

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：82110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700354

研究課題名(和文) DNAの力学特性の配列依存性を利用して転写因子結合部位予測の精度を改善する

研究課題名(英文) Improvement of predictions of transcription factor binding sites using sequence dependent deformability of DNA

研究代表者

角南 智子(SUNAMI TOMOKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究職

研究者番号：50554648

研究成果の概要(和文)：DNAや転写因子が結合相手に合わせて構造変化を生じることは、転写因子結合部位の予測を難しくしている重要な要因である。当研究では予測精度を向上させるための情報を収集することを目的として、DNA界面で生じる構造変化の特徴を解析した。その結果、DNA界面では、他の分子表面と比較すると構造のフレキシビリティが高く、特徴的なアミノ酸組成を有していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Deformation of DNA and transcription factors upon complex formation makes prediction of transcription factor binding sites difficult. In this study, we analyzed conformational changes of proteins in DNA interfaces. Our results showed that fragments of proteins to be DNA interfaces have intrinsic flexibility and are composed of amino acids that have high flexibility and DNA binding capability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：転写因子、蛋白質・DNA相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体内での遺伝子の発現は、転写因子が配列特異的にゲノムDNAの特定の箇所に結合することによって制御されている。この機構を解明するためには、ゲノム中のどの配列にどの転写因子が結合するのかを正確に予測することが必要である。ところが、転写因子はただひとつの配列に特異的に結合するわけではなく、似たような他の配列にも結合するので、転写因子が結合する領域を正確に予測することが難しい。このような現象は、DNAや転写因子が古典的に考えられてきた固い分子ではなく、結合時に結合相手に合わせて構造変化を生じることが大きな原因であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、以上の背景から、DNAや転写因子がお互いに相互作用する際に、どのような三次元構造の変化を生じるのかを調べることで、転写因子の予測精度を向上させるための情報を収集することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、転写因子がDNAの結合によって、どのような構造の変化を生じるのかを解析するために、まずは、公共の生体高分子の構造データベース(PDB)より蛋白質・DNA複合体のX線結晶構造を入手した。同時に、この複合体中の蛋白質と相同性を有し、かつDNAと結合していない蛋白質の構造も同データ

ベースから抽出し、これを非結合状態の蛋白質の構造として扱うこととした。なお、十分なデータ数を確保するために、本データセットには、転写因子以外の DNA 結合蛋白質も含まれた。

今までの研究では、蛋白質の構造を解析するためには、 α ヘリックスや β シートのような古典的な二次構造による分類法がよく用いられてきた。ところが、二次構造は主鎖の水素結合にのみ注目しているため、蛋白質が複合体を形成する場合に生じる複雑な構造の変化を正確に捉えるには十分ではない。そこで、我々は、Kolodnyらによって報告されている蛋白質の局所構造ライブラリ[1]を用いることにした(図1)。このライブラリは蛋白質構造を4アミノ酸長ごとの局所構造の集まりと考え、この4アミノ酸長のフラグメントをC α 原子位置にもとづいて分類したものである。このようなライブラリを用いることで、二次構造よりも詳細に蛋白質の構造を分類できることが報告されている。我々は入手したDNA結合蛋白質の三次元構造を4アミノ酸ごとのフラグメントに分割し、それぞれのフラグメントごとに、この局所構造ライブラリにもとづいて、A-JもしくはY(X線解析によって、構造が見えていない領域。このフラグメントはフレキシブルに動く性質をもつ局所構造であると考えられる)と名付けられた構造のどれかに分類し、DNAとの結合によって、どの構造からどの構造に変化するのかを解析した。

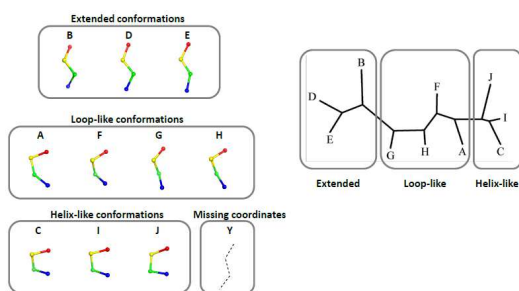


図1. 本研究で用いた局所構造ライブラリ。左がライブラリの各フラグメントの3次元構造。ボールアンドスティックの各点がC α 原子を示す。右が系統樹による構造分類。

