

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770106

研究課題名(和文) 非特異 特異複合体形成の動的構造解析による転写因子のDNA認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating a DNA recognition mechanism of a transcriptional factor protein by characterizing dynamic processes of specific/non-specific DNA-bound complexes

研究代表者

原田 英里砂 (HARADA, ERISA)

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：70541332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞作製に用いられる転写因子(Yamanaka因子)の1つであるSox2タンパク質ではHMG(High Mobility Group)ドメインがたった6-7残基のDNA配列を認識し結合することで、DNAと複合体を形成する。本研究では、sox2のDNA認識機構を理解するためにNMRを用いた解析を行い、sox2のHMGドメイン単体では揺らいでおり、認識配列のDNAに結合することで構造が安定化するという見出し。

研究成果の概要(英文)：Transcriptional factor sox2 is a one of the major factor gene used for induced pluripotent stem cell (iPSC) technologies. Sox2 possesses a high-mobility group box (HMG) domain, which specifically binds to only 6-7 bp of DNA to exert its function. However, DNA recognition mechanism of sox2 is not fully understood. In this study, to elucidate how sox2 recognizes the target sequence, we investigated dynamics of the HMG domain upon DNA binding using NMR. We found that the HMG domain is flexible and almost unfolded in the absence of DNA. However, when the HMG domain binds to the target sequences, the HMG domain forms stable structure with DNA. This study revealed that the unfolded structure of the HMG domain is stabilized upon DNA binding.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：NMR

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの蛋白質の3割は単体で天然変性状態と予想され、転写因子に限ると約7割が天然変性領域である。天然変性領域では、遊離状態では特別な構造を持たずに、蛋白質やDNAと結合すると特定の立体構造に折りたたまれるという、今までの「静的」構造の概念に当てはまらない現象が存在する。

iPS細胞作製時に用いられる転写因子(Yamanaka因子)にも長い天然変性領域があることが知られている。これらの転写因子群ではターゲット遺伝子の活性化に効果的に結合するパートナータンパク質が存在し、協同的に遺伝子発現を調節している。sox2タンパク質ではHMG(High mobility group)ドメインでたった6-7残基のDNA配列を認識し結合する。このドメインは3本のヘリックスと、塩基性の長いループ領域を有しており、複数のタンパク質-DNA複合体構造が報告されている。そこでは、DNAの屈曲度合いを変えながら、ヘリックス、ループの相対配置が変化し特異的複合体(「静的」構造)を形成し転写制御にいたる(図1)。しかし、機能発現に重要な特異的複合体形成にいたる過程(「動的」構造)については不明な点が多い。

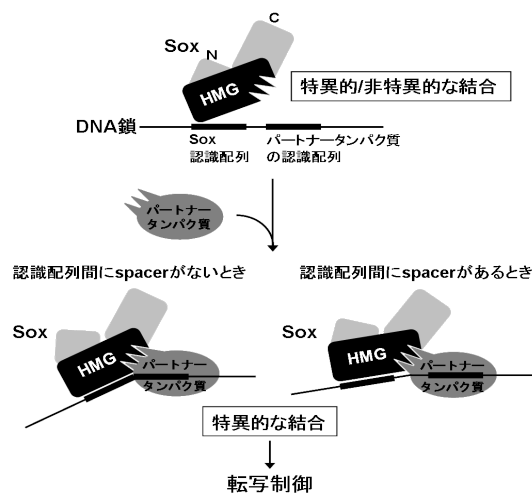


図1. Soxタンパク質の機能発現

## 2. 研究の目的

本研究ではiPS細胞作製時に用いられる転写因子(Yamanaka因子)の一つであるSox2の「動的」構造をとらえ、DNA認識機構を揺らぎの観点から明らかにするものである。DNA認識において蛋白質がDNAと配列特異的に複合体形成するだけでなく非特異的に複合体形成することが知られており、1分子蛍光観察でタンパク質が非特異的に結合している時間を測定した事例も報告されている。NMRは幅広い時間領域の動きを観測できるという利点があり、特に緩和分散法を適応する

ことで「動的」構造である低存在で存在する非特異的複合体構造を検出することができる。そこで、sox2のHMGドメインの特異的および非特異的DNA複合体の溶液構造動態を詳細に観測し、遊離状態から結合にいたるまで、どのような立体構造変化を伴いながらDNAを認識しているかを低存在比状態の「動的」構造を観測することで明らかにする。さらには、転写制御における天然変性領域の理解に繋げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) sox2単体の構造の解明: 現在までに25度での $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの信号帰属が完了している。そのため、25度を基準として、15度から40度まで温度変化を行い、HMGドメインの構造の温度依存性を観測した。また、HMGドメインの2次構造を観測するためCDを測定した。また、 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識試料を作製し、37度で連鎖帰属のための一連の3次元NMR測定を行い、 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの信号を帰属した。

