



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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	でん 田 栄 浩
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 3 4 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 <i>Escherichia coli</i> 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lement) 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 (α CTD) 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

$^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ で均一ラベルした α CTD 2 mM 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 ^1H , ^{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 NOE SY スペクトルから、各 ^1H 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 0.67 Å 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ピング

rmB P 1 UP エlement 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、 α CTD-DNA 複合体の $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ 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 α CTD の DNA 結合部位と結合特性を調べた。その結果、UP エlement 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、マッピングしたところ、両方共に同じ表面にマッピングされた。また、UP エlement の配列には α CTD 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. α CTD の主鎖のダイナミクス

RNAP α 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 α CTD 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 α CTD 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 α CTD 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。