

平成23年6月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570119

研究課題名（和文） CUT-homeodomain 転写因子の DNA 結合における
ドメイン間相違と協同性研究課題名（英文） Sequence-specificity and binding-cooperativity of multiple
DNA-binding domains of CUT-homeodomain transcription factors

研究代表者

山崎 和彦 (YAMASAKI KAZUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00358243

研究成果の概要（和文）：

CUT-homeodomain 転写因子の複数の DNA 結合ドメインによる DNA 結合の機構について、構造生物学、物理化学の手法を用いて解析した。転写因子 SATB1 の CUTr1 ドメインと homeodomain は、両方が協同的に TAATA 配列に結合することが、NMR 解析および等温滴定熱量測定によって明らかになった。また、SELEX 解析により、配列特異性の発現には CUTr1 が主導的な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要（英文）：

The DNA-binding mechanism by multiple DNA-binding domains of CUT-homeodomain transcription factors were analyzed by methods of structural biology and physical chemistry. NMR and isothermal titration calorimetry analyses revealed that CUTr1 domain and homeodomain of transcription factor SATB1 bind to DNA containing TAATA sequence in a cooperative manner. A SELEX experiment showed that CUTr1 has the major role in determining the sequence specificity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：構造生物学、生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：DNA 結合タンパク質、協同性と競合性、転写制御、免疫細胞分化、NMR 分光解析、等温滴定熱量分析、認識コンセンサス配列

1. 研究開始当初の背景

CUT-homeodomain 転写因子は、SATB1、CDP/Cux/Cut、HNF6a など、1-3 個の CUT ドメインと 1 個の homeodomain を有する転写因子群であり、免疫細胞の分化、染色体のサイレンシング、乳がんの悪性化、胚性幹細胞の分化、など動物固有の機能調節や医学的に重要な事象において、転写制御を行う。リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾や、細胞周期に依存的なプロテオリシスによって、機能する DNA 結合ドメインの組み合わせを変化させることにより、DNA 結合能や結合する DNA 配列を変化させるという高次の調節能を持つことが知られている。

SATB1 は 2 つの CUT ドメインと 1 個の homeodomain を持つが、私たちは、これまでの研究において、当初 DNA 結合を中心的に担うとされた N 末端の CUT ドメイン (CUTr1) による DNA 認識機構を、NMR 分光法や X 線結晶回折といった構造生物学的手法によって解析した (Yamaguchi *et al.*, 2006, *J. Biol. Chem.*, 281, 5319-5327.; Yamasaki *et al.*, 2007, *Nucl. Acids Res.* 35, 5073-5084.)。このドメインが接触している塩基の配列は 5' -CTAATA-3' 配列であったが、驚くべきことに、homeodomain が特異性をもつという配列 (Dickinson *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 11463-11470.) と一致した (図 1)。すなわち、CUTr1 も homeodomain も、同じ DNA 配列を認識するということである。さらに、SATB1 タンパク質が二量体化する条件での認識配列において、上記の配列単位が 2 つ含まれることが、研究開始直前に発表された (Purbey *et al.*, 2008, *Nucleic Acids Res.*, 272, 2107-2122.)。この場合、4 つの有効な DNA 結合ドメインが 2 つの TAATA 配列単位を認識する。

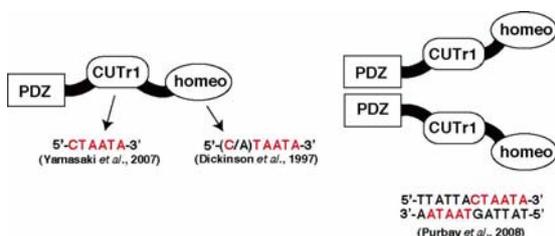


図 1 :SATB1 の複数の DNA 結合ドメイン (CUTr1、homeodomain) による DNA 認識。PDZ ドメインは二量体化に関わる。

CDP/Cux/Cut タンパク質は、3 つの CUT ドメイン (N 末端から CUTr1-r3) と homeodomain を有し、このうち 2 つ以上あれば強い DNA 結合活性をもつが、CUTr1 と CUTr2 が存在する場合は CRAT 配列 (R は A/G) のリピートを認識するのに対し、proteolysis によって CUTr1 を喪失すると、CUTr3 と homeodomain によって別の配列 (ATCGAT 配列) に強固に結合する

