

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840059

研究課題名(和文) 動的構造解析によるOct3/4の多様なDNA配列認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the nonspecific DNA-binding mechanism of Oct3/4 using NMR

## 研究代表者

小沼 剛 (Tsuyoshi, Konuma)

公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・研究員

研究者番号：10631682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Oct3/4 Homeoドメイン(POUHD)のDNA認識機構を解明するため、主に溶液NMRを用いた動的構造解析を試みた。DNA滴定による化学シフト変化の定量解析から、DNAへの結合力および非特異的DNA結合状態の存在比率を明らかとした。またDNA存在下でCLEANEX-PM測定を行うことで、POUHDの天然変性領域が非特異的なDNA認識に重要であることを明らかとなった。さらにITC測定から、そのN末端領域がもともとDNAに存在している水を排除して結合することがわかった。以上の結果から、POUHDは天然変性領域をきっかけとして最終結合状態に至るというDNA結合モデルを提唱できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated dynamics of POU homeodomain (POUHD) of Oct3/4 upon DNA binding using NMR. Firstly, we titrated DNA into POUHD to characterize the conformational changes and binding kinetics upon DNA binding. The quantitative analysis of the chemical shift changes yielded kinetic parameters for POUHD binding to DNA. Subsequently, to obtain structural information on the nonspecific bound states, CLEANEX-PM was applied to POUHD in the presence of excess amounts of POUHD over DNA to increase the population of the nonspecific bound states. As a result, the amide protons of the N-terminal loop are protected from solvent by the bound DNA in the nonspecific binding states, whereas those of the helix region remain to be exchangeable with water protons. Therefore, it is suggested that the N-terminal loop first interacts with nonspecific sites of DNA, and then the stable complex with DNA is formed by locating the helix region to its specific target site.

研究分野：構造生物学

キーワード：非特異的DNA結合

## 1. 研究開始当初の背景

(1) iPS細胞の作製には4つの山中因子が必要と考えられているが、ここ数年の研究から細胞のリプログラミングに必要な転写因子の組み合わせは山中因子に限らないことが明らかとなってきた。さらにOct3/4はいずれの細胞リプログラミングにおいても必ず用いられており、他の転写因子では代替が不可能な必須の転写因子であった。このことからOct3/4は転写ネットワークを統制する“Master regulator”と考えられている。さらにOct3/4については420個もの標的遺伝子が検出されており、細胞のリプログラミングに関連する遺伝子に限らず細胞の分化、増殖、形態形成に関わる遺伝子の発現も制御していることが明らかとなってきた。しかし、これほど多くの標的遺伝子を持つOct3/4が、様々な細胞段階に応じて結合すべき標的遺伝子をどの様に効率良く選択し結合するのか、その分子機構は不明である。

(2) 転写ネットワークの制御システムを理解するには、転写因子の機能発現機構を明らかにする必要がある。転写の制御は転写因子がDNAに結合することで行われる。これまでの研究から、DNA結合蛋白質はまずDNAに非特異的に結合したのち、DNA上をスライドし特定の塩基配列を認識して結合に至るといった機構が提案されている。さらに、そのDNA探索における非特異的な結合には蛋白質の天然変性領域が関わっていることがわかってきた。天然変性とは単独では構造をとらずに、特定の蛋白質やDNAと結合してはじめて高次構造を形成するという「動的」な構造概念である。実際、Oct3/4においても長い天然変性領域が存在しておりDNA探索に関係していると考えられる。そこで本研究では、蛋白質の動的構造の観点から“Master regulator”であるOct3/4のDNA認識機構を明らかにし、それを契機として、転写ネットワークの制御システムの解明を目指した。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、天然変性領域を有するOct3/4のDNA認識機構を解明するため、主に溶液NMRを用いた動的構造解析を行う。Oct3/4はSpecificドメイン(POU<sub>sp</sub>)とHomeoドメイン(POU<sub>hd</sub>)の2つのDNAドメインを形成し、20アミノ酸残基程度のリンカーで繋がれたマルチドメイン蛋白質である。マルチドメイン蛋白質のDNA認識機構は特徴的であり、片方のドメインが非特異的にDNAと結合してDNA上をスライドし、残りのドメインが特定のDNA配列に結合して特異的複合体に至るといったモデルがシミュレーションにより提案されている。しかしながらOct3/4のDNA探索における構造情報は実際の実験から全く得られていない。そこで本研究ではマルチドメインのOct3/4に対し

