OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Solution Structure and Interaction of the Carboxyl-terminal Domain of the Escherichia coli RNA Polymerase α Subunit as Studied by NMR
Author(s)	田, 栄浩
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39911
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	田（でん）　栄浩（よんほー）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第　12334　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Solution Structure and Interaction of the Carboxyl−terminal Domain of the *Escherichia coli* RNA Polymerase α Subunit as Studied by NMR （NMRによる大腸菌RNAポリメラーゼαサブユニットC末端ドメインの構造と相互作用の研究）
論文審査委員	（主査） 教授　京極　好正 （副査） 教授　倉光　成紀　　教授　崎山　文夫

論文内容の要旨

大腸菌RNA polymerase（RNAP）のαサブユニットC末端の約100残基のドメインは，転写因子蛋白質または，プロモータの上流伸張部位のDNA（UPエレメント）に結合して，転写の活性化に関与することが知られている。申請者は，98残基からなるC末端ドメイン（αCTD）を大量発現して，NMRによる構造と相互作用の解析を行い，活性化の機構を考察した。

1．NMRシグナルの帰属及び3次元構造の計算

$^{15}N/^{13}C$で均一ラベルしたαCTD 2mM溶液を用いて，12種類の多重共鳴多次元NMR測定と，その解析を行い，主鎖及び側鎖の各^{1}H，^{15}N，^{13}C核のシグナルを帰属すると共に，2次元及び3次元NOESYスペクトルから，各^{1}H間の距離情報を収集して，822個のNOE距離制限，52個の二面角制限，19セットの水素結合位置制限を用いて，分子動力学simulated annealing計算を行い，主鎖のRMSD 0.67Åの精度で3次元構造を決めた。全部で4本のαヘリックスと，1個所のヘリックス様の部分と，両端にある2つの長いループでコンパクトな構造を取っている。

2．DNA結合部位の同定と転写因子接触部位のマップ

*rmB*P1 UPエレメントの配列に相当する25塩基配列のDNAと5種類の半分の長さのDNAを用いて，αCTD−DNA複合体の$^{1}H-^{15}N$相関スペクトルを測定し，シグナルのブロードニングによる消失からαCTDのDNA結合部と結合特性を調べた。その結果，UPエレメント結合部位は，helix 1，helix 4のN末端側，helix 4とhelix 3の間のループ部分に存在していることが分かった。その結合部位と，部位変異実験によって提案されている転写活性化因子CRP，OxyRとの結合部位を決められた3次元構造上に，マップしたところ，両方共に同じ表面にマップされた。また，UPエレメントの配列にはαCTDが結合できる2つのサイトが存在することが示唆された。

3．αCTDの主鎖のダイナミックス

RNAPαサブユニットのC末端側，約100残基の主鎖の運動性を，単離されたC末端ドメインと，全αサブユニット中のαCTD部分に対して，主鎖のアミド^{15}N核の緩和時間を測ることによって調べた。NとC末端ドメイン間の約16−18残基はドメイン構造を取っている部分と比べて高い運動性を示しており，2つのドメイン間に長いフレキシブルなループの存在が証明された。

以上の結果，大腸菌の転写調節において核心的な位置に存在しているαCTDの3次元構造と，その活性部位，ドメイン間のリンカー部分の運動性などを求め，これに基づいて転写の活性化におけるaCTDの役割を考察した。

論文審査の結果の要旨

田栄浩君は大腸菌のＲＮＡポリメラーゼを構成している５個のサブユニット中のαサブユニットのＣ末端側ドメイン98残基を大量発現し，その溶液中での立体構造を多核多次元ＮＭＲ法で決定した。これまでの分子遺伝学の研究でこのドメインは他の活性化因子との接触部位とされていたが，その意味が立体構造上で明らかとなった。原核生物のＲＮＡポリメラーゼの構造を部分的であるにせよ原子レベルで決めたのはこの研究が初めてであり，その生物学的意義も大きく，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。