2P053

カイコ由来 FMBP-1 の DNA 結合ドメイン STPR を構成する各ユニットの立体構造、およびヒト由来 STPR を構成するユニットとの比較

○齊藤 伸¹、八巻 健¹、川口 恭輔¹、松本 大祐¹、山本 宏子¹、上島 達郎¹、相沢 智康¹、滝谷 重治²、出村 誠¹、新田 勝利¹、河野 敬一¹ (¹ 北大・院理・生物科学、² 北大・創成研)

FMBP-1 (Fibroin-modulator-binding protein-1) は、フィブロイン (H 絹) 遺伝子の上流およびイントロン内の転写制御エレメントに結合する因子として、カイコ *Bombyx mori* の 5 齢後部絹糸腺から見出された。これまでの研究から、FMBP-1 は 218 アミノ酸残基からなる分子量 25kDa のタンパク質として発現し、フィブロイン遺伝子の転写制御因子として機能している可能性が示唆されている。FMBP-1 の C 末端側には、極めて相同性の高い 23 アミノ酸残基の 4 回繰り返し (R1,R2,R3,R4) 領域が存在し、この部位が DNA 結合ドメインとして機能する。興味深いことにこのような 23 アミノ酸残基からなる繰り返し配列 (STPR: Score and three amino acid peptide repeats) は、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトにおいて高度に保存されているが、各種間での特徴は異なる。例えば、ヒトやマウスではカイコと同様、23 アミノ酸残基の 4 回繰り返し配列が STPR を構成するのに対し、線虫では 7 回繰り返し、ショウジョウバエでは 6 回繰り返し配列が STPR を構成する。また STPR を構成する 23 アミノ酸の一次配列を比較すると、各々の種では各ユニット同士の保存性が非常に高いにもかかわらず、種間においては N 末端側半分領域のみが高度な保存性を示す。本研究ではカイコ由来 STPR について、これを構成する繰り返しペプチド (R1-R4) の立体構造を CD 測定、および NMR 法により解析した。また、ヒト STPR を構成する繰り返しペプチドについても CD 測定を行い、立体構造に関する解析を行った。当日はカイコおよびヒト由来の繰り返しペプチドについて比較を行い、DNA 結合に伴う立体構造変化についてもディスカッションを行う予定である。

S.Saito, T.Yamaki, K.Kawaguchi, D.Matsumoto, H.Yamamoto, T.Kamijima, T.Aizawa, S.Takiya, M.Demura, K.Nitta and K.Kawano : The structure of repeat units composed of STPR from silkworm and comparison of the repeat units from silkworm and human

2P055

Crystal structure of a putative transcription repressor from *C.glutamicum*

○高 永貴¹、姚 関¹、伊藤 啓²、田中 勲¹ (¹ 北大院理、² 遺伝研)

Since the helix-turn-helix GntR family was first described in 1991, it has been proved that this family comprises about 270 members distributed among diverse bacterial groups. The family members are mainly transcription factors that regulate various biological processes. In general, these proteins consist of two domains, N and C-terminal domain. While the N-domains are well conserved in structures of the GntR family, the C-terminal domains are more variable and are consequently used to define the subfamilies, such as FadR, HutC, MocR, YtrA, AraR and PlmA.

We have recently determined the crystal structure of a putative transcription repressor from *C.glutamicum*, which was assigned to belong to GntR family. The structure was solved at 2.05 Å resolution using multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) method. The structure reveals a dimer, and each monomer was divided into two domains, N and C-terminal domain. The N-terminal domain, a typical DNA recognition motif consists of a winged helix-turn-helix fold. The C-terminal domain consisting of a seven-helical bundle exerts the role of dimerization. Comparison with known structures showed that the structure is similar to FadR, a dimeric acyl coenzyme A (acyl CoA)-binding protein which regulates fatty acid biosynthesis and genes (fad) degradation.

