

## 1-3-1 研究成果

中テーマ名：DNA結合タンパク質同定装置の開発	
サブテーマ名：DNA結合タンパク質の構造解析・結合能の条件検討及び新技術の検証	
中テーマリーダー（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授	西村善文
研究従事者（所属、役職、氏名）	
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 助手	長土居有隆
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授	古久保哲朗
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 準教授	岩崎博史
横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授	木寺詔紀
広島大学大学院先端物質科学研究科 助教授	上野 勝
(株) パイケーキ 代表取締役社長	木寺重樹
研究の概要、新規性及び目標	
①研究の概要	
(1) 基本転写因子TFIIDの機能を調べるとともに、他のコアクチベーター複合体であるMediator、SAGAとの機能的重複、役割分担について新たな知見を得る。	
(2) 分裂酵母Rad51タンパク質によるDNA鎖交換反応の再構成系を構築し、反応機構を明らかにする。	
(3) DNA結合タンパク質とDNAの複合体の立体構造をNMRの実験情報から高精度に決定する計算方法を開発する。	
(4) 進化的に高等動物に近い単細胞生物である分裂酵母を用いて、新規テロメア結合タンパク質同定のための新しい手法を開発する。	
(5) 数多くのDNA結合タンパク質の立体構造が解明されるに従い、DNAに結合しているタンパク質に見られる特異的な表面（正電荷を帯びた領域）はDNAの外側に形成される負電荷の認識に使われていることが判ってきた。DNA結合タンパク質に見られるこの特異な表面を定量化し、DNA結合能（結合親和性）が評価できる方法を開発する。	
(6) 転写調節因子のDNA結合、タンパク質相互作用、リン酸化などの調節機構に関わるドメイン構造を解析する。	
②研究の独自性・新規性	
(1) TFIIDは、真核生物で唯一コアプロモーター構造を直接認識して転写制御を行う重要な転写因子であるにもかかわらず、機能解析を行っている国内の研究グループは我々のみであり、世界的に見ても10カ所程度の研究拠点しか存在しない。	
(2) Swi5及びSfr1タンパク質を発見し、主に遺伝学的解析からRad51タンパク質の機能発現に重要な働きをしていることを示してきた。後に、これらは、他の生物種にも保存されていることが示され、この複合体のRad51依存的組換え反応のメカニズムを理解する上では非常に重要な分子であると考えられる。現在、この分子の解析を行っている研究拠点は、国内外とも我々のグループのみである。	
(3) 分子シミュレーションの技術と構造決定で汎用されるシミュレーテドアニーリングを併用し、これまででない精度を達成した。	
(4) テロメア維持に関連する蛋白質のいくつかはDNA修復にも関係している点に着目し、DNA修飾に関係している蛋白質のテロメアでの機能を解析した点が本研究の独自性、新規性である。	
(5) タンパク質がDNAに結合する際、DNAのリン酸骨格付近に特化したDNA結合能の算出および定量化を行った。	
(6) 網羅的かつ迅速なDNA結合蛋白質の同定を行う装置の開発に結びつける。	
③研究の目標	
(1) TFIID複合体の精製スキームを確立するとともに、in vitro転写系を用いて、TAF1のN末端ドメインであるTANDに依存した転写活性化機構を分子レベルで明らかにする。また遺伝学的な手法を併用することにより、Mediator、SAGAとの関係を明らかにする。	
(2) 分裂酵母Rad51、sfr1、swi5、RPA、Rad22タンパク質を精製し、DNA鎖交換反応の再構成系を構築する。	

- (3) 方法の確立と実際の系への応用を試みる。
- (4) 新規テロメア結合蛋白質の同定法を確立する。
- (5) 次のステップで研究開発を行った。
  - DNA結合タンパク質の特異な表面の定量化（CG技法を使った可視化ツールの開発）
  - DNA結合能の定量化（簡易的な手法での算出機能の開発）
  - DNA結合能を補足する図式化（概略図の自動生成機能の開発）
- (6) 大腸菌無細胞合成系における合成効率の上昇を目指して沢山の目的タンパク質を迅速に回収する系を構築する。

研究の進め方及び進捗状況

- (1) おおよそ順調に進んでいる。
- (2) おおよそ順調に進んでいる。
- (3) 方法の確立と実際の系への応用をほぼ完了し、予定の精度を達成した。
- (4) ゲノム情報をもとにバイオインフォマティクスの手法を用いて、複数の新規テロメア関連タンパク質の発見とその機能解析に成功した。目標は達成した。
- (5) 目標とした項目については、ほぼ開発が完了した。
- (6) 少量の合成反応液量（通常の1/10量）でタンパク質を合成させる容器を作製中。

