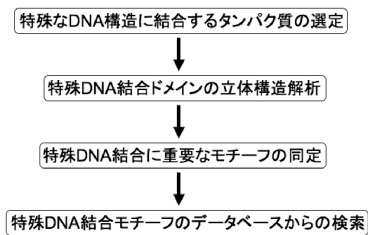


図1 研究の流れ

立体構造情報の不足のため、これまでに特殊なDNA構造を認識するDNA結合タンパク質をデータベースより検索することが事実上不可能であった。そこで、すでに報告されている特殊なDNA構造に結合するタンパク質を選定し、それらの立体構造をX線結晶構造解析法により決定する。得られた高次構造情報をもとに、部位特異的変異導入法によってDNA結合能に欠損を持つ変異タンパク質を作製し、それら特殊DNA結合タンパク質のDNA結合領域のマッピングを立体構造上で行う。そして、特殊DNA結合に重要なモチーフの同定を行う。また、DNAとの複合体として結晶かに成功したものは、タンパク質-DNA複合体の立体構造より直接DNA結合モチーフの同定を行う。得られたモチーフの配列情報を利用して、データベースからの新規特殊DNA結合タンパク質の同定を目指す。

〈研究開始時の研究計画〉

2003年度は「特殊なDNA構造に結合する新規タンパク質の同定とその立体構造予測に関する研究」という課題名で研究を行った。

- 1) 特殊なDNA構造として、二重鎖DNA切断修復や複製、転写の際に形成される単鎖DNA構造、DNA複製や転写の調節領域に存在するメチル化DNA構造、DNA組換え時に重要な引き伸ばされたDNA構造、そしてゲノムDNAの複製開始や染色体構造維持に重要と考えられている特殊なDNA配列などを選定する。そして、それらの特殊なDNA構造に結合するタンパク質の代表例として、大腸菌RecAタンパク質およびそのホモログ(Dmcl1およびRad51) (単鎖DNAに結合、引き伸ばされたDNAに結合)、大腸菌SeqAタンパク質 (メチル化DNAに結合)、そして大腸菌もしくは好熱菌DnaA (複製開始点DNAに結合) を選び、それらのタンパク質をリコンビナントとして大量発現精製する系の確立を行う。
- 2) 精製したRecA、Dmcl1、Rad51、SeqA、およびDnaAの結晶化を、それぞれのタンパク質単体および特殊なDNAとの複合体として行う。

- 3) RecA、Dmcl1、Rad51、SeqA、およびDnaAのDNA結合ドメインの同定を、変異体作製法にて行い、それぞれのタンパク質のDNA結合ドメインの結晶化を行う。
- 4) 得られた結晶を用いて、特殊なDNAに結合するタンパク質の立体構造を決定する。

2004年度は「単鎖DNA結合タンパク質の新規立体構造モチーフ解析とデータベースからの検索」という課題名で研究を行った。

- 5) 特殊なDNA構造としてDNA組換え時に重要な引き伸ばされた単鎖DNAを中心に、その結合タンパク質である大腸菌RecAタンパク質、ヒトRad51タンパク質、およびヒトDmcl1タンパク質を選定し、これらのタンパク質を大量発現・精製する。
- 6) 精製したRecA、Rad51、およびDmcl1の結晶化を、それぞれのタンパク質単体および単鎖DNAとの複合体として行う。
- 7) 得られた結晶を用いて、単鎖DNAに結合するこれらのタンパク質の立体構造を決定する。
- 8) 立体構造情報に基づいた部位特異的変異導入法により、単鎖DNA結合に必要な領域のマッピングを行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) 大腸菌RecA、ヒトDmcl1およびRad51、大腸菌SeqA、大腸菌DnaAをリコンビナントタンパク質として、大腸菌にて大量発現し、効率よく精製する方法を確立した。また、ヒトセントロメア特殊DNAに結合するCENP-Bタンパク質は、その二量体形成によって特殊なDNA構造を識別すると考えられている。そこで、新規特殊DNA結合モチーフのDNA認識に重要であると考え、CENP-Bの二量体形成ドメインを解析対象に加え、その大量発現・精製系を確立した。
- 2) 精製したRecA、Dmcl1、Rad51、SeqA、DnaAの結晶化を、それぞれ全長タンパク質を用いて行った。その結果、RecA、Dmcl1、Rad51については単結晶を得ることができた。
- 3) SeqAおよびDnaAのDNA結合ドメインの同定を、欠失変異体作製法にて行い、それぞれのタンパク質のDNA結合ドメインをリコンビナントタンパク質として大量精製することに成功した。
- 4) SeqAのDNA結合ドメインとヘミメチル化DNAとの複合体の結晶化に成功し、SeqA-DNA複合体の立体構造決定に成功した(2)。また、CENP-B二量体ドメイン(1)およびDnaAのDNA結合ドメインとターゲットDNAとの複合体の結晶構造解析にも成功した(図2と3)。

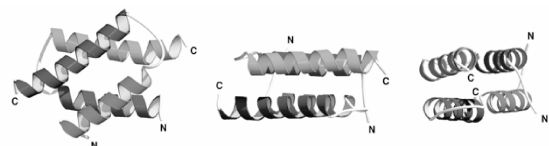


図2 CENP-B二量体形成ドメインの結晶構造



図3 SeqAのDNA結合ドメインとヘミメチル化DNAとの複合体の結晶構造

- 5) 大腸菌RecA、ヒトDmc1、およびRad51をリコンビナントタンパク質として、大腸菌にて大量発現し、高純度に精製した。
- 6) 精製したRecA、Rad51、およびDmc1の結晶化を行った。その結果、Dmc1の単結晶の作製に成功した(3)。
- 7) 得られたDmc1の単結晶を用いて、Dmc1単体の立体構造を決定することに成功した(図4)(3)。

