1L1400

リンカー領域の塩基配列改変によるラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の転写因子 SmtB の塩基配列認識機構の解析

○若松 美紀、三浦 晃、森田 勇人、林 秀則（愛媛大院・理工・物質理）

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の転写因子 SmtB は、メタロチオネイン様タンパク質 SmtA をコードする *smtA* 遺伝子の転写を抑制するリプレッサーであると同時に、細胞内で亜鉛イオン等の重金属イオン濃度のセンサーとしても機能する。SmtB が亜鉛イオンと結合すると、オペレーター/プロモーター領域に対する親和性を失い、*smtA* 遺伝子の転写が誘導される。SmtB の認識塩基配列は、自己相補的配列を形成しており、それらは 6 塩基から成るリンカーにより結ばれている。またこのような配列は、*smtA* のオペレーター/プロモーター領域に 2 箇所存在しており (Bbs1、Bbs2)、それぞれの部位に対する SmtB の親和性の差や、なぜ 2 箇所存在するかなどは不明である。本研究では、リンカー部分の GC 含量を変化させた認識塩基配列を含むモデル DNA を作製し、自己相補的配列の空間的な変化による SmtB との親和性の変化をゲルシフト法で解析した。その結果、Bbs1 の自己相補的配列同士の空間的距離が変化しても、SmtB は親和性がわずかに低下するものの、特異的認識能を保持していた。このことから、SmtB は、Bbs1 の認識に対して構造上の柔軟性を示すと推測した。現在、Bbs2 に対する親和性の解析ならびに、点変異を導入した SmtB を用いた場合の認識塩基配列に対する親和性と構造上の柔軟性の相関を解析している。

M. Wakamatsu, A. Miura, E. H. Morita, H. Hayashi : Studies on recognition of DNA motif by the transcription factor, SmtB from *Synechococcus* sp. PCC7942 with modification in linker region

1L1430

蛍光異方性を用いたヘム含有転写調節因子 CooA-DNA 結合活性の研究

○山本 克彦¹、石川 春人¹、石森 浩一郎¹、森島 績¹、中島 洋²、青野 重利²（¹ 京大院・工、² 北陸先端大・材料科学）

光合成細菌中に存在する転写調節因子である CooA は嫌気下、CO を感知して DNA に結合することで細菌の CO 代謝系の発現誘導を行うヘム蛋白質である。CooA のエフェクターである CO はヘム鉄に配位することで、その蛋白質部分に構造変化を起こして DNA 結合活性を発現させる。CooA はヘムの配位状態によって DNA 結合活性を制御する現在知られている唯一の例であり、その構造・機能相関は生体における転写調節に新たな機構を提示するものである。本研究では CooA の機能・構造相関を解明する上で重要と考えられる、CooA-DNA 相互作用の *in vitro* での直接的な観察を試みた。方法としては、高分子間の結合を溶液中でモニターできる蛍光異方性の測定により、標的配列を含む蛍光標識した二重鎖 DNA を用いて CooA と DNA の複合体を蛍光異方性の増加として検出することで行った。CO 雰囲気下、二重鎖 DNA を一定濃度 (10nM) として、CooA 濃度に対する蛍光異方性の変化を滴定曲線により追跡したところ、蛍光異方性は特異的な結合を示す S 字型の増加を示した。CooA と標的 DNA 間の平衡解離定数 (K_d) は約 58nM と見積もられ、この値は CooA と相同性の高い蛋白質である、大腸菌のラクトースオペロンに存在する転写調節因子 CRP の K_d (約 1.2nM) より一桁大きい値であった。以上の結果は CooA と DNA との複合体を溶液中で直接観察した初めての例であり、CooA の機能発現の分子機構を解明する上でこのような蛍光異方性の測定は種々の新しい知見を与えてくれるものと期待できる。

K.Yamamoto, H.Ishikawa, K.Ishimori, I.Morishima, H.Nakajima, S.Aono : Study on DNA-binding Activity of Heme-containing Transcriptional Regulator CooA by Using Fluorescence Anisotropy

