201715

RecA フィラメントおよびDNA運動の可視化

○西中 太郎 (科技団 さきがけ)

大腸菌 RecA 蛋白質は相同組換えに必須の役割を果たす蛋白質である。RecA は単鎖 DNA に協同的に結合し、らせん状のフィラメントを形成する。この複合体は他の二重鎖 DNA との間で相同部位の探索を行い、対合させ、鎖を交換する反応を促進させる。RecA フィラメント、二重鎖 DNA は共に右巻らせん構造体であるから、この反応を進めるためには何らかの回転が必要である。一つの可能性として RecA が糸巻きのように DNA を巻き取っていく回転モーターであることが考えられる。RecA の行う諸反応を可視化するために、スライドガラス上に RecA フィラメントを固定した。固定したフィラメントは蛍光抗体染色法によって可視化することができた。ATP を含む溶液を流すことによって、フィラメントが ATP の加水分解とともに徐々に短くなっていく過程が観察できる。その後、抗 DNA 抗体で標識することによって、遊離してゆく DNA を可視化することができた。RecA フィラメントが短くなってゆく方向、および DNA が遊離して行く方向を決定することによって、RecA フィラメントおよび DNA のダイナミクスについての知見が得られた。この結果を説明する相同組換え反応の動作機構について議論したい。また、蛍光標識したマイクロビーズをフィラメントに結合させることによって、RecA フィラメントの DNA を回転させる分子モーター様活性の検出も試みているのであわせて紹介したい。

T. Nishinaka : Visualization of RecA filaments and DNA dynamics

2R1345

HIV-2 ヌクレオキャプシドタンパク質の構造-機能相関の解明

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

HIV のヌクレオキャプシドタンパク質 (NC) は 2 つの zinc finger (ZF) とそれを繋ぐ linker 領域から構成されている。NC はウイルス増殖に必要な不可欠なタンパク質であり、ウイルス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。

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出ていない。そこで、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。既に RNA を認識するための最小構造単位である 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 linker 領域が安定した構造を形成していて、その原因が ZF 内の 11 番目のアスパラギン (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]。これは、今まで他の NC では報告されていない事である。そこで、我々は NCp8 全長において、Asn11 の水素結合を見るために pH を変化させ 2D NOESY を測定した。その結果、NCp8-fl と同様な水素結合を持つ可能性を発見した。

現在、安定同位体標識した NCp8 を大腸菌を用いて調製している。発表では、NCp8 の linker 領域の構造の安定性と、NCp8 全長の構造情報について議論する。

[1] Y. Kodera, et al., Biochemistry, 37, 17704-17713, 1998.

T. Matsui, M. Nagai, H. Endoh, T. Kohno, H. Komatsu, K. Sato, Y. Kodera, T. Maeda : The structure - activity relationships of HIV-2 nucleocapsid protein

2R1330

大腸菌 DNA 修復タンパク質 Ada の N 末ドメインの構造と機能

○大久保 忠恭、瀧脇 浩人、松田 安弘、吉田 卓也、小林 祐次 (阪大院・薬)

大腸菌の DNA 修復タンパク質 Ada の N 末ドメイン (N-Ada16k) は、DNA 修復反応に伴う Cys69 のメチル化により、特定の DNA 配列 (*ada* 遺伝子のプロモーター領域及び *alk* A 遺伝子のプロモーター領域) に対する親和性が千倍以上大きくなり転写制御因子として作用する。このとき、Ada タンパク質は、*ada* 遺伝子に対しては負の転写制御を行い、*alk* A 遺伝子に対しては正の転写制御を行っている。このメカニズムを解明するために、N-Ada16k 及び転写制御活性を持つ Cys69 を選択的にメチル化した N-Ada16k (meC69 N-Ada16k) の立体構造を NMR を用いて解析した。

安定同位体ラベル及び多次元 NMR 法を用いて N-Ada16k 及び meC69 N-Ada16k のほとんどすべての NMR シグナルの帰属を行った。NOE を用いた立体構造計算の結果、両者とも 6 個の α ヘリックスと 4 本鎖よりなる β シートを持つこと、中央部にフレキシブルなループが存在して 2 ドメイン構造をとっていることが明らかとなった。C 末側の 4 本のヘリックスに転写制御因子に普遍的に存在する DNA 結合モチーフであるヘリックス-ターン-ヘリックス構造を見出した。さらに、*ada* 遺伝子及び *alk* A 遺伝子のプロモーター領域の 21mer 合成 DNA と meC69 N-Ada16k の複合体の HMQC スペクトルの比較を行い DNA 結合部位を特定した。それぞれのプロモーターに対して meC69 N-Ada16k の DNA 結合部位は基本的に共通であることが明らかとなった。以上の知見をもとに meC69 N-Ada16k の転写制御に対する機能スイッチ機構について検討を行い *ada*、*alk* A 遺伝子に対する転写調節機能の違いは、*ada*、*alk* A プロモーター上のコンセンサス配列の位置の違いを巧みに利用したものであると考えられた。

T. Ohkubo, H. Takinowaki, Y. Matsuda, T. Yoshida, Y. Kobayashi : Structure and function of N-terminal domain of *Escherichia coli* Ada protein

2R1400

常磁性効果を用いた完全酸化型 cytochrome c_3 の構造解析

○斉藤 貴士¹、堀 洋²、原田 英里砂¹、橘 良彦³、大村 孝幸⁴、阿久津 秀雄¹ (¹阪大蛋白研、²阪大基礎工、³横浜国大工、⁴三菱重工基礎研)

硫酸還元菌 *D. vulgaris* Miyazaki F 株の cytochrome c_3 は 108 残基、分子量約 14000 の電子伝達タンパク質で一分子中に 4 個の c 型ヘムを持ち、他の c 型ヘムに比べ非常に低い酸化還元電位を持つことを特徴としている。これまで x 線結晶構造解析により完全酸化型の結晶構造が報告されている。また NMR スペクトル測定による完全還元型の溶液構造が本研究室によって決定された。しかし完全酸化型ではヘム鉄から受ける常磁性効果のため NOE のみでの溶液構造の解析は困難である。そこで本研究では完全酸化型における溶液構造の解析に常磁性効果の一つである pseudo contact shift からとまる距離情報を利用する試みを行った。この pseudo contact shift は g テンソルと常磁性中心からの距離によって決まるので構造精密化に用いることができる。実際 pseudo contact shift の計算値と酸化型と還元型の化学シフトの差からもとまる測定値とを比較検討することでその有用性が確認された。NMR スペクトルにおける各 ^1H シグナルの化学シフトは TOCSY-HSQC、 ^1H - ^1H TOCSY、 ^1H - ^1H COSY スペクトル測定によりとめた。また NOE からの距離情報は NOESY-HSQC、 ^1H - ^1H NOESY スペクトル測定からシグナルの帰属を行って求めた。構造計算には pseudo contact shift を計算に組み込むことが可能な Dynamo ver.2 によって行った。その結果、NOE からの距離情報だけを用いて計算した構造に比べ、pseudo contact shift を組み込んで計算した構造では RMSD の改善がみられた。この酸化型の分子構造と還元型の分子構造の比較検討を行う。

T. Saitoh, H. Hori, E. Harada, Y. Tachibana, T. Ohmura, H. Akutsu : Structure refinement of fully oxidised cytochrome c_3 using of pseudo contact shift