

ヒト SOX3-dsDNA 複合体の立体構造解析

上原秀太¹, 奥山ほのか¹, 大城拓未¹, 小寺義男^{2,3}, 伊藤道彦², 松井崇^{2,3}¹北里大学 大学院理学研究科, ²北里大学 理学部, ³北里大学 理学部附属疾患プロテオミクスセンター

Structure determination of human SOX3 HMG box-dsDNA complex

Shuta UEHARA¹, Honoka OKUYAMA¹, Takumi OSHIRO¹, Yoshio KODERA^{2,3}, Michihiko ITO², Takashi MATSUI^{2,3}¹Graduate School of Science, Kitasato University, ²School of Science, Kitasato University³Center for Disease Proteomics, School of Science, Kitasato University

Abstract

転写因子は遺伝子発現を制御する重要なタンパク質群である。転写因子の1つである SOX3 は、哺乳類の性決定を司る転写因子 SRY の祖先型であると考えられており、メダカやカエルなどの一部の脊椎動物において性決定に関与する。本研究では、SRY と SOX3 の DNA 結合特性の違いを構造的に解析するため、ヒト SOX3 と二本鎖 DNA との複合体構造を X 線結晶構造解析により決定した。その結果、SOX3 と SRY で DNA 認識残基やリン酸との相互作用の違いより、転写因子に結合する二本鎖 DNA の屈曲角を変えることが明らかとなった。

1. はじめに

1-1. 細胞分化に関与する転写因子 SOX ファミリー

タンパク質の発現制御には、抑制因子や促進因子となるタンパク質がそれぞれの調節領域となる DNA 配列と結合することが必要である。さらに、遺伝子に特異的な抑制因子や促進因子などの転写因子は特定の DNA 配列に結合することで転写をより正確に制御している。

ヒトの転写因子のうち、SOX タンパク質ファミリー（以後、SOX タンパク質ファミリーを単に SOX タンパク質と表記する）は発生の様々な段階で転写制御を担う転写因子である。発生の各段階に対応するために、ヒトやマウスには 20 種類の SOX タンパク質が存在する。また、その配列的な特徴によって SOX タンパク質は 9 種類のサブグループに分けられる。例えば、サブグループである SOX B1 ファミリーに属する SOX2 は初期胚と ES 細胞の多様性維持における転写因子で、体細胞から人工の多能性幹細胞（iPS 細胞）へリプログラミングする因子の1つである。また、SOX C ファミリーの SOX11 は顆粒細胞から顆粒ニューロンへの分化に関与し、SOX F ファミリーの SOX17 は内胚葉の分化、SOX18 は血管リンパ管形成に関与している。SOX タンパク質はこれらの発生の各段階に関与するだけでなく、SOX A ファミリーの SRY は雌雄を決定する調節因子でもある (Table 1)[1]。これらの異なるグループの SOX タンパク質の配列的な類似性は低いものの、共通した DNA 結合ドメインである high mobility group (HMG) ボックスは高いアミノ酸配列保存性を示す。

1-2. SOX タンパク質群の DNA 認識機構

HMG ボックスの高い配列相同性が調節領域となる DNA との結合に重要であると考えられる。しかし、SOX タンパク質が調節する表現型はそれぞれ異なることから、HMG ボックス内で保存性の低いアミノ酸が調節領域の DNA に対する選好性を生んでいると考えられている。そこで、DNA 認識機構の違いを理解するために、ヒト

Table 1 Summary of the SOX family comprises nine groups.

Subfamily	Member	Chromosomal positions
SOX A	SRY	Yp11.2
SOX B1	SOX1	13q34
	SOX2	3q26.33
	SOX3	Xq27.1
SOX B2	SOX14	3q22.3
	SOX21	13q32.1
SOX C	SOX4	6q22.3
	SOX11	2q25.2
	SOX12	20p13
SOX D	SOX5	12p12.1
	SOX6	11p15.2
	SOX13	1q32.1
SOX E	SOX8	16p13.3
	SOX9	17q24.3
	SOX10	22q13.1
SOX F	SOX7	8p23.1
	SOX17	8q11.23
	SOX18	20q13.33
SOX G	SOX15	17p13.1
SOX H	SOX30	5q33.3

