1P121

複雑なアルギニン-リッチ・ライブラリーからの HIV RRE-結合ペプチドの選択

○菅谷 麻希^{1,3}、西野 憲和²、加藤 明良³、原田 和雄¹ (¹ 東学大・教・生命、² 九工大・生命、³ 成蹊大・工・応化)

HIV Rev peptide-RRE RNA complex has been a useful model for elucidating general rules of RNA-protein interaction. Previous selection of RRE-binding peptides from an arginine-rich peptide library ARPL1, which consists of a polyarginine (15mer) randomized at 10 positions, resulted in the selection of peptides that bound more strongly than the Rev peptide and a selected peptide, RSG-1.2 (Peled-Zehavi et al., 2003). The selected ARPL1 peptides contained a glutamine that was assumed to be important for binding, and was predicted to bind to the RRE in an α -helical conformation.

In this study, to identify peptides that bind more strongly to the RRE, and to identify peptides that bind to the RRE in a different manner, we designed ARPL2, which was randomized at 15 positions instead of 10 positions in ARPL1, and ARPL3, where the library region of ARPL2 was flanked by glycines, respectively. Selection of RRE-binding peptides from ARPL2 and ARPL3 resulted in RRE-binders similar to these selected from ARPL1, but showing higher RRE-binding affinities. Upon alignment of RRE-binding peptides obtained from ARPL1-3, specific amino acids were observed frequently at certain positions. The role of these flanking non-arginine residues in the binding of the peptides with the RRE will be discussed.

M.Sugaya, N.Nishino, A.Katoh and K.Harada : Selection of HIV RRE-binding peptides from complex arginine-rich libraries

1P123

Unexpected cleavage occurred in modified sigma70 subunit of active E. coli RNA polymerase

○RajanBabu Suganthan^{1,2}、佐藤 由美子³、八木 祥次³、Gyedu Ampaabeng³、嶋本 伸雄^{1,2} (¹ 総合研究大・生命科学、² 国立遺伝研・構造遺伝学研究室、³)

Bacterial RNA polymerase requires a sigma subunit to initiate transcription from promoters. In *E. coli*, the sigma70 subunit ($\sigma 70$) is responsible for vegetative transcription and have four regions, 1-4, which is also conserved in other *E. coli* sigmas and the vegetative sigmas of other bacterial species. These domains are essential for binding to core polymerase and promoters and necessary to form the bubbled duplex DNA. These regions distribute widely and thus a deletion of significant part conventionally kills the function of RNA polymerase. We have constructed an *E. coli* strain that has no *rpoD* encoding $\sigma 70$ in chromosome but has a plasmid harboring *gfp* fused *rpoD* gene, which complements the deleted *rpoD*. We observed that a GFP fused sigma70 subunit is generally getting cleaved in vivo. When *gfp* is inserted in Region 1, the approximate sizes of the cleaved fragments are 70kD, 21kD and 11kD, which are bound to the purified RNAP holoenzyme. Although at least one essential region seems to be missing, the purified enzyme with cleaved sigma70 fusion protein is active on T7A1 promoter DNA. We are interested in identifying the cleaved positions by N-terminal peptide sequencing and MALDI-TOF MS of the fragments to identify the missing Regions. The identification will reassign the function of the Region 1-4 and will provide a new insight to the mechanism of transcription initiation.

R. Suganthan, Y.Sato, S. Yagi, G. Ampaabeng and N. Shimamoto : Unexpected cleavage occurred in modified sigma70 subunit of active E. coli RNA polymerase

1P122

DNAのUV損傷による転写のスイッチ

○宮本 貴史¹、須佐 大樹³、嶋本 伸雄^{1,2} (¹ 総合研究大・生命科学、² 国立遺伝研・構造遺伝、³ 北大・知的財産)

DNAがUV損傷を受けたときに遺伝子の保存、mRNAの品質維持のために、転写を止めるスイッチが存在している。従来、UV損傷部位でRNAポリメラーゼはRNA伸長を止めて、修復装置を呼び込む機構が知られているが、最も大きな調節のダイナミクスレンジを持つ転写開始については、見つかっていなかった。大腸菌の系において、我々は、転写開始の停止が、我々が一般的な調節機構として発見した、転写開始の分岐機構により行われている証拠を見いだした。転写開始の分岐機構とは、正常な転写を行う活性型の経路と、moribund complexと呼ばれる複合体を形成し、abortive synthesisのみを行う不活性型の経路とに反応経路が分岐することである(図)。我々は、プロモーター領域にUV照射によるDNA損傷が生じると、転写開始が経路が不活性型に切り替わることを発見した。本来、ほとんど moribund complexを形成しないT7A1プロモーターを用いて、プロモーターのどこにUVによるDNA損傷が起こると moribund complexが形成されるのか、そしてどのようなメカニズムでその損傷が修復されるかを研究している。

T. Miyamoto, M. Susa, N. Shimamoto : The switch of transcription initiation regulated by UV-damaged DNA

1P124

HNF-6 α と DNA 複合体の結晶構造解析

○居弥口 大介¹、姚 関¹、渡邊 信久¹、西平 順²、田中 敷¹ (¹ 北大院・理・生物科学、² ジェネティクスラボ)

栄養素や薬物の代謝など多様な生理機能を有する肝臓は、その機能発現のために非常に高度に分化した組織である。肝臓組織の発生や分化は肝臓細胞に特異的な転写調節機構により制御されており、Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) などのような肝臓特異的転写因子群により厳密に調節されている。HNF-6 タンパク質はこのような転写因子群のひとつであり、その機能は肝細胞の発生や分化、増殖などの調節のほか、代謝に関連する多様な遺伝子の転写調節機能を有している。HNF-6 の DNA 結合領域は CUT ドメインとホメオドメインという二つの DNA 結合ドメインから成っており、ONECUT ホメオドメインと呼ばれる。このタンパク質は結合する DNA 配列の種類によって、転写活性化に必要なコアクチベーターの種類、あるいは転写活性化及び DNA との結合に関与するドメインを変化させ、多様なタンパク質-タンパク質間相互作用、タンパク質-DNA 間相互作用を行う。また、このタンパク質には DNA 結合ドメインを結ぶリンカー部分が異なる二つのアイソフォームが存在し、リンカーの長さを変化させることによっても DNA の認識配列を変化させることができる。このように、HNF-6 タンパク質は極めて特徴的な、新規性の高い DNA 認識特性を有する転写制御因子であることから、このタンパク質と認識 DNA との複合体の構造解析により、代謝に関わる創薬への応用のみならず、非常に特徴のある、多様な DNA 認識を可能にする新規のメカニズムを原子レベルで解明することができる。本研究では、ラット由来 HNF-6 α と、トランスサイレチンのプロモーター領域にある 14 塩基対の認識 DNA との複合体の結晶構造を 2.0 Å 分解能で決定し、CUT ドメインと特徴的なホメオドメインが協調する、新規の DNA 認識機構を解明した。

D.Iyaguchi, M.Yao, N.Watanabe, J.nishihira and I.Tanaka : Crystal structure of hepatocyte nuclear factor 6alpha complexed with DNA