



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 yeast PHO4 Protein (酵母PHO4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、PHO4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。PHO4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HLH部分はホモまたはヘテロ二量体形成に必要だとされている。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、PHO4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PHO4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結合能は消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PHO4(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。さらにサーチュラーパーミュ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PHO4(63)に関して<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N安定同位体標識した試料、さらに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<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>Hの帰属、一部の側鎖<sup>1</sup>H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PHO4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末端側に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。