1L1415

F 因子分配遺伝子産物 SopA タンパク質のドメイン構造と機能

○柴田 理恵¹、本藤 隆亨²、花井 亮¹（¹ 立教大・院理・生命理学、² (現) 堀越ゾーンセクタープロジェクト）

大腸菌 F 因子プラスミドには自身の分配機能を担う sopABC 遺伝子群があり、SopA・SopB タンパク質をコードする領域と SopB タンパク質が結合する sopC 領域から成る。これらの遺伝子同士およびホスト大腸菌との相互作用により分配が成り立っている。SopA は sopAB オペロンのオートリプレッサーであり、かつ、SopB と同時に相互作用する。しかし、この相互作用や SopA の持つ ATPase 活性の分配メカニズムにおける意義は不明である。我々は、タンパク質のフットプリント法を中心に用いて SopA のドメイン構造を解明することから、これらの疑問にアプローチしている。SopA タンパク質 (388 残基) の N 末端に T7 タグを含む 14 残基のペプチドと、C 末端に HA タグを含む 18 残基のペプチドを付与したものを、大腸菌で発現させ精製した。このタンパク質の種々の消化酵素による切断部位とその感受性をウェスタンブロットングで検出し、DNA、ATP の SopA への影響を調べた。結果は次の通りであった。(1) SopA の N 末端側約 30 残基と C 末端側約 50 残基は高感受性であり、中央部付近の約 150 番目と約 210 番目のアミノ酸あたりにも高感受性の部位があった。(2) SopA 結合配列をもつプラスミド DNA のみの存在下では、感受性の変化はなかった。ATP のみの存在下では、N 末端側の感受性の減少がみられた。両者の存在下では、感受性の減少が著しかった。(3) DNA、ATP の有無にかかわらず、SopB 存在下では C 末端側約 200 残基の多くの部分で消化酵素からの保護が確認された。以上のことから、SopA タンパク質は ATP 結合部位をもつ N 末端側ドメインに構造変化を起こし DNA に結合することと、SopB とは C 末端側ドメインで相互作用することがわかった。現在、この結果を他の手段で検証する実験を行っている。

R.Shibata, T.Hondoh and R.Hanai : Structure-function relationship of E.coli F-plasmid SopA protein involved in partitioning of the episome

1L1445

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来、光回復酵素の結晶構造解析

○小森 博文¹、辻内 宏²、増井 良治^{2,3}、倉光 成紀^{2,3}、横山 茂之^{3,4}、柴田 武彦³、井上 頼直³、三木 邦夫^{1,3}（¹ 京大・院理、² 阪大・院理、³ 理研、⁴ 東大・院理）

遺伝情報の担い手である DNA は紫外線によって常に損傷を受けている。遺伝情報を保持するために、DNA の損傷を修復することは生物の生存にとって大変重要である。DNA 光回復酵素は、可視光のエネルギーを利用して紫外線によって損傷した DNA (ピリミジンダイマー) を修復する。光回復酵素はその修復反応を担う触媒補欠分子 (FAD) の他に、可視光のエネルギーを吸収し FAD に伝達する集光性補欠分子を持っており、その種類によって異なる波長を吸収する二つのタイプ (MTHF 型と 8-HDF 型) に分けられる。それぞれのタイプの光回復酵素 (*E.coli* 由来と *A.nidulans* 由来) の立体構造は既に決定されており、酵素活性の効率の違いが集光性補欠分子の結合様式に依存していることが明らかにされている。好熱菌として初めて単離された高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の光回復酵素は、熱安定性が高く機能解析に適しているが、その集光性補欠分子の化学種は明らかでない。我々は、その構造の特徴を明らかにする目的で、この光回復酵素の X 線結晶解析を行った。

構造解析に用いた結晶は、空間群 $P6_322$ に属し、 $a=b=113 \text{ \AA}$ 、 $c=142 \text{ \AA}$ 。非対称単位中に 1 分子存在している。重原子同型置換法によって位相を決定し、全アミノ酸 420 残基と触媒補欠分子 FAD 1 分子を含むモデルを構築した (集光性補欠分子は結合していない)。現在、結晶学的精密化を行っている。全体構造は *E.coli*、*A.nidulans* 由来のものと同様に似ているが、ループ領域が短くなっていたり、プロリンが連続しているなど、熱安定性と関係すると思われる特徴が見つかっている。一次構造の相同性は *E.coli* 由来のものの方がやや高いが、集光性補欠分子の結合部位の比較から *A.nidulans* 由来のものと同じ 8-HDF 型である可能性が高いことが示唆された。

H.Komori, H.Tsujiuchi, R.Masui, S.Kuramitsu, S.Yokoyama, T.Shibata, Y.Inoue and K.Miki : Crystal structure determination of DNA photolyase from *Thermus thermophilus*