



Title	Structure and Function of the DNA-binding Domain of the yeast PH04 Protein
Author(s)	清水, 真人
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39052
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	清水 真人
博士の専攻分野の名称	博士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 11736 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	Structure and Function of the DNA-binding Domain of the <i>yeast</i> PHO 4 Protein (酵母 PHO 4 蛋白質の DNA 結合ドメインの構造と機能)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 京極 好正 (副査) 教 授 崎山 文夫 教 授 倉光 成紀

論 文 内 容 の 要 旨

酵母のりん酸代謝系において、PHO 4 蛋白質はりん酸枯渇時に種々の遺伝子の上流域に結合して転写を活性化し、細胞が生存していくための応答をひきおこしている。PHO 4 蛋白質の DNA 結合ドメインにはアミノ酸一次配列の相同性から構造モチーフ bHLH (basic helix-loop-helix) があることが予測されていた。bHLH では塩基性部分が直接 DNA に接触し H L H 部分はホモまたはヘテロ二量体形成に必要なだとされている。これまでこのモチーフを持つ MyoD, Max, USF, E47 の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の結晶構造解析がなされてきた。しかし、溶液状態では不安定であるから解析は困難であった。核磁気共鳴法 (NMR) は溶液状態での構造上の情報を得るには有効な方法であるが、シグナルの分離、強度といった点で分子量約 2 万が限界となっている。そこで、PHO 4 蛋白質全体ではなく bHLH モチーフを含む DNA 結合ドメイン部分のみを取り上げて構造化学的な解析を試みた。

1) DNA 結合ドメイン部分の大腸菌での発現系の構築を試みた結果、発現量、溶液状態での安定性ともに良好なものが得られた。この過程で、長さの異なる一連の部分蛋白質を作製し DNA 結合、二量体形成といった bHLH モチーフの基本的な性質を調べたところ、必要最小の構造単位は PHO 4 蛋白質の C 末端から 62 アミノ酸残基の部分であること、またさらにそこから N 末端側を取り除いた 49 アミノ酸残基部分は DNA 結合能は欠失するが二量体形成能は維持していることが判かった。

2) DNA 結合能を有する部分蛋白質 PHO 4 (85) と認識配列を含む DNA と混合し、その混合比に依存した円偏光二色性スペクトルの変化を調べた。その結果、DNA との結合に伴い蛋白質のヘリックス含量が増加する傾向にあること、DNA の側にも立体構造変化があることがわかった。さらにサーキュラーパーミューテーションアッセイを行ったところ蛋白質が結合したことで DNA に湾曲構造が誘起されることがわかった。

3) bHLH としては最小の部分蛋白質 PHO 4 (63) に関して ^{13}C , ^{15}N 安定同位体標識した試料、さらに $\text{C}\alpha$ 炭素核の緩和を抑制するため部分的に重水素化した試料を調製し、異種核多次元核磁気共鳴スペクトルを測定した。これらによりほとんど全ての主鎖 ^{15}N , ^{13}C , ^1H の帰属、一部の側鎖 ^1H のシグナルが帰属できた。

4) 3) で得られたシグナルの帰属をもとに NOE シグナルを同定し 2 次構造の決定をおこなった。基本的には他の bHLH 同様の二次構造配置を有していたがループ部の前半にヘリックス様部分がありこれは PHO 4 に特徴的であった。また DNA を加えた時のアミド水素核のシグナルの変化を調べたところ、DNA との相互作用を受け持っている塩基性部分だけではなくそこから離れた領域、主にループ領域にもコンホメーション変化が起こっていることが

判った。

以上, PHO4 の DNA 結合ドメインについて, bHLHモチーフの存在を明かにし, また DNA 結合に必要な部分と会合に必要な部分の同定, 溶液中の 2 次構造の情報を初めて明かにした。

論文審査の結果の要旨

清水真人君は酵母 PHO4 蛋白質のアミノ酸配列上ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) モチーフを含むと考えられている DNA 結合ドメインを発現させその性質を調べた。C 末端側 49 残基のみで 2 量体を形成すること, その N 末側に 13 残基塩基性部分が伸びると DNA 結合能が発現されるなどを明らかにし, 63 残基の 2 量体については異種核多次元 NMR 法で 2 次構造を決定した。さらに, 特異的な配列 UASp を持つ DNA オリゴマーとの会合実験より, 塩基性領域のみでなく中央のループ部分も結合に関与していることを示した。このように本論文は bHLH モチーフを持つ DNA 結合ドメインの性質と構造を明らかにしたことで博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。