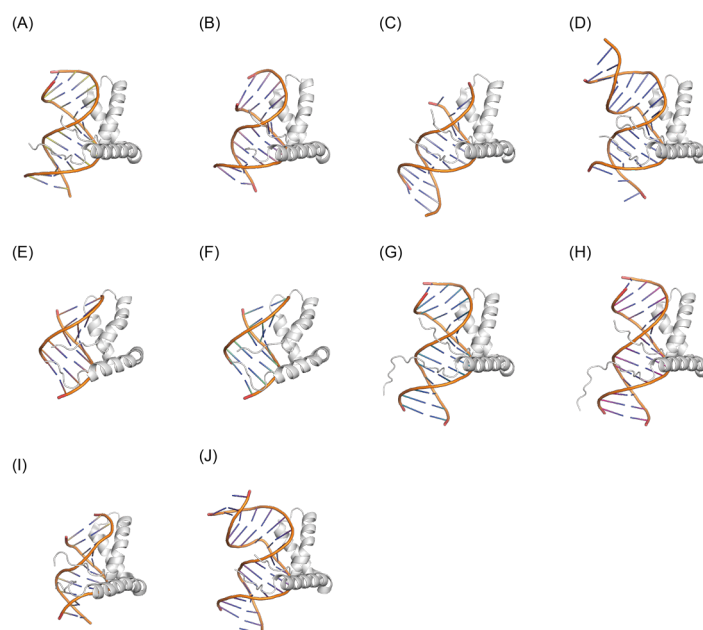


Figure 1 Crystal structures of SOX family bound with dsDNA. Crystal structures of (A) SOX2 (PDB 1O4X), (B) SOX9 (PDB 4EUW), (C) SOX11 (PDB 6T78), (D) SOX17 (PDB 6L6Y), (E)-(J) SRY (PDB 1HRY, 1HRZ, 1J46, 1J47, 2GZK, and 9BVD) are shown.

の SOX タンパク質のうち、SOX2 (PDB 1O4X)[2], SOX9 (PDB 4EUW), SOX11 (PDB 6T78)[3], SOX17 (PDB 6L6Y), SRY (PDB 1HRY[4], 1HRZ[4], 1J46[5], 1J47[5], 2GZK[6], 9BVD[7]) の 5 種類で HMG ボックスと二本鎖 DNA (dsDNA) との複合体構造が X 線結晶構造解析や溶液 NMR により解析されてきた (Fig. 1)。これらの結果から、HMG ボックスは 3 本のヘリックス ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) と両末端にある 2 つのループが L 字型に折り畳まれる構造を形成することがわかっている。さらに、HMG ボックスは保存された芳香族アミノ酸の疎水性相互作用により構造を安定化させていた。また、HMG ボックスは塩基特異的相互作用とリン酸やリボースなどに相互作用する塩基非特異的相互作用により DNA と結合していた。したがって、塩基特異的相互作用が DNA への選好性を発揮していると考えられる。しかしながら、アミノ酸配列相同性を比較すると、塩基特異的に DNA と相互作用するほぼ全てのアミノ酸が SOX タンパク質間で保存されている矛盾も示していた。さらに、異なる SOX タンパク質間でアミノ酸が保存されていても、異なる相互作用を形成しているケースも存在することから、その相互作用機構は十分に理解できていないのが現状である。

1-3. 哺乳類の性決定

哺乳類における性決定に関わる SRY には、全長 204 残基のうち 55 番目から 141 番目 (87 残基) に HMG ボックスが存在する。SRY-dsDNA 複合体の結晶構造解析 (PDB 9BVD)[7] により、SRY は前述した他の SOX タンパク質同様に dsDNA に結合し、dsDNA を屈曲させる事で SOX9 の転写を調節すると考えられている [5]。

一方、インドメダカやツチガエルをはじめとした他の生

物では雌雄を決定する遺伝子は SOX3 であると言われており [8,9], SOX3 は SRY の祖先型タンパク質であると考えられている。また、ヒト SOX3 とヒト SRY の HMG ボックスは 73% の配列相同性を示すものの、DNA 配列への選好性の違いが示唆されている。そこで、本研究ではヒト SRY とヒト SOX3 中の HMG ボックスに着目し、まだ構造が不明である SOX3 HMG ボックスの X 線結晶構造解析によって、ヒトにおいて SRY が性決定を担う分子機構の一端を解明することを目指した。

