OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure and Interaction of the λ-Cro Protein Studied by Multidimensional NMR
Author(s)	松尾, 浩
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38865
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	松尾（まつお） 浩（ひろし）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 11212 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科無機及び物理化学専攻
学位論文名	Structure and Interaction of the λ-Cro Protein Studied by Multidimensional NMR （多次元NMRによるλ-Cro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 鈴木晋一郎　教授 中村 亘男

論文内容の要旨

λファージの持つDNA結合蛋白質Croについて，その構造と動的性質及びDNAとの相互作用を多次元核磁気共鳴（NMR）法を用いて研究した。

1）^{1}H, ^{13}C, ^{15}N NMRシグナルの完全帰属：

Cro蛋白質一分子は66個のアミノ酸からなり，対称的な二量体を形成する。二量体の分子量は14.7Kである。このように大きな分子量を持ち多くの原子を含む蛋白質の構造や性質をNMR法を用いて研究することは従来困難であった。主な理由はNMRシグナルの線巾の増大と重なりである。しかし遺伝子操作技術の発達と多重共鳴，多次元NMR法の発達によって状況は変化した。遺伝子操作技術により大腸菌を用いた蛋白質の大量生産系を確立し容易に^{13}C核あるいは^{15}N核といった安定同位体で蛋白質の^{12}C核あるいは^{14}N核を置換した蛋白質を得ることができる。安定同位体で標識された蛋白質を用いて従来の^{1}H核と併せて^{13}C核及び^{15}N核の核磁気共鳴を同時に観測し効率よくNMRシグナルの分離ができる。^{1}H核のみを使った帰属では蛋白質のアミノ酸配列の帰属は水素核間の距離情報によって行うため不確実であるが，多重共鳴NMR法ではアミノ酸残基間のone-bondあるいはtwo-bondで結合した核を同時に観測するため正確な帰属が可能である。

2）溶液中の立体構造の計算：

^{13}Cと^{15}Nで均一にあるいは選択的に標識されたCro蛋白質を使いその溶液構造を決定し，その動的性質やDNAとの相互作用をNMR法を用いて研究した。大きな蛋白質をNMR法を用いて研究する際問題になる化学シフトの消失や重なりを三次元，三重共鳴NMRによって克服しCro蛋白質のほとんどの原子核の化学シフトを帰属し，その帰属をもとに水素核間の距離情報を集めてCro蛋白質の三次元構造を分子動力学法の一変法であるsimulated annea-ling法をもちいて計算した。3次元，三重共鳴NMR法によって曖昧さのない帰属が可能になり結果的として信頼度の高いCro蛋白質の溶液中の三次構造を得た。

Cro蛋白質の三次構造において特筆すべきことはサブユニット分子間に疎水性残基によるcore構造が存在することである。このcore構造には一方のサブユニットのC末端に近い一つのアミノ酸残基の側鎖を核としてもう一方の全ての二次構造が関与しており，このことが三次構造を安定化させている主な要因である。このようなサブユニット分子間のcore構造はCro蛋白質と同じhelix-turn-helixモチーフを持つDNA結合蛋白質のファミリィ中の他の蛋白質にはみられない。NMRから得られた溶液構造と結晶構造を比較すると両者はよく似ているが二量体におけるそれ

ぞれの分子の配向は溶液中では結晶中に比べて緩い制限しか受けてないと考えられる。

3）DNA との相互作用：

Cro 蛋白質はλファージの遺伝子の転写をもうひとつの DNA 結合蛋白質 cI と拮抗して同じ DNA 領域に結合することによって調節している。Cro 蛋白質が最も強く結合する DNA 領域は O_R3 サイトと呼ばれる。Cro 蛋白質のアミド窒素とアミド水素及びカルボニル炭素の化学シフト変化を，Cro 蛋白質と O_R3 の複合体の系や O_R3 と相同性のない DNA との系において調べることによりその DNA 認識機構を明らかにした。従来のモデルでいわれていたとおり第三番目のヘリックス中のアミノ酸残基に DNA との直接の相互作用を示す大きな化学シフト変化が観測された。O_R3 との特異的な結合における Cro 蛋白質の結合面が明らかになったばかりでなく，β シート領域に誘起される構造変化が観測された。非特異的な DNA との相互作用の場合この構造変化は誘起されない。したがって Cro 蛋白質による DNA の塩基配列の認識は DNA と直接相互作用するアミノ酸配列と誘起される構造変化によって支配されている。

4）Cro 蛋白質分子の動的性質：

蛋白質主鎖のアミド窒素の核磁気共鳴の緩和時間を測定することによって Cro 蛋白質の構造中に 3 箇所の運動性の高い場所が明らかになった。縦緩和時間と横緩和時間及びアミド水素核とアミド窒素核の間の NOE を測定し Lipari & Szabo のモデルフリー理論に従って速い運動に対する制限を表すオーダーパラメーターを算出した。その結果，C 端の 7 残基においてはその速い運動はほとんど制限されておらず，β ヘアピンと N 端の残基においては緩い制限しか受けていないことがわかった。これらの運動性の情報を加えることによって，NMR から得た距離情報を用いて計算された蛋白質の構造はより溶液中における現実的な構造に近づくことができた。

論文審査の結果の要旨

松尾浩君は安定同位体で標識した Cro 蛋白質の多次元 NMR の解析からほとんどすべての ^{1}H，^{13}C，^{15}N 核のシグナルを帰属し，プロトン間の距離情報を収集した。Cro 分子は 2 量体であるが，サブユニット内，サブユニット間の距離情報を区別して収集し，そのことを考慮して，分子動力学的手法で計算して 2 量体の立体構造を求めた。さらに各残基の動的パラメーターを求め，分子内の動きやすい部分と，動きにくい部分を識別した。また，DNA との結合によって，Cro 蛋白質の直接に相互作用する部分，結合によって惹き起される構造変化の存在を確認した。このように松尾君は NMR 法を用いて蛋白質の動的，静的構造を徹底的に調べ，機能との関連を見出したことは，蛋白質の構造活性相関の研究に新しい知見を与えたことになり，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。