

機関番号：74408  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21770126  
 研究課題名（和文） 天然変性タンパク質としての観点に基づく iPS 細胞誘導因子 Sox2 の動態と機能解析  
 研究課題名（英文） Elucidation of dynamics and function of an iPS cell reprogramming factor Sox2 from the view point of an intrinsically disordered protein  
 研究代表者  
 菅瀬 謙治（SUGASE KENJI）  
 公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・主席研究員  
 研究者番号：00300822

研究成果の概要（和文）：NMR 緩和分散実験から、Sox2 は遊離状態において揺らいでおり、DNA に結合する第 1 ヘリックス及びそれと接触する領域が約 2% 瞬間的にほどけていることが分かった。一方で DNA 結合型では緩和分散は観測されず、DNA 結合型はマイクロ秒からミリ秒のタイムスケールでは安定であることが分かった。これらの結果から、遊離状態で観測された揺らぎは DNA との非特異的な結合に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：NMR relaxation dispersion studies revealed that Sox2 fluctuates when it is free in solution, in particular the N-terminal helix  $\alpha 1$  and the regions contacting the helix  $\alpha 1$  are unfolded with a population of 2%. In contrast, no relaxation dispersion was observed for Sox2 in the bound form, indicating that Sox is stable in the bound form on  $\mu$ s-ms timescales. Since the helix  $\alpha 1$  binds directly to DNA, the fluctuation observed for the free form is supposed to be important for non-specific binding to DNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：分子認識及び相互作用

#### 1. 研究開始当初の背景

従来の構造生物学の見地からすると、タンパク質の立体構造と機能とは密接な相関があり、立体構造の決定が機能の解明につながると考えられている。実際に、この考えに基づいて多くの成果が報告されているが、近年、

この考えに収まりきらない天然変性タンパク質と呼ばれる特異な存在が明らかにされ始めた。天然変性タンパク質は、遊離状態において全体または長い領域で立体構造を持たない変性状態にあり、その多くはタンパク質や核酸と結合すると特定の立体構造に折

畳まれる（共役した折畳みと結合）。網羅的な配列解析からヒトのタンパク質の約3割は、単体では天然変性状態にあることが示されている。興味深いことに転写因子に限ると、実に約7割が天然変性領域を含む。この数の多さからも、生命現象を理解する上で天然変性タンパク質の挙動の理解は避けて通れない重要な研究対象と言えよう。現実には欧米では天然変性タンパク質の研究が盛んに行われ始め、激戦の兆候を見せ始めている。申請者も、米国スクリプス研究所在籍時に、最新のNMR測定法である緩和分散法を駆使して、天然変性タンパク質（転写因子 CREB の pKID ドメイン）の共役した折畳みと結合のメカニズムを世界で初めて解明した。

## 2. 研究の目的

現在、国を挙げて研究が進められている iPS 細胞を作成するのに用いられる転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) のいずれも長い天然変性領域を有する。そして、それらが柔軟に構造変化することによって多数の DNA・RNA・タンパク質と結合することが明らかになってきた。しかも、多様なターゲット分子と結合するにもかかわらず、選択性もあり何にでも結合するわけでない。さらに、それぞれが他の因子と協働して遺伝子発現を巧みに調整する。例えば、Sox2 は DNA 上で3本の  $\alpha$ ヘリックスを形成するが、それに続く塩基性の長いループ領域が、Oct3/4 を含む他の因子と相互作用する。このようなターゲット認識の多様性と選択性および協調性は、まさに天然変性タンパク質ならではの特徴である。しかしながら、iPS 細胞誘導因子の機能研究を天然変性タンパク質という観点から進めている例は他には見られない。本研究では、iPS 細胞誘導因子の特異な機能の鍵が天然変性タンパク質としての性質にあるという考えに立脚し、NMR 緩和分散法を用いて、特に Sox2 の DNA 認識機構を解明し、iPS 細胞誘導のメカニズムに迫ると共に広く天然変性タンパク質の機能解明の手法を示すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

iPS 細胞誘導因子の特異な機能の鍵が天然変性タンパク質としての性質にあるという考えに立脚し、NMR 緩和分散法を用いて、特に Sox2 の DNA 認識機構を解明し、iPS 細胞誘導のメカニズムに迫る。なお緩和分散法の優れた点は、相互作用や構造変化の速度を原子レベルで求められるだけでなく、従来の手法では観測できない低存在比状態の立体構造情報まで得られる点である。天然変性タンパク質の共役した折畳みと結合の過程には、低存在比の中間状態を経た構造変化が予想されるため緩和分散法が最適な手法と言える。

## 4. 研究成果

### (1) 試料調製

大腸菌発現系を用いて、NMR 用に安定同位体標識した Sox2 の大量発現系の構築を行った。まずは、フレキシブルな蛋白質の発現に定評のある GB1 (protein G の B1 ドメイン) タグを用いて GB1 融合蛋白質として Sox2 の大量発現を目指した。GB1 融合 Sox2 は十分に発現したが、GB1 切断における副反応が多く、あまり収率良く Sox2 を調整できなかった。そこで次にタグなしで発現・精製の条件検討を行った。タグなし Sox2 では大腸菌にとって毒性があるため、生育が非常に遅かったが IPTG による発現誘導後に 25°C で1晩培養するのが最も高収量になることが分かった。大腸菌を超音波破碎機にかけ、上清を陽イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラム等で精製することにより、収率よく Sox2 を調製できた。

次に二本鎖 DNA (*utf-1*) を調製した。当初は DNA の NMR シグナルを確認しながら、一本鎖 DNA 由来の NMR シグナルがなくなるように調製したが、後に、HPLC で一本鎖と二本鎖を分離するようにした。これにより格段に早く二本鎖 DNA を調製できるようになった。