2. SOX3 HMG ボックスの大量調製と dsDNA との複合体の結晶化

ヒト SOX3 HMG ボックスと HMG ボックスが認識する dsDNA との複合体の立体構造を解析するために、ヒト SOX3 HMG ボックスの大量調製を進めた。ヒト SOX3 HMG ボックスの N 末端側に His₆ タグとリンカー配列を含む融合タンパク質 (以後、His₆ タグ融合ヒト SOX3 HMG ボックスを SOX3 とのみ表記する) を発現する大腸菌発現プラスミドを設計し、大腸菌異種発現系で大量発現した。大量発現された SOX3 は Ni アフィニティクロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーに供することで、高純度な SOX3 の精製に成功した。得られた SOX3 は化学合成した dsDNA と混合したのち、ゲルシフトアッセイにより SOX3 と dsDNA の混合比を求めた。次に、ゲルシフトアッセイで求めた混合比に従って SOX3 と dsDNA を混合した試料を用いてシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化し、複合体の初期結晶を得た。その後、初期結晶の結晶化条件を詳細に検討することで、分解能が改善し、最高分解能 2.73 Å の複合体結晶を得ることに成功した (Fig. 2A)。

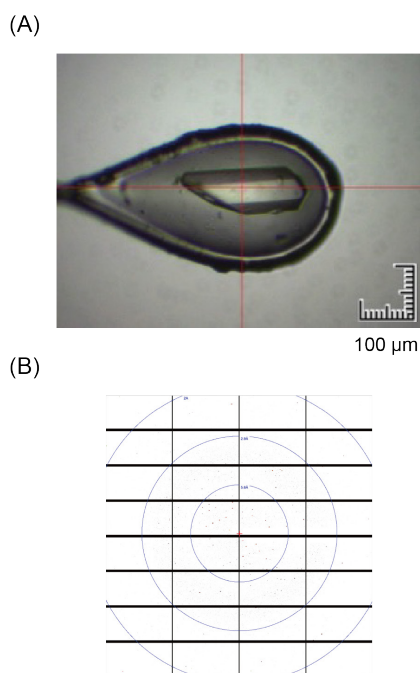


Figure 2 The crystals and X-ray diffraction of SOX3-dsDNA complex. (A) Crystal for diffraction experiment. (B) X-ray diffraction of SOX3-dsDNA.

3. SOX3-dsDNA 複合体の構造解析

得られた複合体結晶は、高エネルギー加速器研究機構フロンファクトリーのBL-1Aを利用して、SOX3-dsDNA複合体のX線回折像を取得することに成功した (Fig. 2B)。得られた回折データは既存のSOXタンパク質-dsDNA複合体構造を鋳型として分子置換を行った。しかし、これらの複合体中のdsDNAの配列長の違いや屈曲角のわずかな違いなどによって (Fig. 1)、どの複合体を鋳型としても分子置換法による位相決定は難航した。そこで、タンパク質-核酸複合体の予測も可能となったAlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com/>) [10] を用いてSOX3-dsDNA複合体の予測構造を作成し、予想構造を鋳型として分子置換した。その結果、非対称単位中に2組のSOX3-dsDNA複合体を有する結晶構造が得られた (Fig. 3)。SOX3は他のSOXタンパク質と同様にN末端とC末端のループ、3つのヘリックス、それらのヘリックスを繋ぐループで形成されていた。ロイシンジッパーやホメオドメイン、Znフィンガーなどの一般的な転写因子はdsDNAの二重らせん構造に見られる幅の広い溝 (主溝) に結合する [11-13]。一方、これらとは異なり、SOX3は既知のSOXタンパク質同様に二重らせん構造の幅の狭い副溝に結合していた。次に、非対称単位中に存在する2つのSOX3-dsDNA複合体を重ね合わせて非対称単位中の2分子間の違いを評価した。構造の違いは、SOX3に対してはすべての主鎖C α 原子、DNAに対してはすべてのリン原子の同一原子間の位置のずれの根平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation, RMSD) により評価した。その結果、SOX3では0.42 Å、センス鎖

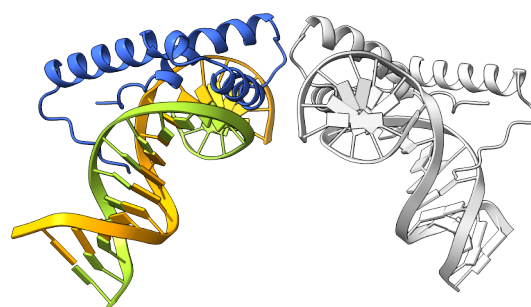


Figure 3 Crystal structures of SOX3-dsDNA in the asymmetric unit. SOX3, sense and antisense DNAs in one complex structure represent blue, sky-blue and wheat cartons, respectively. Another molecule in the asymmetric unit shows white cartons.

