

1R12

DNA-RNAポリメラーゼ相互作用の1分子イメージング

○原田慶恵¹、船津高志¹、柳田敏雄^{1,2,3}¹ERATO, JST, ²阪大・医、³阪大・基礎工

我々が開発した1分子イメージング顕微鏡に、光ピンセットを組み込んだシステムを用いて、RNAポリメラーゼ分子が1本のDNAと相互作用する様子を長時間観察した。両端をピオチン化したλ phageDNAをストレプトアビジンコートビーズを介して光ピンセットで捕捉、操作しエバネセット領域で伸展させる。溶液中に蛍光色素Cy3で標識した大腸菌RNAポリメラーゼを加え、DNAに結合する様子を観察した。RNAポリメラーゼが結合する位置、結合時間について解析をおこなった。その結果、RNAポリメラーゼのλ DNAへの結合は一樣ではなかった。λ DNAの配列と比較した結果、A/Tリッチな領域に結合しやすいことがわかった。結合時間のヒストグラムから解離定数を求めた結果、結合時間が短い(τ=0.4秒)ものと、比較的長い時間(τ=1.6秒)のものがあった。RNAポリメラーゼが長い時間結合する場所は、λ DNA上に数カ所あった。DNAの配列を調べた結果それらの場所と、大腸菌RNAポリメラーゼが認識するλ phageDNAのプロモーターの位置および、プロモーター配列である-35領域とプリブナウ配列に類似した配列の位置とそれらがほぼ一致した。また、DNAを伸展させた直後は多数のポリメラーゼが結合しているが、時間とともにその数が減っていく様子が観察された。このことはDNAが自由に曲がれる状態の方がポリメラーゼが結合しやすいことを示唆している。さらに、頻度は少ないが、RNAポリメラーゼがDNAに沿って1次元に拡散する様子も観察された。以上のようにRNAポリメラーゼが転写を開始するための第一段階であるDNAへの結合とプロモーター位置のサーチのメカニズムについて、1分子レベルで解析することが可能になった今後は、転写調節および、転写中のポリメラーゼのナノメーターの動きなどを長時間観察する予定である。

Y. Harada, T. Funatsu, T. Yanagida: Single molecule imaging of RNA polymerase-DNA interaction

1R14

原がん遺伝子産物c-MybとDNAとの複合体の動的構造

○佐々木元子¹、緒方一博^{2,3}、島中秀樹⁴、中村春木⁵、皿井明倫⁶、石井俊輔⁷、西村善文¹ ¹横浜市大・大学院総合理、²横浜市大・医、³KAST、⁴都臨床研、⁵BERI、⁶理研・筑波LS

c-Mybタンパク質はDNAに配列特異的に結合する転写調節因子で、造血系細胞の未分化状態の維持に関与している。そのDNA結合領域は3つのリピート(R1, R2, R3)からなっており、DNAの特異的認識にはR2とR3の両方が必須である。各々のリピートはヘリックス・ターン・ヘリックス変異体構造をもつ類似した立体構造をとっている。しかし熱力学的にはR2領域がR1, R3領域に比べて不安定で、NMRの緩和データから構造変換を伴う揺らぎの存在を示している。この揺らぎは、R2領域の構造変化がDNAとの複合体形成に必要であることを示唆した。特に、R2領域の疎水性コアにはキャビティが存在し、DNAとの複合体では、このキャビティを埋めるようにトリプトファン側の側鎖が変位していた¹⁾。

そこで今回、¹⁵NラベルしたR2R3とDNAとの複合体でT₁, T₂, T_{1ρ}, NOEの測定を行った。その結果、単体では個々のリピートをつないでいるループ部分に速い揺らぎが見られたが、複合体を形成するとこのループはDNAのリン酸骨格と結合し、速い揺らぎが抑えられていた。また、マイクロ秒からミリ秒程度の比較的遅い揺らぎに関しては、単体のR2ではリピート全体にわたって認められたが、複合体ではR2の揺らぎが減少し、R2とR3の間の明らかな差はなくなっていた。このことから、タンパク質とDNAの塩橋や水素結合による構造の安定化に加え、R2の疎水性コアのバックキングがより密になることによる構造の安定化が反映されていると考えられることができる。

現在、データの精密化のため、立体構造解析に用いたDNAより3塩基対短い13mer DNAとの複合体で緩和時間測定を行い、モデル・フリー解析を試みている。

1) Ogata, K. et al., *Nature struct. biol.* 3, 178-187 (1996).