て動的構造解析を行うことで、DNA結合におけるそれぞれのドメインの機能を明確にする。

## 3. 研究の方法

本研究ではOct3/4に対し、DNA存在下および非存在下で溶液NMRによる動的構造解析を行う。緩和分散測定ではマイクロ秒からミリ秒の構造変化について情報を得ることができるが、より遅い時間領域については解析できない。そこでミリ秒から数秒の間に水と交換する部位を同定できるCLEANEX-PM測定も併用することで、幅広い時間領域の構造変化について解析する。さらに過渡的な非特異的DNA複合体については、DNA量に対してOct3/4を過剰にすることで定期的に存在させて解析を行う一方、DNA滴定による化学シフト変化の定量解析および滴定型熱量計(ITC)測定から、Oct3/4とDNAとの相互作用について解離定数や化学量論を明らかにする。以上、複数の測定法を用いてOct3/4とのDNA相互作用について包括的に解析することで、多角的視点から本分子によるDNA認識機構の動的な機構を解明する。

## 4. 研究成果

(1) まず、大腸菌によるOct3/4の大量発現を行い、精製を行った。しかしながら、NMR測定条件下において凝集が生じた。そこで本分子のDNA探索に最も寄与していると考えられているPOU<sub>hd</sub>だけの発現および精製を行った。その結果、同測定条件下において凝集は観察されず、NMR測定を行うことが可能となった。そこでPOU<sub>hd</sub>のHSQC測定を行い、さらに三次元測定を利用したシグナル帰属を行った。またDNA存在下でのHSQC測定を行い、化学シフト変化を解析することでPOU<sub>hd</sub>のN末端にある天然変性領域と三番目のヘリックスがDNAとの結合に関わっていることがわかった(図1)。

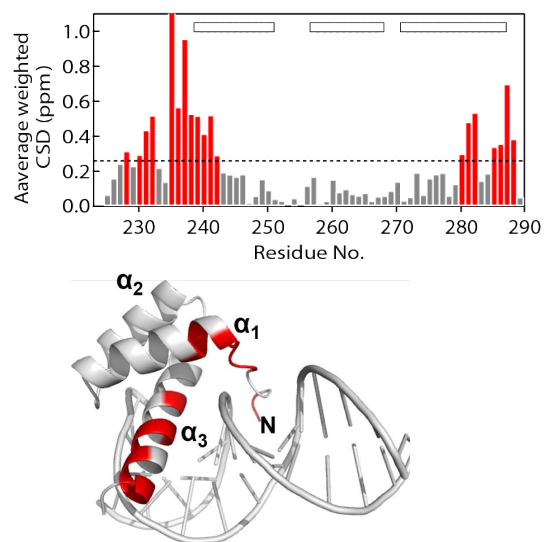


図1 DNA結合による化学シフト変化(上)およびその構造領域(下)

(2) 遊離状態から結合状態に至る過程を解明するため、Oct3/4 に DNA を少量ずつ添加し、その都度 HSQC 測定を行った。その時のシグナル変化を定量的に解析することで、DNA への結合力および特異的および非特異的 DNA 結合状態の存在比率を明らかとした (図 2)。

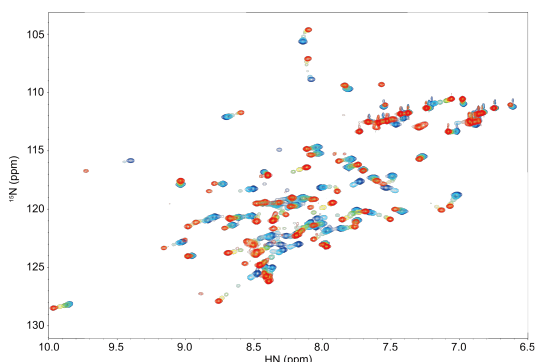


図 2 DNA 滴定による NMR シグナル変化

(3) DNA 存在下における動的構造部分を検出するため、CLEANEX-PM 測定を行った。これにより POU<sub>HD</sub> の N 末端側にある天然変性領域が非特異的な DNA 認識に重要であることを明らかとなった (図 3)。DNA 非存在下および存在下において、POU<sub>HD</sub> に対して緩和分散測定を行ったが動的構造を検出できなかった。このことから POU<sub>HD</sub> は数百マイクロ秒から数ミリ秒の時間スケールでの運動性を有していないことがわかった。

