1C1500

RNAポリメラーゼIIのC末端ドメインに存在するタンデムリピート (YSPTSPS)_n の構造：環状化ペプチドのNMR解析

○熊木 康裕¹, 松嶋 範男², 吉田 均³, 新田 勝利³, 引地 邦男³ (¹北大・理・NMR, ²札幌医大・保健医療, ³北大・院理・生物科学)

RNAポリメラーゼIIの最大サブユニットのC末端ドメイン (CTD) はYSPTSPSのヘプタペプチドを単位配列としたタンデムリピートから構成されている。CTDは真核生物間で良く保存されており、生体内においてリン酸化されることで転写の開始と伸長が制御されていることが示されている。このCTDの単位配列はタイプI型の β -ターンの形成能が高いと考えられるSPXXモチーフを2つ (SPTS及びSPSY) 有しているが、NMR及びCDの研究から、この単位配列を含む鎖状ペプチドは水溶液中において柔軟性に富み、SPXXモチーフにおける β -ターンはマイナーな構造として存在することが示された。またCTDはドメイン全体としても高い柔軟性をもつことが既に報告されている。このCTDのタンデムリピートにおいて2つのSPXXモチーフがもつターン形成能及び柔軟性について定性的な知見を得るために、我々はYSPTSPSを含む環状モデルペプチドについてNMR解析を行った。両末端に導入したCys間のジスルフィド結合によって環状化された単位配列を1つ及び2つ含む2種類の環状ペプチドを化学合成し、これらについて各種2次元¹H-NMR測定を行い、NOE、³J_{HNH α} 、HNプロトンの化学シフトの温度依存性、H α プロトンの化学シフトのランダムコイル値からのずれを求めた。その結果2つの環状ペプチドにおいてPTS部分は鎖状ペプチドと明らかに異なるNMRパラメータを示し、このパラメータはSPTS部分におけるターンの構造の存在と相容れるものであった。このことからSPTS部分におけるターンの構造は環状化によって支配的となったと考えられる。一方もう一つのSPXXモチーフに相当するSPSYについては環状化による安定化の効果は見られず、柔軟性が高いことが示された。

Y.Kumaki, N.Matsushima, H.Yoshida, K.Nitta, and K.Hikichi : Structure of the YSPTSPS repeat within the CTD of RNA polymerase II: NMR studies of cyclic peptides containing the repeat units

1C1530

HIV-2 スクレオキャプシドタンパク質機能発現部位の部分アミノ酸置換体の立体構造解析

○遠藤 弘¹, 小寺 義男¹, 佐藤 一紀^{2,3}, 小松 博義⁴, 前田 忠計¹, 河野 俊之² (¹北里大・理・生体分子動力学, ²三菱生命研, ³福岡女子大・人間環境, ⁴北里大・医療衛生・臨床免疫)

HIVのスクレオキャプシドタンパク質 (NC) はウイルス粒子の増殖の際に宿主細胞内でウイルスRNAと結合し、新たなウイルス粒子にパッケージングする、ウイルス増殖に必要な不可欠なタンパク質である。

HIV-1のNC (NCp7) に関しては機能、立体構造両面において数多くの研究が行われ膨大なデータが蓄積されている。しかし、ウイルスRNAを認識して結合するメカニズムについては明かな結論がない。当研究室ではHIVのNCのRNA認識機構を解明するために、HIV-2のNC (NCp8, 49アミノ酸残基) をターゲットとして研究を進めている。我々は既にRNAを認識するための最小単位であるNCp8のN端側部分ペプチド (NCp8-fl) の立体構造解析を行った。その結果、機能発現に重要な塩基性に富む7アミノ酸残基 (linker領域) が安定した構造を形成していること、その原因がAsn11の側鎖とlinker領域の主鎖の間の水素結合であることがわかった [1]。そこで本研究ではAsn11をAlaに置換したNCp8-flの変異体 (NCp8-fl/N11A, 29アミノ酸残基) を調製し、NMRを用いて立体構造解析を行った。その結果、linker領域の構造に興味深い違いがあることがわかった。発表では、NCp8-fl/N11Aの立体構造解析の結果をNCp8-fl, NCp7およびmouse mammary tumor virusのNCと比較してRNAを認識するための構造要素について議論する。

[1] Y. Kodera, K. Sato, T. Tsukahara, H. Komatsu, T. Maeda, and T. Kohno. Biochemistry **37**, 17704-17713, 1998.