### (2) NMR 解析

[<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]-Sox2 を大量に調製し、まずは各種3次元 NMR 測定を行い、遊離状態及び DNA 結合状態における Sox2 の NMR シグナル帰属を行った。得られた化学シフトの解析から、二次構造解析を行ったところ、Sox2 は遊離状態でも DNA 結合状態とほぼ同じ領域に3本の  $\alpha$ ヘリックスがあることが分かった。次に、遊離 Sox2 の揺らぎを解析するために、[<sup>2</sup>H,<sup>15</sup>N]-Sox2 を調整し、600 MHz と 750 MHz の NMR を用いて緩和分散実験を実施した。得られた緩和分散曲線を解析した結果、第1ヘリックス及びそれと接触している領域が揺らいでおり、そこに2%程の極低存在比状態が存在していることが分かった(図1)。さらに緩和分散実験で得られた化学シフトの解析から、その低存在比状態では、6割程度ほどけていることが分かった。6割の残基数がほどけているのではなく、構造的に解け具合が6割り程度であることを意味する。さらに、水とアミドプロトンとの交換速度を決定する CLEANEX-PM 実験から、多くの残基で水とアミドプロトンとの交換が観測された。それらの残基では、水と接しやすい、すなわち、構造が瞬間的にほどけていることが分かった。この結果は緩和分散実験の結果と矛盾しない。DNA 結合領域が揺らいでいることから、特に非特異的な DNA との結合に関与していることが示唆される。

続いて、DNA 結合状態の解析だが、DNA 結

合状態では、Sox2:DNA=1:1 の濃度比で緩和分散実験を行ったが、遊離状態で見えた揺らぎは結合状態では観測されなかった。すなわち、Sox2 は DNA と結合することによって構造が硬くなることが分かった。

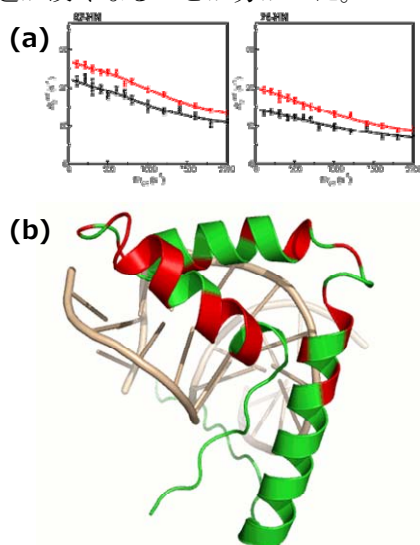


図1 遊離Sox2の揺らぎ  
(a) 緩和分散プロファイル。750 MHz (赤) と600 MHz (黒) で測定を行なった。(b) 揺らいでいる残基をDNA結合型構造上に赤色で示す。

蛋白質と DNA の相互作用において、本研究のように、蛋白質の揺らぎ、特にマイクロ秒からミリ秒オーダーのもの、の変化を詳細に解析した例は他にはない。今後は、 $[^{15}\text{N}]$ -Sox2 に DNA を少量ずつ加えて濃度比を変化させながら緩和分散などの NMR 実験を行うことによって、どのような中間状態を経て最終結合状態に至るのかを解明する予定である。とくに Sox2 に対して DNA が少量しかない場合は、最終結合サイトがほぼ埋まっていると考えられるため、非特異的な結合が強調されて見えてくると予想される。

#### 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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Sugase K, Elucidating slow binding kinetics of a protein without observable bound resonances by longitudinal relaxation NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR*, 査読有、in press
- ② Nomura K, Maeda M, Sugase K, Kusumoto S, Lipopolysaccharide induces raft domain expansion in membrane composed of a phospholipid-cholesterol-sphingomyelin ternary system, *Innate Immun.* 査読有、in press
- ③ Sekiguchi T, Suzuki N, Fujiwara N, Aoyama

M, Kawada T, Sugase K, Murata Y, Sasayama Y, Ogasawara M, Satake H, Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*--the prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily., *FEBS J.*, 査読有、Vol.276、2009、pp.4437-4447

[学会発表] (計10件)

- ① 菅瀬謙治, Fluctuation and function of nuclear proteins, 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日、仙台
- ② 菅瀬謙治, Fitting Relaxation Dispersion Data With A New Software Package GLOVE, XXIVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2010年8月24日、Cairns, Australia
- ③ 菅瀬謙治, NMRによる天然変性タンパク質の動的構造解析, 第10回日本蛋白質科学会年会(札幌)、2010年6月18日
- ④ 菅瀬謙治, 動きの面から見た核内タンパク質の機能, ターゲットタンパク研究プログラム第3回研究交流会、2010年3月4日、東京
- ⑤ 菅瀬謙治, 天然変性状態と機能の相関, 第32回日本分子生物学会、2009年12月11日、横浜
- ⑥ 菅瀬謙治, Elucidation of protein-protein interactions by relaxation NMR spectroscopy, The 3rd APNMR Biannual Asia-Pacific NMR Symposium, 2009年10月27日、Jeju, Korea
- ⑦ 菅瀬謙治, 天然変性タンパク質の構造と機能の最前線, 第49回生命科学夏の学校、2009年8月30日、三田

[図書] (計1件)

- ① Wright PE, Felitsky DJ, Sugase K, Dyson HJ, Water and Biomolecules: Physical Chemistry of Life Phenomena (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering) (ed. Kuwajima K, Goto Y, Hirata F, Terazima M, Kataoka M), 2009、307 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅瀬 謙治 (SUGASE KENJI)  
公益財団法人サントリー生命科学財団  
・生物有機科学研究所・主席研究員  
研究者番号：00300822

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：