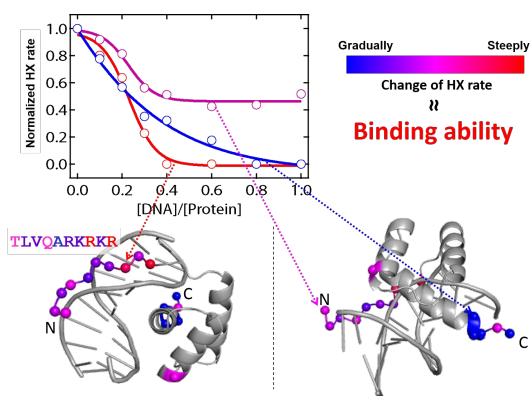


図 3 DNA 滴定に伴う溶媒露出度変化

(4) POU<sub>HD</sub> の構造形成領域と N 末端にある天然変性領域を別々にした変異体を作成した。そしてそれぞれの領域における DNA との相互作用様式を解析するため、ITC 測定を行った (図 4)。その結果、天然変性領域にある N 末端ペプチドと DNA 相互作用において、吸熱反応が確認された。このことから N 末端天然変性領域はもともと DNA に存在している水分子を排除して結合することが明らかとなった。

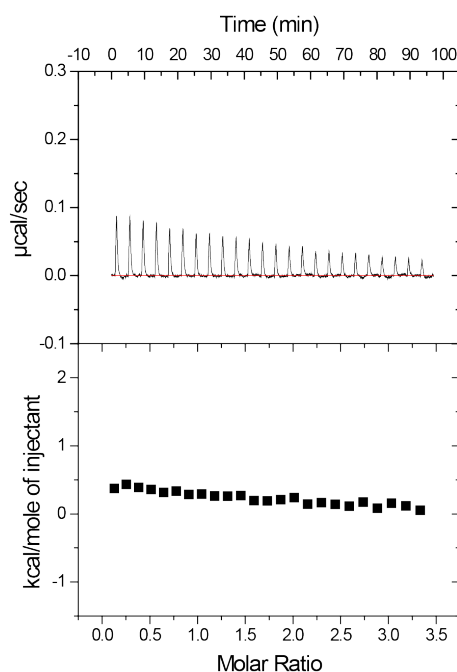


図 4 N 末端ペプチドと DNA 結合における熱量測定

(5) 野生型と天然変性領域を削った変異体に対して X 線小角散乱測定を行うことで、それぞれの分子の大きさを見積もった (図 5)。その結果、明らかに変異体より野生型の方が大きい分子サイズであることがわかった。

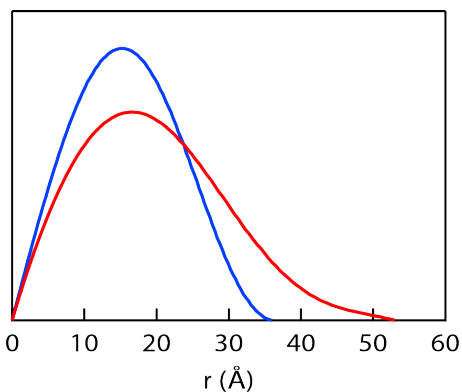


図 5 野生型の P(r)関数 (赤) と変異体の P(r)関数 (青)

(6) 以上の結果から、POU<sub>HD</sub> は N 末端にある天然変性領域をきっかけとして最終結合状態に至るという DNA 結合モデルを提唱できる。また、他の多くの転写因子でも天然変性領域を有しているため、本研究で明らかとした構造物性および DNA 結合モデルは一般性があると考えられる。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

Tsuyoshi Konuma, Erisa Harada, Kenji  
Sugase  
Elucidation of the nonspecific  
DNA-binding mechanism of the POU  
homeodomain using NMR  
Protein Society Meeting (San Diego,  
USA) Jun 27-30, 2014. Poster  
presentation

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 剛 (KONUMA, Tsuyoshi)  
(公財) サントリー生命科学財団・研究員  
研究者番号 : 1 0 6 3 1 6 8 2