4. 研究成果

我々は、3.で示した方法を用いて、DNAの結合によって生じる構造変化の特徴を明らかにするために、データセットをDNAの界面に存在するフラグメント群と、それ以外の分子表面に存在するフラグメント群とに分割した。そして、以下の3点について、両者

の構造変化の特徴を比較することで、DNA界面で特異的に生じる構造変化を抽出した。

(1) 構造変化の頻度

まずは、DNA結合による構造変化の頻度の違いを解析した。結果を図2.左に示す。DNAの界面では23.1%、それ以外の領域では14.7%のフラグメントで構造変化が観察され、DNAの界面のほうがより構造変化の頻度が高いことがわかった。なお、頻度の計算には、すべての構造変化を等価として扱った。

次に、DNAの界面で見られる高頻度の構造変化が、DNA界面が元々持っている構造のフレキシビリティによるものなのか、それとも元々固い分子表面にDNAとの相互作用によって引き起こされたものなのかを明らかにするために、DNAの非結合状態で、複数のX線構造が明らかにされている蛋白質同士でどの程度の構造変化が相互に見られるのか(これは、DNA非結合状態での構造の多様性を表すと考えられる)を解析した。結果を図2.右に示す。DNAの界面では24.4%の領域で構造変化が見られたが、それ以外の領域では14.1%の領域でしか構造変化が観察されなかった。この結果から、DNAの界面はもともと構造のフレキシビリティが高く、そのために、DNAの結合によって構造変化を生じやすいことが示唆された。

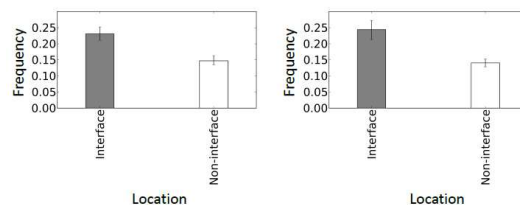


図2. 左がDNA結合によって生じた構造変化の頻度、右がDNA非結合状態で複数の構造が存在する場合の非結合状態各構造間の構造変化の頻度。

(2) 構造変化する局所構造の特徴

次に、我々はDNA・蛋白質相互作用で見られる構造変化の特徴をより詳細に明らかにするために、DNAの結合時に構造変化によって形成された局所構造の分布を、DNA界面とそれ以外とで比較した。結果を図3に示す。この図から、DNAの結合によって、DNAの界面では、延びた構造であるBやヘリックスの代表構造であるC、ループ型のH構造が形成されると共に、Y構造が減ったことが見て取れる。このうち特に顕著だったのは、Y構造がDNAの界面で大幅に減少して

いた点である。YはX線解析で観測されなかった領域に相当する。すなわち、Y構造の大幅な減少は、元々極めてフレキシブルだった領域が何らかの構造に収束することが、DNA・蛋白質相互作用時にDNA界面で見られる構造変化の特徴であることを示している。

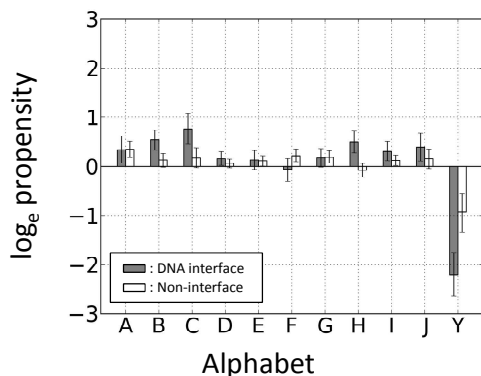


図 3. DNA 結合状態で、構造変化によって形成された局所領域の傾向。値が大きいほど DNA 結合状態でよく見られる局所構造であることを示す。

次に、この Y 構造が DNA の結合によって何か DNA 界面に特徴的な構造に変化するのかどうかを調べた。結果を図 4(a)に示す。Y 構造をとっていたフラグメントが形成する構造の分布は DNA 界面とそれ以外の領域で相互に非常によく似通っており、DNA の界面だからといって、特別な構造を形成してはいないことがわかった。

更に、もともと A-J 構造だったフラグメントが DNA 結合前後でどのような構造に変化したのかを調べたのが図 4(b)である。この結果から、A-J 型の構造に関しては、DNA の結合によって構造変化したからといって、その構造の分布自体は変わらないことがわかった。

