



Title	Structural Study of the $\lambda$ -Cro Protein-DNA Complex Using NMR
Author(s)	柄尾, 豪人
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40834">https://hdl.handle.net/11094/40834</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	柄尾豪人
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第13656号
学位授与年月日	平成10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	Structural Study of the $\lambda$ -Cro Protein-DNA Complex Using NMR (NMRによる $\lambda$ -Cro蛋白質-DNA複合体の構造研究)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正
	(副査) 教授 福山 恵一 教授 田嶋 正二

## 論文内容の要旨

$\lambda$ -Cro蛋白質は、 $\lambda$ ファージ DNAのオペレーター領域( $O_R$ )に特異的に結合し、転写の方向を制御する転写調節因子である。このオペレーター領域は、それぞれ17塩基対からなる $O_R1$ 、 $O_R2$ 、 $O_R3$ の連続した三つの部分から構成されている。これらの配列は相異性が高く、 $\lambda$ -Croはこれらのいずれにも結合するが、 $O_R3$ に最も強く結合する。

$\lambda$ -Croは66残基のアミノ酸から成る塩基性蛋白質であり、天然ではホモダイマーとして存在している。その溶液構造は既に決定され、DNA結合蛋白質によくみられる helix-turn-helix モチーフを持つことがわかっている。 $\lambda$ -Croとオペレーターの複合体の結晶構造はDNAが中央部で約40°屈曲していることを示したが、結晶の回折能の悪さから3.9オングストロームの分解能しか得られておらず、いまだ $\lambda$ -Croの塩基配列認識については詳細な構造学的知見が得られていない。本研究はこのような背景のもと、 $\lambda$ -Croの塩基配列認識をより詳細に理解するため、 $\lambda$ -CroとオペレーターDNAの複合体の立体構造決定を目標に行われた。

NMRにより蛋白質の立体構造解析を行うには、通常蛋白質溶液のpH、塩強度、温度などの溶液条件の至適化が必要となるが、蛋白質-核酸複合体の様な解離会合系で複合体の構造解析を行うためには、解離状態と会合状態の間の化学交換の影響も重要な要素となる。

種々検討の結果、 $O_R1$ 、 $O_R2$ 、 $O_R3$ のコンセンサス塩基配列を用いて調製した複合体がもっとも安定で良好なNMRスペクトルを与えることを見出し、以後のNMR測定に供した。

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で二重標識した $\lambda$ -Croを調製し、これと安定同位体非標識DNAオリゴーを混合し複合体を形成させ、至適化した溶液条件で、NMR測定を行った。得られた水素核間の距離制限から、simulated annealing法により複合体の立体構造を計算した。なお、DNAについて十分な数の距離制限が得られなかったため、計算過程でDNAのりん酸原子の座標をBrennanらが結晶解析で得た屈曲したDNAに沿わせるように制限を加えた。

その結果、 $\lambda$ -Croの各サブユニットの構造は複合体中でも蛋白質単独のときと大きく変わっていなかったが、helix-turn-helixモチーフによく見られるように、 $\lambda$ -Croのturn-helix部分がDNAの主溝にはいりこみ、これに伴い二つのサブユニット相互の配向が大きく変化していた。また、蛋白質単独ではランダムコイルと考えられているC末端部分がDNAのりん酸骨格部と相互作用している事がわかった。Gln27、Ser28、Lys32、Arg38などの極性残基とDNAとの水素結合、或いは静電的相互作用の他に、Thr17、Val25、Ala29のメチル基とチミン塩基部のメチル基

との疎水的相互作用がみられた。これらのチミン残基をウラシル残基に置換すると  $\lambda$ -Cro 蛋白質-DNA 複合体の安定性が低下することが知られていることから、このメチル-メチル相互作用は  $\lambda$ -Cro 蛋白質の塩基配列認識に重要であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

柄尾豪人君は  $\lambda$  ファージの Cro リプレッサーと、そのオペレーター領域の 17 塩基対の核酸分子との間に水溶液中で安定な複合体を形成する条件を調べ、その複合体の構造を核磁気共鳴法を用いて決定した。その結果リプレッサー蛋白質と核酸塩基間の相互作用様式が明らかになり、塩基配列の少しずつ違う 3箇所のオペレーター領域への結合定数の違いを説明することが出来た。このことは、今後各種転写因子がどのようにして塩基配列を識別しているかを予測解明するのに重要な情報を与えるものであり、博士（理学）の論文として十分価値あるものと認める。