

転写制御因子、ヒストン修飾因子の構造生物学

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 生体超分子科学専攻

生体超分子機能科学 西村善文、明石知子、長土居有隆、奥田昌彦
生体超分子構造科学 佐藤 衛、清水敏之、橋本 博、山田道之、亀井大助

1. 転写活性化因子ATF-2の転写活性化ドメインの関与する複合体の構造解析

転写活性化因子ATF-2は図1に示すような機構で転写調節を行っている。安定同位体¹⁵N標識を行ったATF-2の転写活性化ドメインと非標識のDNA結合ドメインあるいはストレス応答キナーゼp38との複合体から、転写活性化ドメインの結合部位及び結合様式をNMRにより解析した。フリーの活性化ドメインの構造はすでにNMRによりその立体構造を明らかにし、亜鉛を含んだフィンガーモチーフの構造を持ち、構造の安定化に寄与していた。しかし、同じドメイン内に存在するリン酸化部位を含む領域はいわゆる天然変性状態であり(図2)、フリー状態から複合体を形成する時にヘリクスの構造を誘起して複合体を形成していることが分かった。また、キナーゼp38との結合は先の結合部位とは異なる場所に持ち、Zn-フィンガーモチーフがその結合に寄与していることが分かった(図3)。

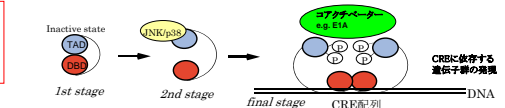


図1. ATF-2の転写調節機構

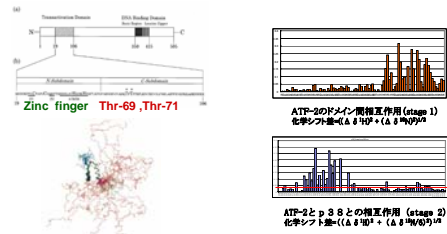


図3. ATF-2転写活性化ドメインのDNA結合ドメイン(上)およびp38(下)との相互作用に伴う化学シフト変化

図2. ATF-2転写活性化ドメインの溶液構造

2. 転写抑制因子RESTのC末ドメインとCoRESTの相互作用解析

神経選択的抑制因子RESTの抑制化ドメインの1つであるRD2とそれに結合するコプレッサーCoRESTとの作用部位をプルダウンアッセイにて同定し、CoRESTの相互作用部位の精製を行った(図4)。

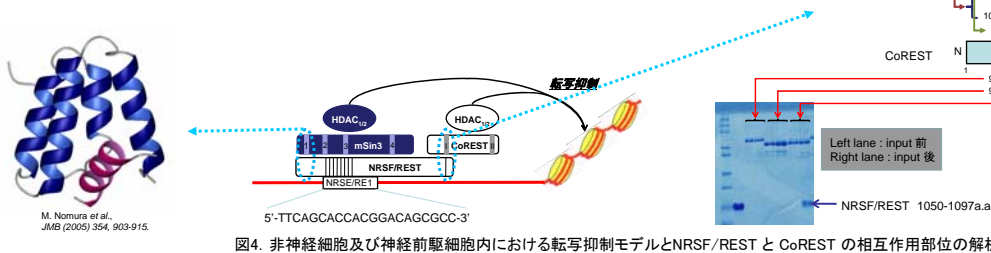


図4. 非神経細胞及び神経前駆細胞内における転写抑制モデルとNRSF/RESTとCoRESTの相互作用部位の解析

3. ヒストン修飾因子ペプチジルアルギニンデヒミナーゼ4 (PAD4)とメチル化アルギニンを含むヒストンN末端ペプチドとの複合体のX線結晶構造解析

PAD4の人工基質としてよく利用されるベンゾイルグリシルアルギニン(BGA)とPAD4(C645A不活性変異体)の複合体の系について、次の3種類の複合体①ベンゾイルグリシルアルギニン(BGA)-PAD4、②ベンゾイルグリシルモノメチルアルギニン(BGMMA)-PAD4、③ベンゾイルグリシルasymジメチルアルギニン(BGasymDMA)-PAD4の結晶化とX線結晶構造解析を行なった。その結果、BGA-PAD4複合体については、PAD4の活性部位にBGAに相当する電子密度が確認され、図5に示すような活性部位でのBGAとPAD4との相互作用が明らかにされた。また、BGMMA-PAD4複合体については、PAD4の活性部位にBGMMAに相当する電子密度が確認されたが、Argの側鎖のNη原子に結合したメチル基の電子密度は観測されなかった。さらに、BGasymDMA-PAD4複合体では、PAD4の活性部位にBGasymDMAに相当する電子密度がわずかに観測されるのみで、Argの側鎖のNη原子に結合したジメチル基を含め、Argの側鎖を帰属することは困難であった。

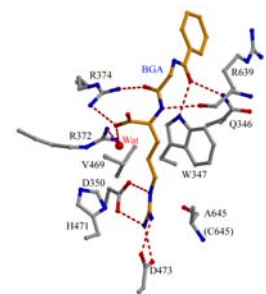


図5. BGA-PAD4複合体の活性部位の構造

4. メチル化酵素(ヌクレオメチリン:NML)触媒ドメインのX線結晶構造解析

メチル化酵素(ヌクレオメチリン:NML)と相互作用する分子との複合体のX線結晶構造解析を行うために、Se-Met置換体結晶を利用した多波長異常分散法でX線結晶構造解析に成功したNMLの触媒ドメイン(242-456)とSAH(Sアデノシルホモシステイン)の複合体の構造精密化を行った。その結果、NMLの触媒ドメイン-SAH複合体の結晶構造を、分解能2.0 Å、R値 = 0.192、R(free)値 = 0.231で精密化することに成功した(図6)。NMLの触媒ドメイン(242-456)は、大小2つのサブドメインに分類され、α/β構造をした大きい方のサブドメインは、SAM依存的なメチルトランスフェラーゼに特徴的な7本のβストランドからなるβシートとその両面に存在する4本のαヘリックスからなるRossmann Fold(SAM-MTase Fold)を形成していた。一方、小さい方のサブドメインは3本のαヘリックスで構成され、大きい方のサブドメインのSAM-MTase Foldと疎水的な相互作用を形成していた。

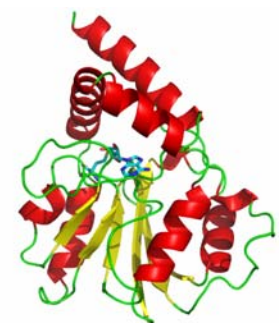


図6. NMLの触媒ドメインの構造