以上の結果から、DNA の界面では、DNA の特定の官能基や何か特定の構造的特徴によってある特別な蛋白質構造が誘導されるというよりは、むしろ、元々構造を持っていなかった蛋白質領域が種々の構造に折れたたまることで、DNA の構造に適合していることが示唆された。構造変化後に B、C、H 型の構造が増えたのは、DNA 界面とそれ以外の領域に元々存在する Y 構造の割合の差に起因するのであろう。

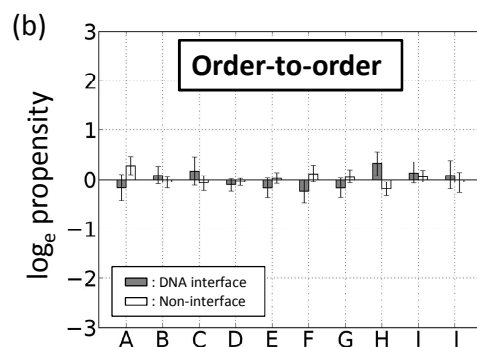
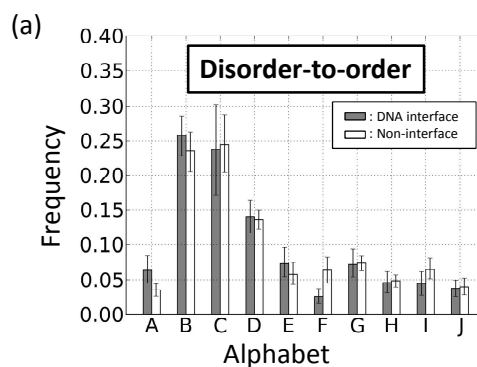


図 4. (a) 非結合状態で Y だったフラグメントが DNA 結合状態で形成した局所構造の分布、(b) A-J 構造のどれかから A-J 構造のどれかに変化した場合に DNA 結合状態で形成された局所構造の傾向。値が大きいほど DNA 結合状態でよく見られる局所構造であることを示す。

(3) アミノ酸残機の特徴

最後に、構造変化を生じている領域にはどのような物理化学的性質があるのかを明らかにするために、構造変化を生じている領域と生じていない領域でのアミノ酸の組成の差を比較した。

そのために我々は、(a) DNA の界面で構造変化を生じている領域、(b) DNA の界面で構造変化を生じていない領域、(c) それ以外の領域で構造変化を生じている領域、(d) それ以外の領域で構造変化を生じていない領域の 4 種類のフラグメント群でのアミノ酸の組成の差を調べることにした。

まずは、(b)と比較して(a)で、(d)と比較して(c)でどのようなアミノ酸が多く観察されるのかを調べた。結果を図 5(a)に示す。図に示すように、構造変化している領域では、Gly、Pro、および、親水的なアミノ酸が多いこと、疎水的なアミノ酸が少ないことが見出された。また、このようなアミノ酸組成の傾向は、DNA 界面で見られるばかりではなく、それ以外の領域でも構造変化する場合には共通して観察された。このアミノ酸組成の傾向は、

今までに Dunker らを始めとするいくつかの研究グループから報告されてきた天然変性蛋白質のアミノ酸組成の傾向[2-4]とほぼ一致している。天然変性蛋白質は、天然状態では変性状態をとっているが、リガンドがやって来た時に、それに応じて構造を取ると言われている蛋白質であり、癌抑制タンパク質 p53 が代表的な例として知られている。DNA 界面で構造変化を生じている領域が天然変性蛋白質のアミノ酸組成と似通ったアミノ酸組成を有することは、DNA 界面に、DNA の構造に合わせてその構造を変えうる性質がアミノ酸配列のレベルで存在していることを示唆している。

更に、我々は、DNA の界面が構造変化している領域であっても、DNA の界面に特徴的なアミノ酸組成を有しているのかどうかを検証するために、(c)と比較して(a)で、(d)と比較して(b)でどのようなアミノ酸が多く観察されているのかを比較した。結果を図 5(b)に示す。その結果、DNA 界面のうち構造変化している領域は、構造変化していない領域と同様に、塩基性アミノ酸や、親水性アミノ酸の一部、Gly が多く、酸性アミノ酸や、疎水的なアミノ酸はあまり見られなかった。このようなアミノ酸組成の傾向は、今までにも DNA 界面に特徴的なアミノ酸の組成の特徴として報告されてきたものと一致している。