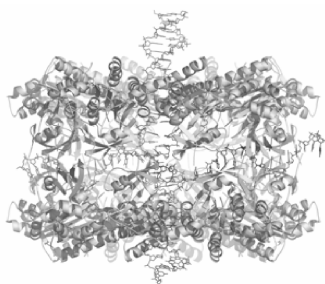


図4 Dmc1と単鎖および二重鎖を含む特殊DNAとの複合体のモデル図

- 8) 立体構造に立脚したDmc1の変異体解析によって、単鎖DNAとの結合部位の同定を行った。そして立体構造上の新規単鎖DNAモチーフをマッピングすることができた(3)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

SeqAと特殊DNAであるヘミメチル化DNA複合体の立体構造は、残念ながら米国のグループに先に発表されてしまったが、その結合水を介した特殊なヘミメチル化DNA認識機構は、本研究によって初めて明らかにされた。このような認識機構にてメチル化DNAを識別し、結合する例は未だになく、新規の特殊DNA認識モチーフを明らかにしたといえる。また我々は、これまでにヒト染色体のセントロメア領域に存在する特殊なDNA配列に結合するタンパク質、CENP-BのDNA結合ドメインとその特殊湾曲DNAとの複合体の結晶構造解析に世界で初めて成功しているが、その特殊DNA識別機構には、CENP-B自身の二量体化が重要な役割を果たすことが近年明らかになった。そこで、CENP-Bの二量体形成ドメインを解析対象に加え、その立体構造をX線結晶構造解析によって明らかにすることに成功した。この解析によって、離れた領域に存在する認識配列を、単一のタンパク質によって認識する分子機構のモデルを提案することができた。このように、特殊配列が空間的に離れて存在する例は、ゲノム中で多数みられており、CENP-Bにみられる二量体形成モチーフをデータベースから検索することにより、同様の性質を持つDNA結合タンパク質を検索することが

可能になると期待された。また、DNA組換え、二重鎖切断修復、またDNA複製時に重要と考えられる特殊な単鎖DNAに結合するタンパク質として、大腸菌RecAタンパク質を選定して、立体構造解析のための結晶化を、単鎖DNAとの複合体として行ったが、良質の結晶を得ることができなかった。RecA単体の立体構造はすでに報告されているが、その単鎖DNA結合領域は未だ不明瞭なままである。そこで、RecAの真核生物ホモログである、ヒトDmc1とRad51を解析対象とし、両タンパク質をリコンビナントタンパク質として大量発現し、高純度に精製した。そして両タンパク質を用いて、スパースマトリックスによるハンギングドロップ法によって結晶化のスクリーニングを行ったところ、全長Dmc1において良質の単結晶を得ることができた。この結晶を用いて、Dmc1の立体構造を、DNA結合型の一つである8量体のリングを基本とする16量体のダブルリング構造として決定することができた。本構造は世界で最初の報告であり、Molecular Cell誌の表紙を飾ったことから、世界的に高い評価をうけたといえる。また、Dmc1のリング構造に基づいた変異体解析の結果、Dmc1リングに含まれる新規の単鎖DNA結合モチーフを発見した。この発見により、特殊な単鎖DNA識別機構を明らかにする上で重要な情報を得たといえる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初計画していた、特殊DNAを識別して結合する新規タンパク質をデータベースから検索して同定するところまで研究が進展しなかった。その理由としては、今回決定することに成功した3種の特殊DNA識別に関わるタンパク質構造はいずれも新規構造であり、ホモログなどの類似タンパク質構造情報が未だ不足しているため、統計的アプローチを必要とするデータベース検索のためには、未だ情報不足であったためである。今後、同様の構造を有するもしくは同様の特殊DNA構造を識別するタンパク質群の構造解析数を増やし、データベース検索に活用できる特徴を見いだすことが重要であることが、本研究を通して判明した。

〈今後の課題〉

立体構造を決定する手法としては、X線結晶構造解析が最も進歩した方法といえるが、結晶化および解析に時間がかかることが難点でもある。本研究期間中に統計的アプローチに利用できる十分な数の構造解析を行うためには、網羅的にタンパク質精製および結晶化のスクリーニングを行うシステムの設計および構築が必要であると考えられた。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0403041042
Tawaramoto M.S., Park, S.-Y., Tanaka, Y., Nureki, O., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S., Crystal structure of the human centromere protein B (CENP-B) dimerization domain at 1.65-Å resolution., J. Biol. Chem., 278(51), 51454-51461 (2003).
2. 0403041049
Fujikawa, N., Kurumizaka, H., Nureki, O., Tanaka, Y., Yamazoe, M., Hiraga, S., and Yokoyama, S., Structural and biochemical analyses of hemimethylated-DNA binding by the SeqA protein, Nucleic Acids Res., 32(1), 82-92 (2004).
3. 0502182052

Kinebuchi, T., Kagawa, W., Enomoto, R., Tanaka, K., Miyagawa, K., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. Structural basis for octameric ring formation and DNA interaction of the human homologous-pairing protein Dmcl, *Molecular Cell*, 14(3), 363-374 (2004).