DNAでは1.23 Å、アンチセンス鎖DNAでは0.96 Åで、非対称単位中の2分子はよく一致した構造を示した。

4. まとめと今後の展望

多くのSOXタンパク質とdsDNAとの複合体構造解析が得られてきたが (Fig. 1) [2-7,14-16]、これまでSOX3の立体構造は不明であった。今回、タンパク質-核酸複合体予測モデルを生成できるように改善されたAlphaFold3を活用し、予測モデルを分子置換の鋳型として利用することで、世界で初めてSOX3とdsDNAとの複合体構造を決定する

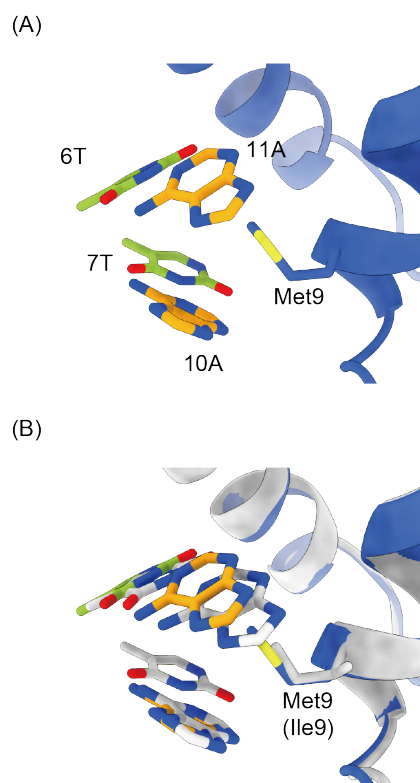


Figure 4 Closeup view of the DNA bending site. (A) Closeup view of the DNA bending site of SOX3. (B) Structural comparison of the DNA bending site between SOX3 and SRY. SOX3, bases in sense and antisense DNAs bound with SOX3, SRY, and bases in dsDNA bound with SRY represent as blue cartoon, green sticks, orange sticks, gray cartoon and gray sticks, respectively.

ことに成功した(Fig. 3)。ヒト SRY-dsDNA 複合体構造 (PDB 9BVD) と、その祖先型であり、本研究で構造決定したヒト SOX3-dsDNA 複合体構造を比較すると、dsDNA を屈曲させる Phe8 と Met9 (SRY では Ile9) 側鎖の配置の違いが見られることがわかった (Fig. 4)。また、3DNA[17] を用いて Phe8 および Met9 (SRY では Ile9) と相互作用している塩基の屈曲角を求めると、SOX3 では SRY より大きな屈曲角の値を示した。このように、現在までに SOX3 と SRY の複合体立体構造の比較から、相互作用の違いに関与している残基を複数見出すことに成功している。今後、構造から推定した SOX3 と dsDNA との相互作用に重要と想定される残基の点変異体を調製し、機能解析を進めることで SRY とその祖先型タンパク質である SOX3 との構造-機能相関の相違を明らかにしていきたい。

謝辞

本研究の X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーの共同利用実験 (課題番号 2021G507, 2023G511) によって実施してきた研究成果であり、ビームラインスタッフの皆さまに大変お世話になりましたことを重ねて御礼申し上げます。

引用文献から

- [1] Jiang J., Wang Y., Sun M., Luo X., Zhang Z., Wang Y., Li S., Hu D., Zhang J., Wu Z., Chen X., Zhang B., Xu X., Wang S., Xu S., Huang W. and Xia L., *Cell Death Discov.* **10**, 67 (2024).
- [2] Williams D. C., Cai M., and Clore G. M., *J. Biol. Chem.* **279**, 1449-1457 (2004).
- [3] Dodonova S.O., Zhu F., Dienemann C., Taipale J., and Cramer P., *Nature* **580**, 669 (2020).
- [4] Werner M.H., Huth J.R., Gronenborn A.M., and Clore G.M., *Cell* **81**, 705 (1995).
- [5] Murphy E.C., Zhurkin V.B., Louis J.M., Cornilescu G., and Clore G.M., *J. Mol. Biol.* **312**, 481 (2001).
- [6] Stott K., Tang G.S.F., Lee K.B., and Thomas J.O., *J. Mol. Biol.* **360**, 90 (2006).
- [7] Racca J.D., Chen Y.S., Brabender A.R., Battistin U., Weiss M.A., and Georidis M.M., *J. Biol. Chem.* **300**, 107683 (2024).
- [8] Miura I., Hasegawa Y., Ito M., Ezaz T., and Ogata M., *Biomolecules*. **14**, 14121566 (2024).
- [9] Takehara Y., Matsuda M., Myosho T. Suster M.L., Kawakami K., Shin-I T., Kohara Y., Kuroki Y., Toyoda A., Fujiyama A., Hamaguchi S., Sakaizumi M., and Naruse K., *Nat. Commun.* **5**, 5157 (2014).
- [10] Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., Ronneberger O., Willmore L., Ballard A.J., Bambrick J., Bodenstein S.W., Evans D.A., Hung C.C., O'Neill M., Reiman D., Tunyasuvunakool K., Wu Z., Žemgulytė A., Arvaniti E., Beattie C., Bertolli O.,

