3PA133

lacプロモーターの細胞型進化分子工学Ⅲ

○太田繁、伊藤洋一郎、伏見譲（埼玉大・工）

本研究は大腸菌プロモータの適応度地形の探査及びプロモータの強度最適化を目的としている。この際、lacプロモータを出発配列とし、進化分子工学の対応付け戦略としては、細胞型を用いた。細胞型戦略とは、遺伝子型分子と表現型分子を1つのコンパートメント(例: *E. coli* 細胞)に閉じ込めるものである。

前回報告したように、プロモータ強度のレポーターとしてGFPを使用し、lacプロモータの-10領域と-35領域を含む42塩基に突然変異を持つ変異体集団を蛍光セルソータで淘汰する系を確立した。その際、GFPの過剰発現が宿主(*E. coli*)を致死にするため、プラスミドのコピー数を15まで下げた系を開発した。

今回、初期突然変異プール(突然変異率 0.05)の淘汰実験で得られた有利突然変異の知見をもとに、2次突然変異体プール(仮想最適配列に対し変異部位11ヶ所で0.15の突然変異率)を作成した。このプールに対する実験の結果、野生型に対し約20倍プロモータ強度の高い変異体を得られた。さらに高いプロモータ強度を持つ配列を探索するため、更にコピー数を下げたプラスミド(レプリコンをpSC101由来、コピー数約5)を作成した。淘汰実験で得られた配列とプロモータ強度との関係からプロモータの適応度地形を調べた。いくつかの部位については、有利突然変異の相加性が確認できた。また、-10領域と-35領域の間に1塩基のdeletionを持つ突然変異体はプロモータ強度が約2倍上がるのがわかった。

S.Ohta, Y.Ito, Y.Husimi: Evolutionary molecular engineering of cell-type for lac promoter Ⅲ

3PA135

染色体セントロメアタンパク質 Abp1 の溶液構造とその DNA 認識機構

○菊地淳¹、岩原淳二²、木川隆則^{1,3}、村上洋太³、岡崎恒子⁴、横山茂之^{1,2,3}¹ 理研 GSC, ² 理研細胞情報伝達, ³ 京大ウイルス研, ⁴ 藤田保健大, ⁵ 東大理

＜緒言＞ 真核生物の染色体分裂に直接関与している領域はセントロメアと呼ばれ、そのDNAは繰り返し配列で構成されるという特徴をもっている。本研究では分裂酵母のセントロメア領域に存在する分子量17kDaのタンパク質、Abp1と上記の繰り返しDNA配列(AM21)との分子量30kDaの複合体について、多次元NMR法の技術駆使してAbp1のDNA認識機構に迫ることを目的としている。

＜方法＞ ²H,¹³C,¹⁵N 三重標識した Abp1, ならびに ¹³C,¹⁵N 二重標識した AM21 各々についての [²H,¹³C,¹⁵N]-Abp1/DNA ならびに Abp1/[¹³C,¹⁵N]-DNA 複合体を NMR サンプルとした。これらの各種多核多次元 NMR 測定を Bruker DRX-600NMR 装置を用いて行い、NMR 化学シフトの帰属とその NOE 解析をプログラム nmrPipe, nmrView により遂行した。得られた1700組のNOE距離制限、198組の二面角制限、ならびに106組の水素結合に関する構造情報を基にしてプログラム X-PLOR を用いて立体構造計算を試みた。

＜結果および考察＞ まず Abp1 単体と AM21 共存下の [¹H-¹⁵N] HSQC スペクトルを比較すると、後者について化学シフトの分離が劇的に良くなり、複合体形成により Abp1 の立体構造が大きく変化していることがわかった。DNA 共存下について決定した Abp1 の溶液構造はドメイン1について0.42Å、ドメイン2について0.52ÅのRMSD値で主鎖構造が収束し、共にhelix-turn-helixと呼ばれるDNA結合タンパク質によく見られる構造モチーフを有していた。ここで、DNA認識部位を推測するために0-700mMの範囲でNaClを滴下すると、静電的相互作用が弱まるためにブロードニングを起こす残基が立体構造上の片面に分布していた。一方、AM21についてもAbp1の共存、非共存下でNMRシグナルを比較すると、12T,13Tのイミノプロトンの著しい低磁場シフトが観測され、複合体形成に伴いDNAが屈曲することが示唆された。現在、このようなより巨視的な配向情報をNMRスペクトルから実験的に得るために、NMR磁場依存もしくは液晶配向により得られるResidual dipolar couplingの値を定量的に観測する試みを行っている。