主な成果

具体的な成果内容：

- (1) ①TAPタグを用いて、基本転写因子TFIIDを簡便に精製する方法を確立した。②TAF1遺伝子のTAND欠失変異（delta-TAND）とMED9遺伝子の欠損が、酵母の生育及びpolyA+mRNAの転写において著しい負の合成効果を示すことを見出した。同様の合成効果は、Mediatorの他サブユニットをコードするGAL11遺伝子の欠損とdelta-TAND間においても観察された。③in vivoの転写解析により、BAS1が特定のコアプロモーター上で機能する際にTAND依存性が観察されることを見出した。またBAS1について詳細な変異体解析を行った結果、RD2（Regulatory Domain 2）のAD2（Activation Domain 2）に対する負の抑制を解除するためにANDとBAS2の機能が必要であることを見出した。④BAS1の（RD2+AD2）領域をTATAボックスの存在下でTAND-TBP複合体に作用させることにより、TBPをTANDから解離させることに成功した。⑤TAND-TBPの相互作用は、元来極めてダイナミックなものであることを見いだした。
- (2) Rad51 依存的な試験管内組換え反応系を構築し、Swi5/Sfr1がこの反応に必須であることを示した
- (3) 方法と応用についての論文を執筆中である。
- (4) 分裂酵母の5種類の蛋白質 Nbs1、RPA、Arp6、His1、Dna2 がテロメア DNA に結合することを世界で始めて明らかにした。また、Taz1 と RPA の 2 重変異株はテロメア DNA を維持できないことを発見し、特許を提出した。
- (5) 簡易的な手法であるが、リン酸骨格付近に特化した DNA 結合能の算出機能を開発し、定量化が可能となった。
- (6) 通常の1/10量の合成量によってタンパク質の合成を行った。<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>NのHSQCスペクトルから細胞系で合成したタンパク質と同一のスペクトルであり、収量も必要量得ることができた。また、アミノ酸残基の選択的標識も行い、問題なく標識された。

特許件数：2      論文数：21      口頭発表件数：92

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

- (1) TANDを介した転写活性化機構の解明を進めているのは、現在我々の研究グループのみである。
- (2) Swi5/Sfr1が、Rad51の鎖交換反応を促進することを示したのは、世界で最初である。
- (3) 上記の独自性・新規性によって、世界で最も優れた方法となった。
- (4) 分裂酵母のDNA修復関連蛋白質のテロメア維持における機能解析では世界トップレベルの業績をあげた。

2 実用化に向けた波及効果

- (1) 転写活性化機構の解明は、様々な疾病を克服する上で極めて有用な情報をもたらすものと期待される。

- (2) 組換え反応の正確な理解は、ゲノム不安定性疾病や発癌機構の分子機構の理解と、それを基にした創薬に繋がるものと思われる。
- (3) 実際は計算時間を膨大に必要とするために、すぐにすべてのユーザーに使われるには到らないと思われる。
- (4) ヒト細胞のTRF1/2とRPAの二重変異株のテロメアが維持できなくなれば抗癌剤の新しいターゲットとなる可能性がある。

残された課題と対応方針について

- (1) ①TFIIDの精製において、TAF1のN末端にTAPタグを融合するとTBP、TAF2が解離しやすくなっていることが明らかとなったため、この点についてはさらに検討が必要である。②現在構築中の試験管内転写反応系ではTAND依存性が再現できておらず、さらなる条件検討が必要である。③TAND-TBPのダイナミックな相互作用について、転写活性化におけるその生理的な意義を明らかにする必要がある。
- (2) Swi5/Sfr1以外に、Rad55/57が促進因子として知られているが、このタンパク質の発現系及び精製法を確立して、試験管内で二種類の促進因子の機能的差異を解析する必要がある。
- (3) これから多くのDNA複合体について計算例を追加し、NMR研究者に認知されることが必要であると思われる。
- (4) ヒト細胞のRPAがテロメアで機能するかどうかを明らかに出来ていないので、現在はそれを解析中である。もしヒトRPAがテロメアで機能すれば、TRF1/2と同時に変異させたときにテロメア構造に影響を及ぼすかどうかを調べる。
- (5) 今回開発した“結合能評価ツール”を第三者（研究者）に使って頂きながら、研究者が簡単に扱えるレベルまで完成度を上げる。同時に、このツールを利用した応用への発展も期待している。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合 計
	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	
人件費	0	12,649	0	0	0	0	12,649	900	11,925	14,556	12,190	12,280	8,916	60,767	73,416
設備費	0	0	0	0	0	0	0	59,333	0	0	0	0	0	59,333	59,333
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	12,600	14,022	1,000	1,000	2,000	1,500	32,122	0	13,965	6,927	4,723	7,367	4,127	37,109	69,231
旅費	0	374	0	0	0	0	374	0	0	0	0	0	0	0	374
その他	1,400	2,011	0	0	0	0	3,411	0	0	0	0	0	0	0	3,411
小 計	14,000	29,056	1,000	1,000	2,000	1,500	48,556	60,233	25,890	21,483	16,913	19,647	13,043	157,209	205,765

代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む]

JST負担による設備：

地域負担による設備：NMR（800MHz）

※ 複数の研究課題に共通した経費については按分する