Bridgland A., Cherepanov A., Congreve M., Cowen-Rivers A.I., Cowie A., Figurnov M., Fuchs F.B., Gladman H., Jain R., Khan Y.A., Low C.M.R., Perlin K., Potapenko A., Savy P., Singh S., Stecula A., Thillaisundaram A., Tong C., Yakneen S., Zhong E.D., Zielinski M., Židek A., Bapst V., Kohli P., Jaderberg M., Hassabis D., and Jumper J.M., *Nature*. **630**, 493 (2024).

- [11] Keller W., Köning P., and Richmond T.J., *J. Mol. Biol.* **254**, 657 (1995).
- [12] Klemm J.D., Rould M.A., Aurora R., Herr W., and Pabo C.O., *Cell* **77**, 21 (1994).
- [13] Pavletich N.P., Pabo C.O., *Science* **252**, 809 (1991).
- [14] Jauch R., Ng C.K.L., Narashimhan K., and Kolatkar P.R., *Biochem. J.* **443**, 39 (2012).
- [15] Palasingam P., Jauch R., Ng C.K.L., and Kolatkar P.R., *J. Mol. Biol.* **388**, 619 (2009).
- [16] Klaus M., Prokoph N., Girbig M., Wang X., Huang Y.H., Srivastava Y., Hou L., Karasimhan K., and Kolatkar P.R., *Nuc. Acid. Res.* **44**, 3922 (2016).
- [17] Li S., Olson W.K., and Lu X.J., *Nuc. Acid. Res.* **47**, W26 (2019).

(原稿受付日: 2025 年 9 月 4 日)

著者紹介

上原秀太 Shuta UEHARA



株式会社ホギメディカル
研究開発本部 ND 部
〒 300-0427

茨城県稲敷郡美浦村布佐 1873-1

略歴: 2025 年北里大学大学院 修士課程修了
最近の研究: R-SUD (単回使用医療機器の再製造) 事業における研究開発業務

奥山ほのか Honoka OKUYAMA



北里大学大学院理学研究科
博士後期課程 3 年

〒 252-0373

神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

e-mail: okuyama.honoka@st.kitasato-u.ac.jp

略歴: 2023 年北里大学大学院 博士後期課程入学
最近の研究: 哺乳類の性決定遺伝子 Sry の分子進化機構の解析

趣味: 自家製酵母を用いたパン作り, 博物館巡り

伊藤道彦 Michihiko ITO



北里大学理学部 准教授

〒 252-0373

神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

e-mail: ito@sci.kitasato-u.ac.jp

略歴: 1990 年東京大学大学院 博士課程修了 (農学博士), 1990 年三菱化学生命科学研究科特別研究

員，1991 年北里大学衛生学部助手，1994 年北里大学理学部助手，2000 年北里大学理学部講師，2007 年より現職。
最近の研究：性決定システム進化、利己的 DNA を介する種分化，生命進化視点からの人類社会進化
趣味：アート鑑賞・生命進化系創作ラップ

松井崇 Takashi MATSUI



北里大学理学部 准教授

〒 252-0373

神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

e-mail: matsui@kitasato-u.ac.jp

略歴：2007 年北里大学大学院基礎生命科学研究科 博士課程修了，2007 年三菱化学生命科学研究所特別研究員，2009 年産業技術総合研究所産総研特別研究員，2010 年北海道大学先端生命科学研究院博士研究員，2012 年富山大学和漢医薬学総合研究所助教，2017 年東北大学生命科学研究科助教，2019 年北里大学理学部講師を経て 2024 年より現職。博士（理学）

最近の研究：質量分析計を用いたタンパク質の構造状態の可視化

趣味：サッカー観戦（鹿島アントラーズ），ドライブ