ようになる。

2. 研究の目的

本研究では、これらの CUT-homeodomain 転写因子の機能制御機構解明に向けて、各 CUT ドメインと homeodomain による DNA 認識機構を、主として NMR および X 線結晶解析法をもちいた構造生物学手法や物理化学的手法によって明らかにすることを目指す。SATB1 については、CUTr1 と homeodomain が共通の特異性を示す TAATA 配列に対して、互いにどのような関係で結合するか明らかにすることを目指す。すなわち、1 つの配列単位に対して、同時にどちらも結合しうる (協同的結合) か、どちらか強い方が優先的に結合する (競合的結合) か、決定することを目指す。なお、ここで、「協同性」は同時に結合することとし、各ドメインによる個別の親和性を高めることまでは意味しない。同時に結合できれば、タンパク質全体としての親和性を顕著に高めるからである。

CDP/Cux/Cut については、ドメインの組み合わせの違いによって認識配列が異なる機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、構造生物学および物理化学的な手法を用いて、解析を行う。各ドメインや融合体 (必要に応じて安定同位体標識したもの) を大腸菌の系を用いて調製し、以下の内容で研究を進める。

SATB1 について、a) CUTr1 の立体構造は解明されているが、homeodomain の立体構造は解明されていないため、NMR 法により明らかにする、b) NMR 滴定法、表面プラズモン共鳴、等温滴定熱量計により、結合の stoichiometry 等、結合に関する詳細を解明する、c) 複合体結晶化を試みる、d) CUTr1 と homeodomain それぞれの認識配列を決定する、の解析を行う。

CDP/Cux/Cut については、CUTr1-CUTr2 の組み合わせと CUTr3 と homeodomain の組み合わせによる DNA との複合体立体構造決定へ向け、結晶化を試みる。

4. 研究成果

(1) SATB1 の homeodomain の立体構造決定

NMR 法を用いて、homeodomain の立体構造を決定した。13C、15N の安定同位体標識を行い、異種核多次元 NMR 法によってシグナル帰属し、NOE 距離情報をもとに構造計算を行った。図 2 に表示のように、収束度の良い、したがって精密な構造が得られた。3 本のヘリックスからなる典型的な helix-turn-helix の構造モチーフを持ち、N 末端から 3 番目の helix が DNA 配列認識において重要な役割を

果たすと考えられる。

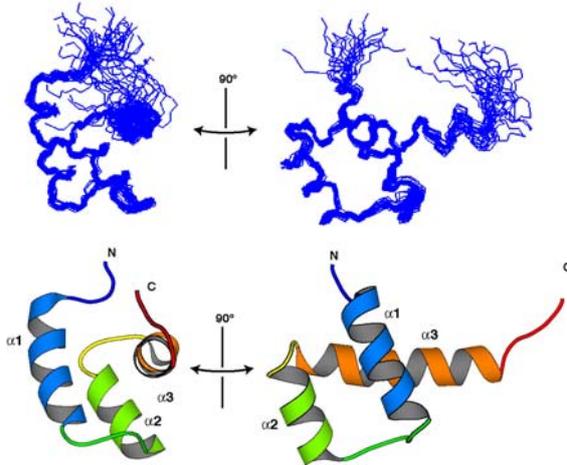


図2：SATB1のhomeodomainの立体構造。構造アンサンブルを重ねて表示したもの(上)と平均構造のリボン表示(下)。3本のヘリックスからなる。

(2) 融合タンパク質調製と表面プラズモン共鳴解析

SATB1 および CDP/Cux/CUT の各ドメインに加え、全長タンパク質のモデルとしてこれらのドメインを融合したものを調製した。特に、CUTr1 と homeodomain の融合にあたっては、リンカー部分の長さについて検討を行った(図3)。短すぎると自由度を束縛し、2つのドメインが十分にDNA結合能を発揮できない可能性があり、長すぎると不要な部分の影響で複合体の結晶化に不利となる可能性があるからである。表面プラズモン共鳴法により結合能を解析した結果、リンカー部分は、5、10、20 残基で、特に違いがなかった。本研究では、以下の解析において、主として10残基のリンカーの融合体を用いた。

なお、表面プラズモン共鳴法において、前述のTAATA配列単位を2つ含むSATB1コンセ

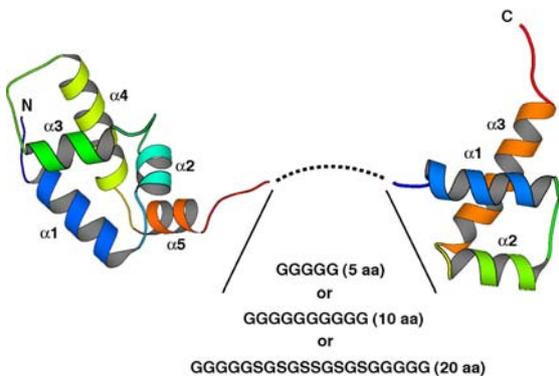


図3：SATB1のCUTr1(左、N末端側)とhomeodomain(右、C末端側)の融合タンパク質。リンカー部分を5-20残基と変えたバリエーションを調製した。