(2) sox2単体の揺らぎの観測: 揺らぎの観測を高感度で行えるよう、 $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識試料を作製した。25度を標準として、温度を3度ずつ変化させ、19, 22, 25, 28度の条件で交差緩和法を適応した。また、水と交換しているアミドプロトンを検出するCLEANEX-PM法の測定を行った。以上の実験を37度でも行った。

(3) 等温滴定型熱量計(isothermal titration calorimeter: ITC)による特異的/非特異的DNA複合体の測定: DNA結合に関する熱力学的パラメータを得るため、ITCを用い、sox2の認識配列を含むDNAに対しHMGドメインを滴定した。

(4) NMRによる特異的/非特異的DNA複合体の測定: DNAと結合していないとき、DNAと結合したときの構造変化を観測するため、HMGドメインに対してsox2の認識配列を含むDNAとランダムな配列のDNAの2種類を滴定し、 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルの変化を観測した。25度と37度の条件で行った。

(5) in-cell NMR測定のための蛍光実験: in-cell NMRは細胞内に細胞膜透過性ペプチド(cell-penetrating peptides: CPP)を加した $^{15}\text{N}$ 標識タンパク質を導入することで、細胞内でのタンパク質構造を直接観測する画期的な方法である。ただし、invitroの実験系と異なり、in-cell NMR実験には大量のタンパク質試料が必要であるので、少量のタンパク質試料をHela細胞に導入し、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観測を行うことでNMR実験のための最適化条件を検討した。

## 4. 研究成果

(1) sox2単体の構造と揺らぎ:  
X線結晶構造やNMRからHMGドメインには3

本のヘリックスが存在することが知られている。しかしながら、DNA 非存在下の HMG ドメインの  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルは、温度上昇に伴い大きく変化した。25 度の状態では 3 本のヘリックスが存在する（既に完了している帰属から確認している。）が、温度上昇に伴って信号の分散が悪くなり、ランダムコイルの領域にオーバーラップするようになった。つまり、変性していることが分かった。また、信号がブロードニングすることにより、観測できる信号の数も減っていた。この温度上昇による変性をより詳しく解析するため、222nm の CD 強度  $[\theta]_{222}$  の温度変化を測定し変性中点を求めたところ、43 度であった（図 2）。つまり、生体内の環境を模倣した条件である 37 度では半分近く変性していると考えられる。

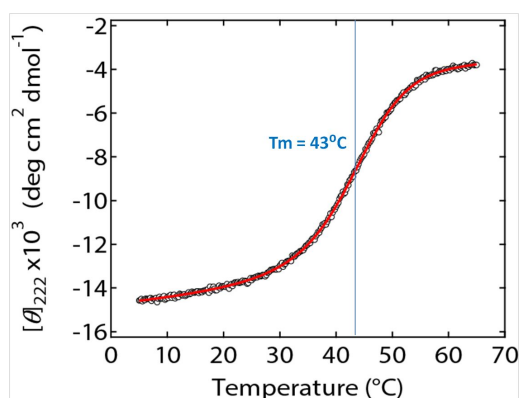


図 2 .HMG ドメインの 2 次構造の温度依存性

25 度の条件で緩和分散法を適応した結果、ヘリックス 1 と 2 に揺らぎがあることが分かっており、この揺らぎがある近傍で HMG ドメインは配列特異的 DNA と結合している。また、CLEANEX-PM が観測された領域はループ領域の他に、ヘリックス 1 の後半からヘリックス 2 の前半にかけてと、ヘリックス 3 の最後の部分であった。これらのアミドプロトンはヘリックス内で形成している水素結合から外れることで水と交換できるようになることから、この部分はヘリックスが壊れやすいということを示している。緩和分散法の結果と合わせると、ヘリックス 1 と 2 においては、ヘリックス構造が解けていると考えられ、その結果、揺らぎが観測されたと示唆される。

37 度の帰属結果より、37 度で観測されている信号はヘリックス 2 の一部とヘリックス 3 とループ領域の一部であり、ブロードニングにより消えていた信号は主に 25 度で緩和分散法が観測された残基であった。つまり、温度上昇によって低存在比で存在していたタンパク質の変性成分が増え、信号そのものが観測できなくなったといえる。また、37 度で信号が観測されていた部分の多くで緩和分散法からの揺らぎも観測された。以上の結果から、HMG ドメイン内の 3 つのヘリ

