

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科 生体高分子構造学講座 (箱嶋 敏雄 教授)		
氏 名	大木 出	提 出	平成13年 1月 9日
題 目	NMR studies of the methyl-CpG binding domain of human methylation-dependent repressor MBD1 and its interaction with methylated DNA. (ヒトメチル化特異的リプレッサー-MBD1のメチル化CpG結合ドメインのNMRによる研究)		
<p>要旨</p> <p>DNA methylation in mammalian cells occurs at the 5-position of cytosine within the CpG sequence, and causes genome-wide phenomena such as gene silencing, gene imprinting, and X chromosome inactivation. A protein family that contains conserved methyl-CpG-binding domains (MBDs) recognizes this methylation signal and recruits other protein factors, such as corepressor complex including histone deacetylase and chromatin remodeling ATPase, at the methylation site.</p> <p>One of such proteins, MBD1 is a mammalian methylation-dependent transcriptional repressor and binds specifically to a methylated CpG sequence via its MBD. This study reports the solution structure of MBD (residues 1-75) of human MBD1 protein in complexed with and in absence of a 12-mer methylated DNA by means of multi-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy.</p> <p>The three-dimensional structures of MBD1 MBD both in complexed with and absence of DNA have a compact α/β fold and consist of a four-stranded β-sheet and an α-helix packed approximately parallel to the β-sheet [1,2]. The residues formed hydrophobic core in MBD1 are highly conserved in the other MBDs, suggesting that the folding is essentially identical throughout the MBD family. Contacts to the DNA are made at the face of the β-sheet, which is positioned within the major groove. The methyl groups at the methylation site are recognized through hydrophobic contacts with aliphatic and aromatic portions of arginine, tyrosine, valine, and serine residues that are highly conserved among the MBD family. All interactions with DNA are observed in the major groove side of the six base pairs width and the specific base contacts are made only in methyl-CpG sequence.</p>			

The complex structure also provides insight into the mechanism of a disease. One of the MBD proteins, MeCP2 is associated with Rett syndrome, a childhood neurodevelopmental disorder; many mutations are found in its MBD sequence. The structures suggest that some residues of MeCP2 MBD that are mutated in Rett syndrome are located at the protein hydrophobic core or the protein-DNA interface, providing a structural basis to understand the consequence of these mutations.

[1] Ohki I., Shimotake N., Fujita N., Nakao M. and Shirakawa M. (1999). Solution structure of the methyl-CpG-binding domain of the methylation-dependent transcriptional repressor MBD. *EMBO J.* 18, 6653-61.

(This paper reports the structure of MBD1 in absence of DNA)

[2] Ohki I., Shimotake N., Fujita N., Jee J. -G., Ikegami T., Nakao M. and Shirakawa M. Structure of the methyl-CpG-binding domain of human MBD1 in a complex with methylated DNA. being submitted for publication.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 大木 出

平成13年1月9日に提出された論文は、ヒトメチル化特異的リプレッサー MBD1 のメチル化 CpG 結合ドメイン (MBD) の核磁気共鳴 (NMR) 法による溶液中での立体構造の決定、メチル化 DNA との相互作用、メチル化 DNA との複合体の立体構造の決定、ならびに MBD への変異に起因する Rett 症候群の考察を記述している。

申請者は蛋白質精製や同位体ラベル試料の調製といった生化学的手法と NMR スペクトルの解析を併用して、MBD1 の MBD ドメインの構造解析を行った。その結果、MBD ドメインは4本鎖の β シートと1本の α ヘリックスからなる α/β フォールドの立体構造をとること、この構造は保存されたアミノ酸残基からなる疎水性コアを形成しており MBD ファミリーで共通の構造をもつこと、 β シートの面で DNA の主溝と相互作用し、メチル基の認識は疎水的な接触を通して行われていることを示した。

申請者はほぼ単独で、MBD と DNA の試料調整、NMR による立体構造決定、相互作用解析などの一連の実験を行った。立体構造決定と得られた構造に対する評価・解析は緻密、かつ正確に行われ、溶液中の立体構造解析として十分な分解能が得られおり、申請者が生化学、構造生物学の手法と専門的知識を修得していると判断できる。得られた構造を基に突然変異の効果を説明したが、多分に推論的ではあるが、得られている実験事実を合理的に解釈していると見なせる。

また、論文全般におりて、記述も水準に達していると判断された。

以上のように、本論文は遺伝子転写研究の構造生物学に貴重な基礎データを提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。