ンサス配列DNAに対するCUTr1-homeodomain融合体の結合数は2、すなわちDNA結合ドメイン数としては4であった。しかし、この方法では、2つのドメインによる結合が協同的なのか、競合的なのか区別することができない。両方の結合が十分に結合に関与した場合でも、一方のドメインのみが結合した場合でも、結合によって増加する質量が変わらないからである。一方、後述のNMR titration実験や等温滴定熱量計測による方法では、この区別が可能である。

(3) ドメインおよびドメイン融合体とDNA複合体の結晶化

SATB1のCUTr1-homeodomain融合体、CUTr1-CUTr2-homeodomain融合体、CDP/Cux/CutのCUTr1-3、homeodomainの各ドメイン、CUTr1-CUTr2融合体、CUTr3-homeodomain融合体を調製し、DNAとの複合体について結晶化を試みた。市販のスクリーニングキットを希釈したものや、各種のPEGを沈殿剤として用いたシステムで、結晶化を試み、結晶が観察された場合は、高エネルギー研究所の放射光施設において、回折像の取得を行った。残念ながら、研究期間において、解析可能な回折像を示す結晶を得ることは出来なかった。研究期間終了後も引き続き、結晶化を試みる予定である。

(4) NMR titration実験による結合の解析

15N標識したSATB1のCUTr1-homeodomain融合体に、DNAを少しずつ添加して行き、HSQCスペクトル上の化学シフト値やピーク強度の変化を観察した(図4)。このベースとな

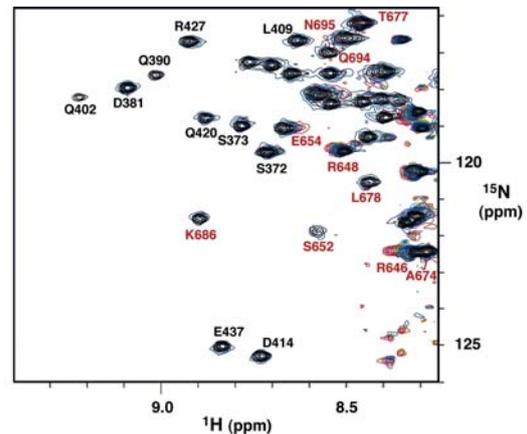


図4：NMR titration実験。CUTr1-homeodomain融合体にTAATA配列単位を2つ含むDNAを添加し(DNA/タンパク質比は、0、0.125、0.25、0.375、0.5、0.625の順に、黒、青、シアン、黄緑、マゼンタ、赤の色のクロスピーク)、1H-15N HSQCスペクトルにおけるクロスピーク強度や位置(化学シフト)の変化を観察した。黒字のピークはCUTr1由来、赤字のピークはhomeodomain由来である。

るクロスピークの帰属については、以前に行った CUTr1 のシグナル帰属、上述の構造決定において行った homeodomain のシグナル帰属に加え、融合ドメインに対する多次元 NMR を用いて行った。この結果、TAATA 配列単位を 2 つ含む SATB1 コンセンサス配列 DNA に対する CUTr1-homeodomain 融合体の結合数は、表面プラズモン共鳴と同様に、2 となること、DNA 結合により、両方のドメインの NMR シグナルが大きく影響を受けることが示された。すなわち、2 つのドメインによる 1 つの配列単位への結合は、競合的ではなく、協同的であることが強く示唆された。

(5) 等温滴定量熱計測による DNA 結合の解析
SATB1 の CUTr1、homeodomain、CUTr1-homeodomain 融合体について、等温滴定量熱計測を行った。DNA としては、TAATA 配列単位を 2 つもつ前述の DNA と、CUTr1 と DNA 複合体の結晶解析 (Yamasaki *et al.*, 2007, *Nucl. Acids Res.* 35, 5073-5084.) に用いた 1 つのみもつものへの結合を解析した。いずれのタンパク質も、a) DNA 結合によって発熱すること、b) TAATA 単位が 1 つの DNA に対しては、1 つ、2 つの DNA に対しては 2 つ結合することが判った。決定的な発見としては、タンパク質 1 mol あたりの発熱量が、CUTr1 で約 8kcal、homeodomain で約 5kcal、CUTr1-homeodomain 融合体でその和である約 13kcal になることである。すなわち、融合体において、CUTr1 と homeodomain は、両方が単独に結合する場合と同様の結合をするということである。これにより、NMR による解析結果と合わせて、両ドメインは協同的に結合するということが結論づけられた。

