

Title	Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Structure and Interaction of Cyclic AMP Receptor Protein
Author(s)	李, 奉振
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37070
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・（本籍）	李	奉	振
学位の種類	理	学	博
学位記番号	第	9064	号
学位授与の日付	平成2年3月24日		
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	Nuclear Magnetic Resonance Studies on the Structure and Interaction of Cyclic AMP Receptor Protein NMRによるcAMP受容蛋白質の構造と相互作用に関する 研究		
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正		
	(副査) 教授 濱口 浩三 教授 崎山 文夫		

論文内容の要旨

cAMP受容蛋白質（CRP）はE. coliで働く遺伝子調節蛋白質でその制御下にある遺伝子が多種多様であり、かつその調節様式が多面的であるという特徴をもつ、CRP分子は同一のアミノ酸209個のsubunit 2個からなっており、2個のcAMPを結合する。1個のsubunitはcAMP結合domainとDNA結合domainからなる。

NMRは溶液中で原子レベルの構造情報を与える唯一の方法である。分子量が小さい蛋白質は（＜10000）NMRのみで完全な立体構造解析が可能となっているがCRPのように分子量（47000）の比較的大きい蛋白質の解析では特殊なNMRの技法が要求される。CRPの一部残基の帰属を意図して2個のトリプトファン、6個のヒスチジン、6個のチロシン、1個のバリン、3個のロイシン残基のpeakを同定し、一部のpeakについては特定の残基への帰属に成功した。これらの帰属はCPMGスピノエコー法、核オーバーハウザー効果（NOE）、¹⁵N標識、重水素標識、限定酵素分解、pH滴定等を通じて行なった。

CRPにeffectorのAMP、構造類似のcGMP、2'-deoxy cAMPを加えてpeakの変化を見た。cAMP結合によるCRPの構造変化は1個のcAMPが結合した時はほぼ終了する。cAMP結合によってCRP分子がコンパクトになるが、これはcAMP結合domainだけで起って、DNA結合domainへは伝達されない。cAMP結合はCRPの2個のsubunit間の配列の様式を変えて安定なdimer形成とDNA結合に適切な配置を持つ構造を作ると思われる。CRPにcAMPを入れた時Leu73とVal49に由来するメチルプロトンpeakが高磁場シフトして-0.15, -0.2 ppmに現われた。しかしcGMPと2'-deoxy cAMPを入れた時はこれらメチルプロトンのpeakが観測されなかった。従っ

てこれら peak は cAMP の適切な fitting の indicator として使用できる。

5 種類の変異 CRP を精製して NMR 実験を行なった。変異 CRP 2, 3, 4, 6 は天然 CRP と同じに高磁場 shift した peak が現われたが、高濃度の cAMP によって活性を示す CRP 5 の場合は高磁場シフトした peak が現われなかった。光 C I D N P 測定から CRP の C 末端にある β -11 と β -12 sheet 間の turn 領域が DNA との結合に拘わるのがわかった。従って今まで知られている DNA 結合モチーフの helix-turn-helix 以外にもこの turn 領域が DNA への結合に関与することが示唆された。

論文の審査結果の要旨

遺伝子の情報が発現される場合、種々の蛋白質が遺伝子に働いて発現の開始や停止、発現量の調節を行っている。それらの蛋白質は制御遺伝子の特定の塩基配列を識別してそこに結合し、遺伝子 DNA に変形を生じさせたり、調節蛋白質同志の相互作用によって RNA ポリメラーゼの働きを制御していると考えられている。その場合、蛋白質はどのような形で塩基配列を認識しているか、DNA と結合した時、どんなことが生じるのか、調節蛋白質の動きをコントロールしている低分子化合物エフェクターは構造的にどういった変化をもたらしているかを構造的に調べるのは意義深いことである。

李君は、調節蛋白質として大腸菌の遺伝子群の活性化因子 cAMP 受容蛋白質 (CRP) をとりあげ、核磁気共鳴法 (NMR) という手法を用いて種々の技法により相互作用の様式を明らかにすることを試みた。CRP は分子量約 47,000 の大きな蛋白質なので通常の NMR の測定は難しい。そこで李君は、運動性の高い残基のシグナルのみ検出する CPMG 法とか、安定同位体標識によるシグナルの除去によって、解析を行った。また DNA との相互作用の研究には光 C I D N P 法を使っている。それらの結果を用いて CRP の構造と相互作用に関するいくつか貴重なデータを得た。

まず軽水中の低磁場に現れる 4 本のシグナルを核オーバーハウザー効果 (NOE) の測定からヒスチジンの NH, トリプトファンの NH と同定した。サブチリシンで限定分解した試料ではヒスチジン残基のシグナルが 1 つ消失したことから、その残基は DNA 結合部位にあることが示された。芳香族領域のシグナルは重水素化したフェニルアラニン、トリプトファン、チロシンを用いて疑いなく帰属できた。cAMP が結合するといくつかのシグナルがシフトする。特に 0 ppm 付近高磁場のピークは、cAMP の結合様式を示すインディケーターとして使えることを明らかにした。cAMP の結合によって蛋白質の運動性が抑制されるが、それは cAMP 結合ドメインに限られ、DNA 結合ドメインに構造変化は伝わっていないことがわかった。その他、DNA への結合部位に C 末端のいくつかの残基が関与していることなどを初めて明らかにし、CRP と DNA の結合様式に明解な知見を得た。

このように李君の研究は、転写調節蛋白質の構造と相互作用の様式を明らかにした点は、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。