1M1515

系統的一塩基置換による SYCRP1-DNA 結合自由エネルギー変化

○尾曲 克己¹、吉村 英尚¹、高野 光則¹、Dongyun Hao²、大森 正之¹、皿井 明倫³、陶山 明¹ (¹ 東大院・総文・生命、² 産総研、³ 理研・筑波研)

It is necessary to know thermodynamic and structural information in order to understand how proteins recognize specific DNA sequences. To obtain thermodynamic information, it is useful to investigate binding free energy changes through systematic substitutions of base pair and amino acid.

In this study, we have investigated the binding free energy changes for *Cyanobacterium Synechocystis* sp.PCC 6803 cAMP protein (SYCRP1) by systematic single base-pair substitutions using quantitative electrophoresis mobility shift assay(EMSA). DNA sequences used in this study are the consensus DNA site for binding of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein (CRP) and its mutant DNA sites having complete single-base substitutions of DNA base pair at position 4 through 8. The binding affinities of SYCRP1 appear to be similar to those of CRP previously studied by other group. Especially, specificities at position 5 and 7 were the highest, with the largest affinity changes. According to the X-ray structure of CRP-DNA complex, these sites take part in hydrogen bond between nucleotide and amino acid. SYCRP1 has a domain homologous to DNA-binding region of CRP even though SYCRP1 shows only 23% total amino acid identity with CRP. We discuss DNA-recognition mechanism of SYCRP1 by comparing the observed affinity changes to those reported for CRP.

K.Omagari, H.Yoshimura, M.Takano, D.Hao, M.Ohmori, A.Sarai, A.Suyama : Binding Free Energy Changes for the interaction of SYCRP1 with DNA by Systematic Base Pair Substitution

1M1600

DNA 分子鎖の高次構造変化による制限酵素活性の抑制

○小穴 英廣^{1,4}、湊元 幹太^{2,4}、吉川 祐子^{3,4} (¹ 京大院・理、² 名大院・人間情報、³ 名文理短・食物栄養、⁴CREST)

[目的] これまでに我々の研究グループは、DNA 溶液中の spermine 濃度を増加させていくと、ある濃度を境に DNA 分子の形態がランダムコイル状態からコンパクトな凝縮状態に一次相転移することを蛍光顕微鏡法による直接観察から明らかにしている。今回、spermine と共存させた lambda DNA (48502 bp) を制限酵素 ApaL I によって切断し、得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動にかけることにより、DNA 分子鎖高次構造と制限酵素に対する感受性の相関を調べた。[結果・考察] spermine 共存下での lambda DNA の制限酵素 ApaL I による切断を調べた結果、ある spermine 濃度を境に、DNA が急激に制限酵素の切断を受けにくくなることが分かった。蛍光顕微鏡法を用いて spermine 濃度に対する DNA 分子の広がりを調べたところ、制限酵素の切断を受けにくくなる spermine 濃度領域に対応して、DNA 分子は広がった状態からコンパクトな状態へと変化していることが分かった。次いで、制限酵素 ApaL I によって切断される配列を持つ、88 mer の相補的オリゴヌクレオチドを合成し、spermine 存在下で制限酵素による切断を行ったところ、短い DNA は高次構造変化を起こさないため、高濃度の spermine 存在下でも相補的オリゴヌクレオチドは切断された。以上の結果から、高次構造変化を起こし得る程度に十分長い DNA 分子は、DNA 分子の凝縮転移に対応して、DNA が急激に制限酵素の切断を受けにくくなることが明らかとなった。発表当日は、様々な濃度の spermine 溶液中での DNA 分子の高次構造を調べた AFM 観察の結果も用い、より詳細な議論を行う予定である。

H. Oana, K. Tsumoto, Y. Yoshikawa : Change of higher-order structure of DNA molecule inhibits the action of a restriction endonuclease

1M1545

核酸塩基対-アミノ酸側鎖間の相互作用自由エネルギーマップ: 隣接塩基対の効果

○吉田 智喜¹、相田 美砂子¹、Gromiha M. Michael²、皿井 明倫² (¹ 広大院・理、² 理研)

転写因子のような DNA 結合蛋白質は DNA 塩基配列を特異的に認識し複合体を形成することで遺伝子の発現と制御に対し重要な役割を果たしている。本研究では計算機シミュレーションを用いて、この特異的認識を明らかにしようとしている。今回、スタッキングした三塩基対とアミノ酸側鎖を相互作用の基本単位と考え、主溝における相互作用自由エネルギー ($\Delta \Delta G$)、相互作用エンタルピー ($\Delta \Delta H$)、相互作用エントロピー ($T \Delta \Delta S$)、相互作用エネルギーの最小値 ($\Delta \Delta E_{\min}$) を表す 4 種のマップを計算し、これまでに得られている一塩基対とアミノ酸側鎖間のものととの比較を行った。相互作用エネルギーの計算には力場 (ab initio potential: Aida et al 1992) を使用した。三塩基対を考慮に入れることにより、一塩基対だけでは表せない、側鎖が隣り合った二塩基対間に架橋するものも安定構造として見出された。

また、塩基配列によりマップの特徴に違いが見られた。さらに、これまでに得られている一塩基対と側鎖間のマップ、二塩基対と側鎖間のマップを組み合わせることにより、このスタ

$\Delta \Delta G$ map of stacking 3 base pair

キングした三塩基対と側鎖間の相互作用を表現できるかどうかについても検討した。

T. Yoshida, M. Aida, M. Michael Gromiha, S. Sarai : Free Energy Landscape of Base Pair-Amino Acid Side Chain Interaction: The Effect of Adjacent Base Pair

1M1615

Y 連結ブロックシャフリング (YLBS) 法による GFP 欠失変異体の作製

○北村 幸一郎¹、木下 保則¹、根本 直人²、西垣 功一¹ (¹ 埼玉大・工、² (株) ジェンコム)

自然におけるタンパク質分子進化において、ドメインシャフリングやモジュールシャフリングなどのメカニズムが寄与してきたという証拠が最近のゲノム研究から明らかになりつつある。同時に、生物のゲノムにおいて、高い頻度で組み換えが起こってきたことが示されつつある。既に我々はブロックを単位として組み換えを起こすこと (ブロックシャフリング) が高度なタンパク質進化に役立つはずだとの観点から、実験室的にこのことを実現する技術の開発に努め、YLBS 法を完成させた。(Prot. Eng. (2002))

YLBS 法では、用いるブロックのサイズ (モノマーからドメインサイズまで) によって階層の異なるシャッフル体ライブラリが実現可能である。とりわけ、エクソンやモジュールを単位とするもの、ドメインを単位とするものに興味もたれる。また、技術的応用として既存の遺伝子に対して欠失や挿入を導入したライブラリを作製することも容易である。今回はこの技術を利用して、GFP の発色団近傍領域 (全体の 1/10) を 3 アミノ酸単位の 8 つのブロックに分解し、そのうち 6 ブロックに関して欠失体を積極的に発生させるモードでシャッフル体形成を行った。

本学会ではこのようにして作製した GFP 欠失変異体がどのような機能や物性を持つかについて報告する。

K.Kitamura, Y.Kinoshita, N.Nemoto and K.Nishigaki : Deletant-containing library of fluorescent protein GFP generated by a block-shuffling method of YLBS.