Y.-G. Gao, M. Yao, H. Ito and I. Tanaka : Crystal structure of a putative transcription repressor from *C.glutamicum*

2P054

新規 DNA 結合ドメイン (STPR) とそのタンデムリピートユニットの構造・機能相関

○松本 大祐¹、八巻 健¹、齊藤 伸¹、川口 恭輔¹、山本 宏子¹、上島 達郎¹、相沢 智康¹、滝谷 重治²、出村 誠¹、新田 勝利¹、河野 敬一¹ (¹ 北大院・理・生物科学、² 北大・創成研)

FMBP-1 (Fibroin modulator binding protein-1) は、カイコの後部絹糸腺で時期・組織特異的に発現し、フィブロイン H 遺伝子の上流やイントロン内エレメントに結合する新規の転写因子である。FMBP-1 (218a.a.) は、C 末端側約半分に DNA 結合ドメイン (92a.a.) を持ち、極めて特徴的で相同性の高い 23 残基がタンデムに 4 回繰り返し配列 (score and three amino acid peptide repeat; STPR) で構成されている。このような特徴的なタンデムリピート配列はヒトやショウジョウバエなどの生物種にも高度に保存されているが、その構造・機能は未だ明らかになっておらず、新規の DNA 結合モチーフと考えられる。本研究では、FMBP-1 の DNA 結合ドメインである STPR や各種変異体の大腸菌による大量発現系の構築に成功し、固相合成法により調整したタンデムリピートユニットとの構造及び機能的な特性を比較した。CD 測定より、STPR とそれを構成する 4 つのタンデムリピートユニットはヘリックス構造を持ち、STPR は dsDNA の添加により、ダイナミックな構造変化が誘起される事が明らかとなった。個々のタンデムリピートでは、このような構造変化が見られない事から、4 つのユニットが連結した状態でのみ dsDNA と結合し、構造的な変化が起こる事が示唆された。また、STPR 内の各タンデムリピートの 1 残基目の Glu を Gln に置換した変異体を用いた EMSA の結果より、DNA 結合に関して各ユニットが果たす役割に明確な差異が存在する事も明らかとなった。当日は、一連の実験から得られた DNA と STPR 並びに各種変異体の結合能について比較する予定である。

D.Matsumoto, T.Yamaki, S.Saito, K.Kawaguchi, H.Yamamoto, T.Kamijima, T.Aizawa, S.Takiya, M.Demura, K.Nitta, K.Kawano : The structure-function relationship between a novel DNA binding domain (STPR) and its tandem repeat unit

2P056

Aspergillus terreus 由来プラストサイジン S デアミナーゼのコバルト置換体の分光学的性質

○野坂 麻美¹、樋口 貴之¹、古市 真木雄²、高妻 孝光¹ (¹ 茨城大院・応用粒子線、² NEC ソフト・VALWAY テクノロジーセンター)

ピリジヌクレオチド代謝に関与するシチジンデアミナーゼスーパーファミリーの 1 つ、プラストサイジン S デアミナーゼ (BSD) は、イネいもち病に対する抗生物質であるプラストサイジン S (BS) のシトシンをウラシルへと脱アミノ化する酵素である。*Aspergillus terreus* 由来の BSD は単量体 13 kDa あたり、1 個の亜鉛原子を有し、ホモ 4 量体からなる酵素である。活性中心に存在する亜鉛原子には 3 つのシステイン S 原子と 1 つの水分子が配位している。また基質によって構造が変化する短い領域を C 末端 (126-130) に有している。Tyr 126 を Phe に置換した Y126F 変異体と Gly 130 以下を削った Δ 130 変異体においては、酵素活性に関わる K_m 、 k_{cat} 値に大きく変化が見られることが報告されている [1]。

本研究では、BSD の構造と機能との相関を検討するため、野生型と 2 つの変異体の亜鉛を除去したアポ酵素とコバルトに置換した酵素の作製を試み、分光学的性質を検討した。Zn-Δ 130 BSD に対しキレート剤として 2,6-pyridinedicarboxylic acid と EDTA を用い透析を行ったところ、99 % 以上の Zn を除去することができた。得られた apo-Δ 130 BSD に Co^{2+} を添加したところ、紫外可視吸収スペクトルにおいて、活性中心に存在する 3 つのシステインの S^- から Co^{2+} への電荷移動吸収帯 ($\lambda = 410, 497\text{nm}$) が認められ、コバルト置換型 BSD の生成を確認した。本発表では共鳴ラマンスペクトルの結果についても併せて報告する。

1. Kimura, M., Furuichi, M., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Mizuno, H., Miyano, M., and Yamaguchi, I. (2002) *Biochem Biophys Res Commun.* 290, 421-426.

M.Nosaka, T.Higuchi, M.Furuichi and T.Kohzuma : Spectroscopic Studies on the Cobalt-Substituted Blasticidin S deaminase from *Aspergillus terreus*