ックスのそれぞれで変性のしやすさが異なり、変性し易い領域から揺らぎが観測されたと示唆される。

(2) sox2 と特異的/非特異的 DNA との複合体形成：

25 度で行った ITC の結果、熱力学的パラメータを得られるような滴定曲線が得られなかった。このことから、特異的な結合だけではなく非特異的な結合が混ざっている可能性があると考え、ITC での実験を断念し、残基レベルでの構造変化が分かる、NMR での実験を優先した。以前は DNA の特異的結合状態として *utf1* 配列の DNA 複合体で帰属を行っていたが、*utf1* 配列には sox2 の認識配列と oct3/4 の認識配列が続いているため、sox2 の認識配列を中央に持ってきた配列をデザインし直した。その際、当初予定していなかった 37 度での実験を行うため、*t<sub>m</sub>* 値が 44 度以上となるようにした。

HMG ドメインに対しランダム配列の DNA を滴定したところ、 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの信号が変化した。これは sox2 が DNA の配列に関わりなく DNA と非特異的に結合して構造変化したことを示している。しかし、観測された信号の数は残基数よりも少なかった。一方、認識配列の DNA を滴定したところ、信号の変化が途中まで続いたが、そのケミカルシフトは 1:1 当量において見られるタンパク質 - DNA 複体のケミカルシフトとは異なっていた。これは DNA との非特異的な結合により構造変化しながら、最終的に安定した構造をとったことを表している。実際に、最終構造では残基数と同じ数の信号の数が観測されている。以上の実験結果から、構造をとっていない sox2 は DNA と非特異的に結合し構造変化するが、認識配列の DNA と結合するときに安定化したタンパク質 - DNA 複体を形成するという、HMG ドメインの折りたたみを伴う DNA 認識メカニズムが示唆された。これは天然変性領域の特徴を観測したことになり、今後は詳細な解析を行う予定である。

(3) sox2 の in-cell NMR :

37 度では sox2 の HMG ドメインが構造をとっていなかったため、既知の構造情報が実際の生体内での状況を反映しているのかという新たな疑問を覚え、当初の計画で予定していなかった in-cell NMR を導入することを試みた。蛍光観測のため HA タグを付加し、CPP としては既に in-cell NMR で使用実績のある HIV ウィルス由来の TAT ペプチドを用いた。細胞内で CPP が切断されるように HA タグ - (Gly) - Cys - TAT 配列を C 末に導入したタンパク質を作製した。Hela 細胞への導入に用いたタンパク質の最終濃度は 20 ~ 30  $\mu\text{M}$  である。細胞を固定化後、HA 抗体によりタンパク質を標識した。その結果、Sox2 は細胞内に導入されていたが、sox2 は細胞質内に留まるのではなく核にも移行していることがわかった。こ

れはHMGドメインに核局在シグナル(nuclear location signals: NLS)が存在しているからだと考えられる。in-cell NMRにおいて、タンパク質が核と相互作用した状態ではスペクトルを得るのが難しいため、現在はsox2が細胞質内に存在する間にスペクトルが取れるように、タンパク質の細胞内への導入にかかる時間の検討などを行っている。

#### 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 1件)

1. Nomura, K., Harada, E., Sugase, K., Shimamoto, K. "Solid-state NMR spectra of lipid-anchored proteins under magic angle spinning." *J. Phys. Chem. B.* 118, 2405-2413, 2014 査読有.

[学会発表](計 6件)

1. Erisa Harada, Tsuyoshi Konuma, Kenji Sugase. "Characterizing Conformational Flexibility of a DNA Binding Protein." 55th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference 2014.3.23-28 (Boston, USA)
2. Kenji Sugase, Erisa Harada, Toshio Takahashi, Shoko Mori. "Analysis of protein dynamics in living human cells" 第36回分子生物学会 2013.12.3-6 (神戸)
3. Tsuyoshi Konuma, Erisa Harada, Takashi Oda, Mamoru Sato, Kenji Sugase. "Elucidation of nonspecific DNA-binding mechanism by quantitative analysis of chemical shift changes." 5<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium 2013.10.27-31 (Brisbane, Australia)
4. Tsuyoshi Konuma, Erisa Harada, Kenji Sugase. "Extracting information on protein dynamics from crowded NMR spectra using relaxation dispersion difference." 5<sup>th</sup> Asia-Pacific NMR Symposium 2013.10.27-31 (Brisbane, Australia)
5. Kenji Sugase "Mechanism of the distal regulation of substrate binding through intrinsic fluctuation in an enzyme." The 10<sup>th</sup> Korea-Japan Bilateral Symposium on Biological NMR 2013.7.4 (Seoul, Korea)
6. Tsuyoshi Konuma, Erisa Harada, Kenji Sugase. "Elucidation of the DNA-binding dynamics of the transcription factor Oct3/4 POU homeodomain." 25th International Conference on Magnetic Resonance in

Biological Systems. 2012.8.19-24  
(Lyon, France)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

原田英里砂 (HARADA, Erisa)

(公財)サントリー生命科学財団

研究者番号: 70541332

(2)連携研究者

菅瀬謙治 (SUGASE, Kenji)

(公財)サントリー生命科学財団

研究者番号: 00300822