M.Sasaki, K.Ogata, H.Hatanaka, H.Nakamura, A.Sarai, S.Ishii, Y.Nishimura: Backbone dynamics of Myb-DNA complex

1R13

高度好熱菌アルギニル tRNA 合成酵素の結晶化

○嶋田睦¹、瀧木理¹、今野美智子¹、横山茂之^{1,3}¹東大・院理、²お茶の水大・理・化、³理研・細胞情報伝達

アミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)は、tRNAのアミノアシル化反応を触媒する酵素群であり、1つ1つのアミノ酸に対応して20種類存在する。aaRSは、(1)アミノ酸の活性化、(2)tRNAのアミノアシル化、の2段階のステップを経てtRNAのアミノアシル化反応を行うが、アルギニル tRNA 合成酵素(ArgRS)は、グルタミル tRNA 合成酵素(GluRS)、グルタミル tRNA 合成酵素(GlnRS)と共に、tRNAが結合して始めて基質となるアミノ酸を活性化するという特徴を持っている。これらの3種類のaaRSのいずれについても、酵素単独とtRNAとの複合体の両方が解析された例はなく、このtRNAによるアミノ酸の活性化のメカニズムは明らかになっていない。われわれはArgRS単独及びアルギニンtRNAとの複合体の構造をX線結晶構造解析によって原子分解能レベルで解明し、比較することで、このメカニズムを解明しようと考えている。われわれは、これまでに熱安定で結晶化に有利な高度好熱菌のArgRSを大腸菌を用いて大量発現することに成功し、この組換え酵素を用いて結晶化の試みを行ってきた。ArgRS単独では、pH8.0付近で、硫酸、硫酸リチウム、酒石酸ナトリウムカリウムなどの塩を沈殿剤として、六方晶系に属する結晶(a=b=207 Å, c=97 Å)を再現性良く得ることに成功している。この結晶はサイズが最大で0.5mm × 0.5mm × 0.5mmに達し、実験室レベルの回折装置を用いた測定で3.0 Å分解能程度の反射を与えることが分かったが、回折強度が弱いことや、モザイク性が高いことなどの問題があるため、結晶化条件や、測定条件の最適化を現在行っている。また、pH4.6付近でも、蟻酸ナトリウムやPEGを沈殿剤として針状晶や板状晶が得られており、この最適化も行っている。ArgRSとアルギニンtRNAとの複合体については、高度好熱菌ArgRSによってアミノアシル化されることが確認された大腸菌のアルギニンtRNAのT7RNAポリメラーゼによる転写産物を用いて結晶化を行っている。

A.Shimada, O.Nureki, M.Konno, S.yokoyama: Crystallization of the arginyl-tRNA synthetase from *thermus thermophilus*

1R15

HMG1の2つのHMG-Boxを結ぶリンカー領域の役割

○斉藤謙平、白川仁、吉田充輝

東京理科大・基礎工・生物工

DNA結合モチーフであるHMG1/2-Boxを有するタンパク質のDNA認識は、塩基配列特異的にDNAに結合するSRYやLEF-1では1個のBoxで行われ、塩基配列特異性を示さないUBFなどでは複数個のBoxによる。高等真核生物細胞核に普遍的に存在するHMG1タンパク質には、HMG1/2-Boxが2つ(Box A, Box B)存在し、これらは約10アミノ酸残基からなるリンカー領域によりつながれている。これまでの解析により単独のBoxに比べて両Boxが連なった場合にDNAへの結合力が約20倍になることから、リンカー領域の重要性が示唆される。本研究では、このリンカー領域の長さ、およびリンカー領域に存在する塩基性クラスターのアミノ酸配列を置換することによりDNAに対する結合力への影響を解析した。

2つのBoxを含むDNA結合領域(1-164番アミノ酸残基)のみからなるペプチドにおいて、リンカー領域の長さが最大で6アミノ酸残基欠失した各種変異体、および塩基性クラスターをアラニンに置換した変異体を作成した。これら変異体についてIII型プラスミドDNAとの複合体をゲルシフトアッセイにより解析した結果、リンカー領域が短くなるのに伴いバンドシフトの程度が減少した。また、68bp DNAを用いたゲルシフトアッセイの結果、リンカー領域の長さを短くした変異体での結合性の低下が見られ、さらにアラニンに置換した変異体でも同様の結果であった。この結果から、塩基性クラスターをもつリンカー領域が両Box相互の配向を規定しており、またDNAとの直接相互作用にも関与していることが示唆された。

K. Saito, H. Shirakawa, M. Yoshida: Functional importance of the linker sequence between two HMG-Boxes of HMG1 protein for its DNA-binding