

Title	Methylation-dependent switch mechanism of Escherichia coli Ada protein
Author(s)	阪下, 日登志
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39556">https://hdl.handle.net/11094/39556</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	坂 下 白 登 志
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 0 9 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 0 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Methylation - dependent switch mechanism of <i>Escherichia coli</i> Ada protein (DNA 修復蛋白質 Ada の機能スイッチ機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 京 極 好 正 (副査) 教 授 倉 光 成 紀 名 譽 教 授 浅 野 朗

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【序】

大腸菌 Ada 蛋白質は、アルキル化剤による DNA 損傷の修復及び一連の修復酵素群の誘導において中心的役割を果たしている。即ち、メチル化された DNA 中のメチルホスホトリエステルと O<sup>6</sup>-メチルグアニンからメチル基を自身の Cys69 と Cys321 にそれぞれ不可逆的に転移する活性を有する。Cys69 メチル基を受容すると Ada 蛋白質は、修復酵素遺伝子群のプロモーター領域に塩基配列特異的に結合する能力を獲得し、転写制御因子として機能する。僅かシステイン 1 残基のメチル化により転写制御活性が決定されるため、Ada 蛋白質は、蛋白質の機能スイッチの良いモデルになると考えられる。本研究では、この Cys69 メチル化により、Ada 蛋白質にどのような構造変化が起こるのか、またこの構造変化が、どのように塩基配列特異的な結合活性を誘導するのかという問題の解明に取り組んだ。以下に NMR 解析及び部位特異的変異法の結果より明らかにされた Ada 蛋白質の機能スイッチ機構について報告する。

### 【結果と考察】

Ada 蛋白質は、アミノ酸 354 個 (分子量 39kDa) からなる単量体で、亜鉛イオンを 1 個含んでいる。メチル化に依存した DNA 結合活性は、N 末端 179 残基 (N-ada20k) に局在している。まず機能ドメインを明らかにするためプロテアーゼによる限定分解を行い、N-ada20k より小さい 16kDa (N-ada16k)、14kDa (N-ada14k) の断片を得た。これらの断片は、修飾された DNA のメチルホスホトリエステルからメチル基を転移する活性を保持しており、また N 末端付近のアミノ酸配列は、完全に保存されていた。次に、これらの断片の発現系を構築して、それから精製された試料を用いて DNA 結合実験と NMR による構造解析を行った。その結果、N-ada16k (1-146) は、メチル化により DNA 塩基配列特異的な結合活性を示したが、N-ada14k (1-129) は、メチル化の有無にかかわらず、DNA に対する結合活性を失っていた。さらに NMR 解析から、メチル基転移活性を保持する N-ada14k は、2 本の  $\alpha$ -ヘリックスと 4 本鎖  $\beta$ -シートからなるドメインを含むことが結論された。さらに、この  $\beta$ -シートの端に 4 個 Cys 残基が空間的に近接して存在しており、ここに亜鉛原子が配位すると考えられた。これら Cys 残基のうち Cys69 は、亜鉛原子の配位子でありまたメチル基の受容体でもあるので、この部分がメチル化による機能スイッチを考える上で鍵であると考

えられた。

まず部位特異的変異体の解析に基づいてDNA結合部位の特定を試みた。その結果、特にF114I及びR118Qの2つの変異体は、DNA結合活性を完全に失っていた。これらの残基は、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフ (HTH) の認識ヘリックスの同じ側に位置している。実際、NMR解析からこの領域は、HTH構造をとっていることが確認された。次にこの領域 (102-123) がメチル化によりどのような構造変化を受けるのか $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HMQCスペクトルを用いて調べた。驚いたことに、このHTHに由来するシグナルは、メチル化によって全く影響を受けないことが判明した。

次に、亜鉛を $^{113}\text{Cd}$ イオンに置換した試料を用い、 $^{113}\text{Cd}$ -NMRを測定した。1D $^{113}\text{Cd}$ -NMRスペクトルは、メチル化の有無にかかわらず、単一のシグナルを与えた。これは、メチル化しても亜鉛原子の配位結合が切断されていないことを示している。さらに配位子の情報を得るため $^1\text{H}-^{113}\text{Cd}$ HMQCスペクトルを測定した。メチル化の前後でスペクトルを比較すると、Cys38, Cys42, Cys72の $\text{C}_\beta\text{H}$ のシグナルが検出され、またメチル化されたN-ada16kは、これらのシグナルに加えてCys69-S- $\text{CH}_3$ のシグナルも観測された。これらの事実は、メチル化により亜鉛の配位状態には変化がないことを示している。

メチル化及び非メチル化N-ada16kの $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HMQCスペクトルの比較から亜鉛原子近傍の領域に構造変化が起こっていることが明らかになった。さらに、ada boxを含む18mer2本鎖DNAをメチル化及び非メチル化N-ada16kの混合物のNMR実験から認識ヘリックスとCys69に新たに付加したメチル基、またはその近傍の残基が直接DNAと相互作用しAda蛋白質は、配列特異的結合活性を獲得すると考えられた。

## 論文審査の結果と要旨

阪下日登志氏は大腸菌のアルキル化剤によるDNA損傷の修復にかかわる酵素群の遺伝子誘導を行うAda蛋白質について、メチル基転移酵素活性を持つアミノ末端側のドメインの構造をNMRによって決め、DNA結合部位を同定し、1個のシステイン残基のメチル化が部分的な構造変化を起こすと同時に、DNA結合能を大幅に増大させることを示した。これらの結果は、メチル化が転写活性を増大させるという分子生物学的現象を、構造レベルで明らかにしたことであり、博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。