つまり、これらの結果から、DNA・蛋白質相互作用において、DNA 界面が構造変化することと、DNA とのイオン性・水素結合性の相互作用を形成することは、双方とも、蛋白質が DNA とより強固に結合を形成するための重要な性質であることがわかる。DNA 結合蛋白質の DNA 界面は、この 2 つの性質を両立するように進化してきたのであろう。

今回の解析では、転写因子結合部位の予測精度を向上させる具体的な手法の開発にまで至らなかったが、転写因子が DNA と結合する時に生じる構造変化の構造的・配列的特徴を明らかにすることができた。この情報は、転写因子結合部位の予測精度向上のための基盤的な情報と考えられる。今後、得られた情報や他の既知の情報を用いて、転写因子の予測精度を向上させるための手法の開発を行なっていきたい。

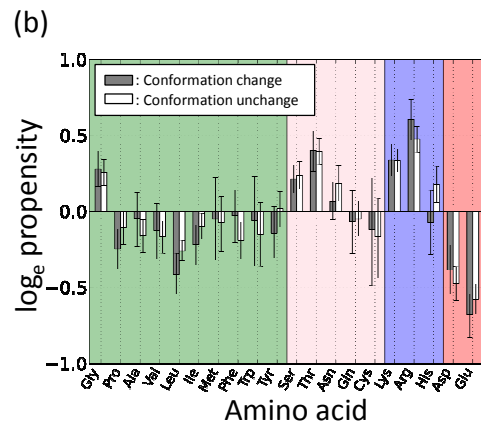
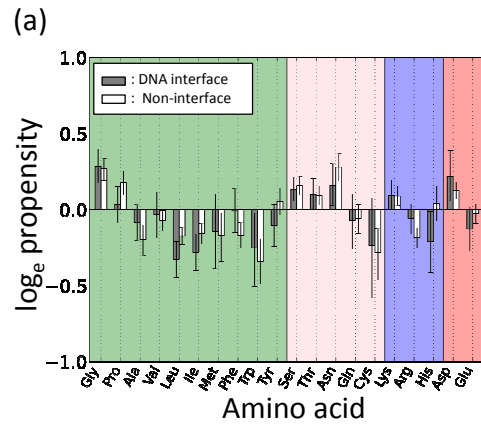


図 5 (a). 構造変化を生じる領域のアミノ酸組成の傾向。値が大きいほど構造変化している領域でよく見られるアミノ酸残基であることを示す、(b) DNA 界面のアミノ酸組成の傾向。値が大きいほど DNA 界面でよく見られるアミノ酸組成であることを示す。なお、背景の色分けは、アミノ酸の物理化学的組成の差による。

[1] R. Kolodny, P. Koehl, L. Guibas, M. Levitt (2002) *J. Mol. Biol.* **323**: 297-307.
 [2] A.K. Dunker, J.D. Lawson, C.J. Brown, R.M. Williams, P. Romero, *et al.* (2001) *J. Mol. Graph. Model.* **19**: 26-59.
 [3] P. Tompa (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27**: 527-533.
 [4] R. Linding, R.B. Russell, V. Neduva, T.J. Gibson (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**: 3701-3708.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tomoko Sunami, Hidetoshi Kono, Local conformational changes in the DNA interfaces of proteins, PLoS One, 査読有,

8(2), 2013, e56080,
DOI: 10.1371/journal.pone.0056080

[学会発表] (計 4 件)

- ① Tomoko Sunami, Hidetoshi Kono, Local Conformation Changes of proteins in the DNA interfaces, 生命医薬情報学連合大会(2012 年日本バイオインフォマティクス学会年会 情報計算法学生物学会 (CBI 学会) 年次大会 オミックス医療研究会年会)(江戸川区)、2012 年 10 月 14 日～17 日
- ② Tomoko Sunami, Hidetoshi Kono, DNA 界面での蛋白質の局所的構造変化, 日本生物物理学会 第 50 回年会 (名古屋)、2012 年 9 月 22 日
- ③ Tomoko Sunami and Hidetoshi Kono, Local conformational changes of proteins in DNA interfaces, Biophysical Society 56th Annual Meeting(米国、サンディエゴ)、2012 年 2 月 26 日
- ④ Tomoko Sunami and Hidetoshi Kono, Local conformational changes of proteins in DNA interfaces, 第 49 回生物物理学会年会(姫路)、2011 年 9 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角南 智子 (SUNAMI TOMOKO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量

子ビーム応用研究部門・研究職

研究者番号: 50554648