(6) CUTr1 と homeodomain の配列特異性の解析 (SELEX 解析)

配列をランダム化した DNA ライブラリーを用いて、タンパク質に結合する DNA を選別・増幅を繰り返し、得られた DNA に対して、次世代シーケンサーを用いた配列解析を行うことにより、認識配列を決定した。この時、タンパク質は His-tag 付きの形でビーズに固定化し、DNA を結合させた後、His-tag なしのタンパク質を用いて、タンパク質・DNA 複合体を回収した。CUTr1 を用いて得られた配列は、表 1 に、全部で 1038 個の DNA に対する配列のアラインメントを行った結果、TAATA 配列の多くの部分を認識することが判った。これに対し、homeodomain を用いた場合、有効な認識配列決定には至らなかった。これらの結果から、TAAT 配列の特異的認識には、CUTr1 が主導的な役割を果たすことが考えられる。homeodomain の寄与としては、おそらく、表 1 中の 7 番目の位置の A/G や 10 番目の位置の G/C/A を A に限定するなどが考

えられる。

表 1 : CUTr1 が結合する DNA 配列のアラインメント。ランダム化した DNA ライブラリーから結合する DNA を選別、増幅を 3 回繰り返し、次世代シーケンサーを用いて配列決定した。TRAT のコンセンサスが得られる。

Randomized Sequence	-NNNNNNNNN-	frequency
Selected Sequences	-1-3-5-7-9-11--	
	-GGGGTAATC---	64
	---CTAATCACCC	43
	---CTAATCCACC	40
	-GGGGTAATG---	40
	-GGGCTGATC---	40
	-GGGCTGATG---	40
	---CTAATCCACC	37
	-GTTCTTAATG---	35
	-GTTGGTAATG---	35
	-GGGCTGATG---	35
	-GTTCTGATC---	35
	-GGGGTAATG---	34
	-GGGCTGATG---	34
	-GTTCTGATA---	33
	-GGGGTAATG---	33
	-GGGGTAATG---	33
	-GGGGTGATA---	32
	-GGGCTTAATG---	32
	-GGGCTGATG---	32
	-GGGCTGATG---	32
	-GGGCTGATG---	32
	---CTAATCCACC	31
	---CTAATCCACC	31
	-AGGCTGATG---	31
	---CTAATCACT	30
	-AGGCTGATG---	30
	GTTGGTGAAT (G)---	30
	-GGGCTGATA---	29
	---CTAATCCACC	28
	---CTAATCCACC	27

Position	Frequency (%)					
	5	6	7	8	9	10
A	0.0	0.0	55.2	100.0	0.0	14.7
G	19.7	0.0	44.8	0.0	0.0	55.8
T	9.2	100.0	0.0	0.0	100.0	23.6
C	71.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.9
Consensus	CAG	T	AAG	A	T	G/C/A

(7) まとめ

本研究では、CUT-homeodomain タンパク質を題材として、複数の DNA 結合ドメインによる認識機構とその調節機構に関する新しい知見を得ることを目的として、実験を行った。複合体の結晶解析については、期間内に結晶を得て解析を行うことができなかったが、NMR や等温滴定量熱計測、認識 DNA 決定実験によって、協同性に関する決定的な知見を得ることができた。これは、SATB1 においては、CUTr1 が主導的に TAAT 配列単位を認識するが、homeodomain も同時に結合することができ、おそらく特異性を補完するというのである。我々が、CUTr1 との結晶解析 (Yamasaki *et al.*, 2007) によって CUTr1 によるこの配列に対する特異性を主張したのに対して、Purbayra (2008) は、homeodomain 主導であることを主張していた。本研究結果は、この議論に対して、一定の結論を出すものと考えられる。なお、本内容については、現在複数の論文としてまとめ、投稿準備をしている段階である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

① 山崎和彦、山崎智子、転写因子SATB1の複数のDNA結合ドメインによるDNA認識のNMR解析、BMB2008、2008年12月、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 和彦 (YAMASAKI KAZUHIKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメ
ディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00358243