

学 位 論 文 題 名

NMR Study of DNA Binding Protein HU

(DNA 蛋白質 HU NMR による研究)

学位論文内容の要旨

HUは原核生物に広く存在し、DNAの様々な反応を助ける働きをしている蛋白質である。HUは分子サイズ(分子量9500)、塩基性の等電点、構成アミノ酸にリシンとアラニンが多いこと、DNAに超螺旋を形成させることの点で、真核生物のヒストン蛋白質と似ていることから、原核生物におけるヒストン様蛋白質と考えられている。X線結晶構造解析の結果が報告されており、HUはホモダイマーで存在し、くさび型のボディー部分と、そこから伸びた β -strandからなる2本のアーム部分で構成されている。これまでの研究から、HUはDNAの塩基配列に非特異的に結合することと、アーム部分でDNAを結合することが示唆されている。本学位論文は、DNA結合蛋白質HUとDNAの相互作用を核磁気共鳴法(NMR)を用いて研究した結果について記述したものである。1章では、これまでのHUの生物学的、物理化学的な研究を概観している。

2章では、HUのNMRスペクトルの解析について述べる。HUの ^1H -NMRスペクトルを温度を変えて測定することにより、HUは70℃で変性することを見いだした。ここで得られた変性温度70℃は、すでに報告されているCD測定から得られた値とほぼ一致している。スペクトルは70℃付近でほぼ全てのピークが一斉に変化した。このことは、HUの熱変性が分子全体で一斉におこることを意味している。pHを変えて ^1H -NMR測定を行った。pH=5.7~10.0において、ほとんど変化が見られなかった。HUがpHに対して安定であることがわかる。化学合成されたHUが、天然のHUと同じ立体構造をとっていることを ^1H -NMR測定により確かめた。このことは、HUの立体構造が、完全に1次構造の情報のみで決まることを示している。また化学合成により位置特異的に ^{13}C 、 ^{15}N 、DでラベルしたHUを、 ^{13}C -、 ^{15}N -、D-NMRにより実際に位置特異的にラベルされていることを確かめた。ラベルされている部分は等価であることがわかった。HUダイマー内のモノマー分

子同士は、同じ構造をしていることを示唆している。

3章では、HUのアーム部分とボディー部分の運動性を ^{13}C -NMRにより調べた。

ボディーの疎水性コア内にあるPhe47C α とアームの先端部分にあるGly60C α を位置特異的に ^{13}C にラベルしたHUを使用した。この2つの部位の相関時間 τ_c を緩和時間 T_1 から求め、HU単独の時と、HU-DNA複合体で比較した。二重鎖DNAとして(d-GGAAATTTCC) $_2$ を用いた。 T_1 測定は5℃から48℃までの5点の温度で行った。DNA存在下、非存在下にかかわらず、Phe47C α の τ_c の値は、Gly60C α よりも2~4倍大きいことがわかった。このことは、Gly60C α が、Phe47C α よりも速い運動をしていることを示している。DNAを加えることによる相関時間の増加量は、Phe47C α で平均20%、Gly60C α で平均40%で、Gly60C α の方が大きい。すなわち、DNAを加えるとPhe47C α の運動よりもGly60C α により大きな影響が現れることを示している。Gly60C α の活性化エネルギーの値は、DNAが結合していない状態で $6 \pm 3 \text{ kJ/mol}$ であるのに対して、DNAを結合すると、 $12 \pm 4 \text{ kJ/mol}$ になり、約2倍に増加した。一方、Phe47C α では $16 \pm 4 \text{ kJ/mol}$ が $14 \pm 3 \text{ kJ/mol}$ となり、ほとんど変化しない。したがって、アーム内のGly60C α はボディー内のPhe47C α よりもより運動性が高い。X線結晶構造解析の結果では、アームの先端部分の構造が見えない。X線結晶構造解析において、構造の見えない部分は一定の構造を取っていないことによると考察されているが、本研究の結果は、アーム部分の運動性が高く、構造がゆらいでいることを示している。又、Gly60C α の運動性はDNA結合によって減少することがわかった。HUのDNA結合蛋白質としての機能は、アーム部分の高い運動性に関係しているものと考えられる。

4章では、合成した二重鎖DNAとHUとの間の相互作用を ^{31}P と ^1H -NMRにより調べた。2重鎖DNAとして8ベースペアの(d-G(1)G(2)A(3)A(4)T(5)T(6)C(7)C(8)) $_2$ と20ベースペアの(d-G(1)G(2)G(3)A(4)A(5)A(6)A(7)A(8)G(9)G(10)C(11)C(12)T(13)T(14)T(15)-T(16)T(17)C(18)C(19)C(20)) $_2$ を用いた。8ベースペアDNAの ^{31}P -NMRスペクトルを色々な濃度のHUの存在下で観測した。8ベースペアDNAと20ベースペアDNAの ^1H -NMRスペクトルを色々な濃度のHUの存在下で観測した。