H. Endo, Y. Kodera, K. Sato, H. Komatsu, T. Maeda and T. Kohno : Effect of a single amino acid substitution (N11A) on structure of the minimal active domain of HIV-2 nucleocapsid protein

1C1515

非ヒストン蛋白質HMG-2Bドメインの残余双極子効果による立体構造精密化

楯 真一¹, ○上林 円¹, 仲谷 幸司¹, 江奈 武一郎³, 吉岡 研一², 吉田 充輝², 甲斐 正恒³ (¹北陸先端大・新素材センター, ²東理大・基礎工, ³都立大・理)

[序] 真核細胞における遺伝子発現制御・複製に広くかかわることが知られている非ヒストン蛋白質であるHMG1およびHMG2は、配列非特異的にかつ立体構造特異的にDNAに結合することが知られている。HMG1とHMG2はお互い高いアミノ酸配列の相同性を持っているが、それぞれ機能上の差も認められている。我々は、配列相同性が高いにもかかわらず明らかな機能上の相違をもつHMG1とHMG2の構造上の微細な違いを明らかにし、この機能上の差を発現する立体構造の特徴を明らかにすることを目的として、これまで構造が未知であるHMG2の立体構造解析を行っている。今回は、DNA結合に関して主要な役割を持つHMG2のBドメインの精密な立体構造解析の結果について報告する。[結果・考察]HMG2は、HMG-boxと呼ばれるDNA結合ドメイン2つを持つ蛋白質である。N末端側からAドメイン、Bドメインと呼ぶが吉田らの最近の研究よりBドメインがDNA結合に関して主要な役割を果たしていることが示されている。我々は、定法に基づいたNOE・2面角情報によるHMG2Bドメインの立体構造を得た上で、さらにbicelle共存下およびHMG2Bドメイン蛋白質がもつ磁場配向により現れる残余双極子効果を用いて、高度に蛋白質の全体構造の精密化を行った。その結果、すでに立体構造が解かれているHMG1のBドメインとは、3つの α -helixからなる基本構造は同じであるが、DNAと接触する第1helixの配向およびDNAのminor grooveに楔として相互作用するF18の向きに有意な相違が見つかった。発表では、構造精密化の詳細と、今回の解析で見つかった構造上の相違に関してその生物学的な意味を議論する。

S.Tate, M.Kanbayashi, K.Nakatani, B.Ena, K.Yoshioka, M.Yoshida and M.Kainosho : Residual dipolar structural refinement of B-domain in the HMG2 protein

1C1600

ヒトリプレッサーMBD1のメチル化DNA結合ドメインの溶液構造とDNAとの相互作用

○下竹 敦哉¹, 大木 出¹, Jee JunGoo¹, 藤田 直之², 中尾 光善², 白川 昌宏¹ (¹奈良先端大・バイオ, ²熊本大・医)

脊椎動物のDNAにはCpG配列のシトシンの5位がメチル化修飾を受けたm⁵CpG配列があり、その配列は近傍遺伝子の発現抑制、クロマチン構造の安定化や不活性化等、様々な働きに関与する。このm⁵CpG配列は、約70アミノ酸残基から成るm⁵CpG結合ドメイン (MBD) により特異的に認識される。現在までにこのドメインはMBDファミリーとして5種類のタンパク質中に見つかっており、最近、MBDを持つリプレッサータンパク質MeCP2が進行性神経発達障害を主症状とするRett症候群の責任遺伝子産物であること、多くの変異がそのMBD部分にあることがわかり、DNAメチル化は臨床的な注目も集めている。本研究で扱ったhuman MBD1は、体細胞中に広く存在する転写リプレッサータンパク質であり、N末端側にあるMBDを介し、*in vivo*, *in vitro* のどちらでもメチル化されたプロモーターに対し結合能を持ち、転写抑制を行う。我々は昨年度の年会において、NMRによりMBD1MBDの立体構造を決定したことを報告したが、今回は更にNMRを用いた解析と部位特異的変異体解析を行うことで、MBDとメチル化DNAの結合様式に対する詳細なモデルを立てることができた。発表では、このMBDのDNA認識機構について、更にはMeCP2のMBDの変異とRett症候群との関係について議論する予定である。

N. Shimotake, I. Ohki, J.-G. Jee, N. Fujita, M. Nakao, M. Shirakawa : Structure of the methyl-CpG-binding domain of hMBD1 and its interaction with methylated DNA