2P097

一分子解析法を用いた RuvA-RuvB 蛋白質複合体の Holliday 構造 DNA 分岐点移動反応の直接観察

○韓 龍雲¹、谷 知己¹、林 真人¹、菱田 卓²、岩崎 博史³、品川 日出夫^{2,4}、原田 慶恵^{1,4} (¹都臨床研・生理活性物質、²阪大・微研、³横浜市大院・総合理学、⁴CREST・JST)

大腸菌 RuvA-RuvB 蛋白質複合体は相同組換え中間体である Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進する。RuvA は Holliday 構造特異的 DNA 結合蛋白質で、四量体を形成し Holliday 構造 DNA に結合する。RuvB は AAA⁺ ファミリーに属し、分岐点移動反応時に六量体リング構造を形成し、2つの RuvB 六量体リングが RuvA をサンドイッチするように挟み込んで、RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成する。分岐点移動は RuvB が ATP 加水分解反応によるアロステリックな構造変化を起こし、六量体リングの中央の穴から DNA を押し出すことで起こると考えられている。我々はより詳細な反応機構を明らかにするために、一分子計測法による RuvA-RuvB 蛋白質複合体の Holliday 構造 DNA の分岐点移動を直接観察することを試みた。RuvA-RuvB による分岐点移動に伴う DNA の回転を検出する系を構築した。まず十字型構造 DNA を作製し、その一方をスライドガラス基板に固定し、もう片側に磁気ビーズを付け、磁石で引っ張りあげた。そこに RuvA、RuvB 蛋白質を加え、RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成させ、エネルギー源である ATP を加え、ビーズの動きを観察した。これまでに、いくつかのビーズの回転観察例が得られた。本大会ではビーズの回転の詳細な解析から、RuvA-RuvB 蛋白質複合体による Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応機構について考察したい。

Y.-W.Han, T.Tani, M.Hayashi, T.Hishida, H.Iwasaki, H.Shinagawa, Y.Harada : Direct observation of the RuvA-RuvB mediated branch migration of Holliday junction DNA with single-molecule analysis

2P099

大腸菌 rRNA シュードウリジン化酵素 RluD と RluC の結晶構造解析

○水谷 健二、町田 佳隆、雲財 悟、朴 三用、Jeremy Tame (横浜市大院・総合理学)

シュードウリジンは RNA 中のウリジンが異性化されたものである。この修飾塩基はメチル化塩基と並んで、RNA 中に最も多く存在し、全ての生物種の RNA にみられる。tRNA、rRNA では機能的に重要な部位に位置していることが多いとされ、それらの修飾部位の多くは種を超えて保存されている。大腸菌では、rRNA 中のウリジンの異性化反応(シュードウリジン化)は、部位特異的な酵素群によりなされている。近年、この修飾を担うとされる 11 の遺伝子が特定されたことにより、活発な研究がなされている。しかしながら、シュードウリジン自体の機能、存在意義については、はっきりとした見解が得られていない。E. coli RluC、RluD は共に RluA ファミリーに属する酵素であり、23S rRNA 上の特定の部位のウリジン (RluC: U955, U2504, U2580 の 3 箇所、RluD: U1911, U1915, U1917 の 3 箇所) の異性化を担っている。これら 2 つの酵素は N 末の RNA 結合ドメイン (S4 ドメイン) と C 末の活性ドメインからなっている。RluC 欠損株が、特別な表現型を持たないのに対して、RluD 欠損株では顕著な生育阻害がみられることが知られている。当研究では RluC の活性ドメインと、全長 RluD の結晶構造を決定した。RluD の N 末の S4 ドメインは、電子密度を確認することはできなかった。これは、S4 ドメインと活性ドメインをつなぐ領域が、フレキシブルな構造であるためと考えられる。この S4 ドメインのフレキシビリティは、基質認識の特異性のために重要な働きがあると予想される。RluC、RluD の活性ドメインの構造は、トポロジーが非常に良く保存されているにも関わらず、表面電荷分布は全く異なるものであった。2 つの酵素のこのような構造的特徴は、シュードウリジン化酵素と基質 RNA との結合様式が、それぞれの酵素間で異なることを示唆している。

K.Mizutani, Y.Machida, S.Unzai, S.-Y.Park, and J.R.H.Tame : Crystal Structures of the Catalytic Domains of Pseudouridine Synthases RluC and RluD from Escherichia coli