J.Kikuchi, J.Iwahara, T.Kigawa, Y.Murakami, T.Okazaki & S.Yokoyama; Solution structure of centromere protein Abp1, and its recognition to the DNA.

3PA134

DNAの分子当たりの熱分解率はDNA濃度に依存する

○忠垣憲次郎、平野史子、松浦友亮、四方哲也、卜部格
(大阪大学大学院・工学研究科・応用生物学)

DNAに熱を加えると、断片化され分解する。また、熱処理の温度が高いほどDNAはより断片化される。しかし、熱処理時のDNA濃度が異なると、各濃度での断片化に違いが生じる結果が得られた。つまり、特定の濃度でDNA分解がより進んでいるという現象が見られたので報告する。

まず、DNAに様々な条件で熱処理を行った。そして、PCRで元のDNAの残存率を調べた。その結果、熱処理の回数を増やすに従い残存率が減少していた。次に、熱処理時の鋳型DNAの濃度を200~0.1ng/ulで変化させた。すると、10ng/ul付近の濃度で熱処理したDNAを鋳型として用いた時だけPCRの増幅が見られなくなった。この現象は配列やDNAが環状か鎖状であることによらず見られた。そこで、200~0.1ng/ulの濃度の熱処理した鋳型DNAの一定量をアガロース電気泳動した。いずれもDNAが断片化し分解されているのが見られた。そして、10ng/ul付近の濃度ではより分解が進んでいることがわかった。

これらのことから、DNA分子の熱分解は回りのDNA分子の存在率によっていることがわかった。このことは、回りのDNA分子が分解反応に関与していることを示唆する。

K.Tadagaki, F.Hirano, T.Matsuura, T.Yomo, I.Urabe
Fragmentation of DNA molecules depends on their concentration.

3PA136

HuCの2つのRNA結合ドメインによる1本鎖RNAの認識機構

○井上 真^{1,2}、武藤 裕¹、坂本 博³、横山茂之^{1,2}

(1東大・理・生化学, 2理研・GSC, 3神戸大・理・生物)

RNA結合ドメイン(RNA-binding domain, RBD)は、およそ90アミノ酸残基からなる保存配列を持ち、1本鎖RNAと結合することでRNAの代謝制御に関わると考えられているドメインである。興味深いことに、RBDの多くはタンパク質1分子中に複数個タンデムにつながった形で見いだされるが、それらによるRNA認識機構には不明な点が多い。本研究では、神経分化関連因子HuCタンパク質のN末端側の2つのRBD(RBD1, RBD2)に着目し、NMR法によりその立体構造およびRNA結合能を解析することで、それら2つのRBDによる1本鎖RNAの認識機構を明らかにしたので報告する。

まず、RBD1, RBD2各々の立体構造をNMR法により解析した結果、RBD1, RBD2とも4本のストランドからなる反平行βシートを2つのαヘリックスが裏打ちする立体構造を示した。次にRNAを添加に伴うRBD上のシグナルの化学シフト変化を測定することで、RNA結合様式を解析した。その結果、RNAはRBD1, RBD2それぞれのβシート面上に短い寿命で弱く結合したのに対し、RBDが2つつながったRBD1-RBD2では安定な複合体を形成した。これにより、RBD1, RBD2は協働的にRNAを認識していることが明らかとなった。さらに、このRBD1-RBD2がつながった状態でのRNAとの複合体の立体構造を解析した結果、1本鎖RNAが2つのRBDに挟まれる形で認識されていることが明らかとなった。

M. Inoue, Y. Muto, H. Sakamoto, S. Yokoyama: The recognition mechanism of the single-stranded RNA by the two RNA-binding domains of HuC.