HUを加えると、全ての ^{31}P のケミカルシフトが変化する。C(7)pC(8)のピークのみ低磁場シフトして、他のピークは、高磁場シフトすることがわかった。HUはDNAの塩基配列に非特異的に結合することから、DNAのリン酸部分に静電的に結合すると考えられ

ている。静電相互作用は、 ^{31}P の共鳴を高磁場にシフトさせることが報告されている。これらのことを考慮すると、C(7)pC(8)の低磁場シフトは構造変化によるものと考えられ、HUがDNAの構造をC(7)～C(8)領域で変化させることを示唆している。

8ベースペアDNAでは、大きなシフトがC(7)とC(8)ベースプロトンとG(2)イミノプロトンに観測された。20ベースペアDNAでは、T(13)、T(14)、T(15)イミノプロトンにシフトが観測された。これらのシフト変化は、 ^{31}P と同様、HUの塩基配列非特異的結合性から考えて、DNAの構造変化によるものと考えられる。

DNAが二重鎖をとっていることを考えると、DNAの構造変化は連続した4ヌクレオチドの両側にある2、3個のヌクレオチドでおこる。この変化は、HUと類似の蛋白質に共通の性質であるDNAを曲げることに関係していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 引 地 邦 男

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 田 中 勲

学 位 論 文 題 名

NMR Study of DNA Binding Protein HU

(DNA 蛋白質 HU NMR による研究)

HUは原核生物に広く存在し、DNAの様々な反応を助ける働きをしている蛋白質である。HUは真核生物のヒストン蛋白質と似ていることから、原核生物におけるヒストン様蛋白質と考えられている。X線結晶構造解析の結果が報告されており、HUはホモダイマーで存在し、くさび型のボディー部分と、そこから伸びた2本のアーム部分で構成されている。これまでの研究から、HUはDNAの塩基配列に非特異的に結合し、アーム部分でDNAを結合してDNAを折り曲げていることが示唆されている。本論文は、HUとDNAの相互作用を、結合に伴うHUの分子運動の変化、DNAの構造変化の観点から、NMRを用いて研究した結果について記述したものである。

第1章は序論で、これまでのHUの生物学的、物理化学的な研究を概観している。

第2章では、HU単独の構造・性質を、 ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^2H -NMRスペクトルの解析から研究した結果を記述している。 ^1H -NMRスペクトルの温度変化から、他の方法で求められた変性温度を確かめ、また、熱変性が協同的であると述べている。HUがpH=5.7~10.0において安定であることも見出した。化学的に合成されたHUが、天然のHUと同じ立体構造をとっていることを ^1H -NMRスペクトルから確かめ、立体構造が1次構造で決まることを示した。

第3章では、HUのアーム部分とボディー部分の運動性を ^{13}C の緩和時間 T_1 により調べた結果を述べている。ボディーの疎水性コア内にある Phe47Ca とアームの先端部分にある Gly60Ca を ^{13}C でラベルしたHUを使用した。その結果、アーム部分は運動性が高く、構造がゆらいでいることを見出している。又、DNA結合によって、アーム部分に大きな影響が現れることを見出し、DNAがアーム部分に結合することを確認した。

第4章では、 ^{31}P と ^1H -NMRにより、HUとDNAの相互作用をDNAの構造変化の観点から調べた結果を記述している。8および20ベースペアのDNAを用いて研究している。HUを加えると、全ての ^{31}P のケミカルシフトが変化する。8ベースペアDNAでは

C(7)pC(8)のピークのみ低磁場シフトして、他のピークは、高磁場シフトすることがわかった。DNAのリン酸基の静電相互作用は、 ^{31}P を高磁場にシフトさせることが知られているので、C(7)pC(8)リン酸の低磁場シフトはDNAの構造変化によるものと考え、HUの結合がC(7)~C(8)の領域の構造を変えたことを示唆するとしている。 ^1H -NMRスペクトルの観測により、8ベースペアでは、大きなシフト変化がC(7)とC(8)ベースプロトンとG(2)イミノプロトンで起こることを見出した。20ベースペアでは、T(13)、T(14)、T(15)のイミノプロトンに大きなシフト変化が観測された。これらのシフト変化は、 ^{31}P と同様、HUの塩基配列非特異的結合性から考えて、DNAの構造変化によるものとしている。DNAが二重鎖をとっていることを考慮して、DNAの構造変化は連続した4ヌクレオチドの両側の2、3個のヌクレオチドで起こり、この部分でDNAが折り曲がると示唆している。

本論文は、主に ^1H -および ^{31}P -NMRを用いてDNA結合蛋白質HUとDNAの相互作用を調べたもので、結合に伴う運動性の変化、およびDNAの折れ曲がりについての新しい知見を提供するもので高く評価される。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分な資格があると認めた。