2P098

相同組換えタンパク質 RecA により引き起こされる拡散運動

○木村 祐史¹、杵渕 隆²、加畑 博幸³、胡桃坂 仁志⁴、鷲津 正夫¹ (¹東大院・工・機械、²理研・GSC、³京大院・医・HMRO・ANGEL、⁴早大・理工・電生)

RecA タンパク質は相同組換えにおいて重要な役割を果たすタンパク質であり、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA が相同配列を持った領域で対合する反応を触媒する。この反応において RecA はまず一本鎖 DNA の周りにらせん状に重合する。次に、この一本鎖 DNA/RecA 複合体は二本鎖 DNA と相互作用し、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA から相同性を検索するが、いかにして相同領域を検索するかは分かっていない。今回、図 1 に示されるような片端に一本鎖領域を持つ二本鎖 DNA (DNA プローブ) を作成し、DNA プローブの二本鎖領域を蛍光染色することで RecA による相同領域検索過程を可視化した。すると、一部の DNA プローブは、静電伸長固定した二本鎖 DNA 上に拡散するように運動する様子が観察された。また、伸長固定 DNA 上で運動している DNA プローブの割合、つまり、伸長固定 DNA に結合していた DNA プローブに対する運動していた DNA プローブの割合は RecA が溶液中に存在することにより、1.6% から 62% に増加した。本年会では、DNA プローブの拡散様の運動を定量的に解析し、その運動様式を報告するとともに、RecA により引き起こされる DNA の運動が相同領域検索に果たす役割について議論する。

図1 “DNAプローブ”を用いた相同領域検索過程の可視化

本研究は生研機構新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術の開発」の助成を受け行われたものです。ここに謝意を表します。

Y. Kimura, T. Kinebuchi, H. Kabata, H. Kurumizaka, M. Washizu : Diffusional motion along DNA molecules induced by RecA protein.

2P100

FFRP 蛋白質の構造と機能 2. X線結晶法によるリガンドとの相互作用の解析

○小池 英明¹、石島 早苗^{1,2}、佐久間 道代¹、皆広 潔美^{1,2}、鈴木 理¹ (¹産総研・脳神経情報・DNA 情報、²科学技術振興機構)

FFRP は、環境の変化を伝達する様々なリガンドにตอบสนองして転写する遺伝子を選択し直す。様々な細菌 (病原菌を含む) の代謝、増殖から感染能までも制御する。FFRP は約 160 アミノ酸残基から構成され、N 端側半分が DNA 結合ドメインを形成し、C 端側半分が会合ドメインを形成する。今回 C ドメイン二量体 4 つの会合体に相当する、FFRP (DM1) の結晶構造を決定した。意外にも、この会合体中には大腸菌細胞に存在する天然のリガンドが結合し複合体となっていた。DM1 の単結晶および重原子誘導体 2 個を得て同型置換法を用い、分解能 1.8 Å、R 因子 20% の高分解能 X 線結晶構造を決定した。結晶中 DM1 二量体を単位として、二量体 4 つが八量体を形成していた。その中央には約 10 Å の穴があり、二量体同士の会合部の隙間 4 つと十字の空間を形成し、各隙間にはアミノ酸程度の大きさのリガンド 2 個が入り込める空間がある。疎水性アミノ酸数種や TCA 回路の代謝中間体等の添加により DM1 の会合状態が変化することを、ゲルろ過、光散乱等の手法により明らかにした。これらのデータに照らして決定した立体構造を解析した結果、二量体同士の会合部位に発現時に大腸菌細胞から取り込まれたと考えられる未知リガンド (アミノ酸程度の大きさ) が結合していた。しかし、8 つの等価な部位のうち 2 個しか結合しておらず、この結果本来の 4 回対称は歪んでいた。このようにリガンドの結合が DM1 の会合状態を変化させることから、環境変化にตอบสนองして FFRP の特定の会合様式が選択され、この結果環境適応的な転写調節が生まれることになる。緑膿菌のように 8 種類もの FFRP を持つ病原菌があり、FFRP の会合を制御する低分子性化合物を基にして、これら病原菌の増殖を制御する薬剤の開発が可能になると考えられる。

H. Koike, S. A. Ishijima, M. Sakuma, K. Minahiro and M. Suzuki : Structure and function of feast/famine regulatory proteins: 2. Interaction of DM1 with ligands studied using a crystal structure.