The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ラムダ・ファージCroたんぱく質のDNA認識機構 |
| Author(s) | 白川, 昌宏 |
| Citation | 大阪大学, 1988, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/36383 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【2】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 白川昌宏（しらかわ まさひろ） |
| 学位の種類 | 理学博士 |
| 学位記番号 | 第 8285 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和63年6月15日 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科生物化学専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **ラムダ・ファージ Cro たんぱく質のDNA認識機構** |
| 論文審査委員 | (主査)<br>教授 京極 好正<br>(副査)<br>教授 松原 謙一　教授 崎山 文夫　教授 濱口 浩三 |

## 論文内容の要旨

バクテリオファージλの cro protein（以下 Cro）はリプレッサー蛋白質で，CI リプレッサーと拮抗的にλファージの初期遺伝子の右オペレーター（$O_R$）と左オペレーター（$O_L$）に結合し，宿主菌を溶菌過程，或いは溶原過程に導く。Cro は1サブユニット当り66アミノ酸（分子量7,351）から成り，2量体として機能し，$O_R$中3箇所の17塩基対からなる部位$O_R$ 1～3を認識し，$O_R$ 3に最も強く結合する。

本研究では，λcro protein の溶液中での構造と$O_R$ 3に相当する合成DNAとの相互作用の様式を種々の核磁気共鳴法，遺伝子操作を主とした分子生物学的手法及びアミノ酸の化学修飾による蛋白質化学的手法により調べた。

まず構造，物性研究に必要な量の試料を得るために，大腸菌における Cro の大量産生プラスミド・ベクターを開発した。大腸菌の recA，trp，及び lac の各プロモーターとλの初期遺伝子の$P_RP_L$プロモーターの強度を in vivo で産生される cro－β－ガラクトシダーゼ融合遺伝子産物の酵素活性で比較した結果，新たに開発した recA プロモーターを用いた場合が最良であり，大量発現系として用いて，湿菌体グラム当り1mg以上の Cro が容易に調製できるようになった。

こうして調製した Cro に対し，通常の1次元NMR，2次元NMRのSECSY，COSY法や，核オーバーハウザー効果，photo－CIDNP法などの種々のNMRスペクトルを観測した。同時に Cro のチロシン残基のニトロ化，そのペプチド・マッピング及びニトロ化 Cro のNMR測定や，Phe 及び Leu 残基を選択的に重水素化した Cro のNMR，沈降平衡法による Cro の分子量の温度依存性を調べた。それらの結果から，Cro のNMRシグナルの帰属と，溶液中での表面構造と立体構造の知見を得た。

Cro とその特異的結合部位である$O_R$ 3合成DNAとの相互作用を観測すると，Cro の$\alpha_3$ヘリックス

と呼ばれる部分がＤＮＡと直接相互作用をしている事，$O_R$ 3 側のシグナルの変化から複合体形成により $O_R$ 3 の中央部分が変形している事，及び Cro 側にも 2 量体構造がゆるむ等の“誘導適合”が起こっている事が判明した。しかし，$O_R$ 3 と異なる塩基配列のＤＮＡとの相互作用では，Cro の誘導適合は観測されなかった。

$\alpha_3$ ヘリックス中の Lys32 を Ala，Gln 及び Asn 又 Lys56 を Thr に置換した変異体 Cro を用いて同様に合成ＤＮＡとの相互作用を調べた結果，特異的及び非特異的相互作用を担う残基が明らかになった。又，Val55 の代わりに Cys の残基を導入する事により 2 量体間にジスルフィド結合がかかった Cro が得られ，この Cro とＤＮＡの相互作用の観察から特異的結合における誘導適合の重要性が明らかになった。

## 論文の審査結果の要旨

白川君は遺伝子発現機構を分子レベルで解明しようとして，λファージの Cro リプレッサーの系を取り上げ，遺伝子操作技術，核磁気共鳴法を中心とした物理化学的手法を用いて問題解明に取組んだ。

この蛋白質は量的に得にくいので recA 蛋白質のプロモーターの下流に Cro 遺伝子を導入したプラスミドを作製し，大腸菌を宿主として量産化を試み，物性測定には充分な量が取れるようになった。この蛋白質について溶液中の構造解析を行い，結晶中と大差ないこと，ニトロ化の方法と光ＣＩＤＮＰによって分子表面に露出したチロシン残基の同定に成功した。オペレーターＤＮＡとの相互作用を見ると，この表面露出チロシンが結合に関与するほかに，Cro 蛋白質の 2 量体構造のゆるむことと同時にＤＮＡも変形をうけるような誘導適合の生じていることが認められた。

さらにこの蛋白質に部位指定アミノ酸置換の方法を適用して各種変異 Cro を作り，その構造とオペレーターＤＮＡとの結合の変化を観察した。その結果ある種のリジン残基はＤＮＡ一般との結合に必須であり，ある種のリジン残基は塩基配列の識別に重要なことがわかった。この結果は核磁気共鳴のアミドプロトンシグナルの挙動と良く対応して説明された。変異 Cro 蛋白質のうち55位の Val を Cys に変換したものは自働的に酸化されて 2 分子間でＳ－Ｓで架橋された二量体を形成した。このものは大変熱に安定になるが同時に，オペレーターＤＮＡとの結合能力も弱まる。ＤＮＡへの特異的な結合と，Cro 蛋白質の 2 量体構造との間には相関のあることが判明した。

以上のように白川昌宏君の研究は遺伝子発現という生物的な現象解明に遺伝子操作法のみならず，物理的，化学的な手法を導入して，分子レベルで解明するという新しい研究方式を作り上げたと同時に，現象そのものについても蛋白質と核酸の誘導適合という現象を見出してその意義を考察した点は理学博士の学位論文として充分価値あるものと判定する。