

氏 名 鎌 田 勝 彦

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第234号

学位授与の日付 平成8年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 複製終結点結合蛋白質 (Tus) のDNA複合体結晶構造解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 石濱 明
教 授 桂 勲
教 授 堀内 賢介
助 教 授 白川 昌宏 (奈良先端科学技術大学院大学)
助 教 授 白木原 康雄 (国立遺伝学研究所)

論文内容の要旨

細菌の染色体や細胞質因子では、複製の終結部位 (*Ter*) が決まっている。複製終結点には特異的な塩基配列があり、終結点に近づいてきた複製フォークの進行はその配列によって、進行方向特異的に阻止される。複製終結には、終結部位に結合する蛋白質 (*Tus*) が必須である。申請者は、*Tus*蛋白質と*Ter*DNAの特異的認識及び極性特異的な複製阻害を生み出す分子機構を、*Tus*蛋白質の立体構造の観点から解明することを試みた。

*Tus*蛋白質はT7の発現系を用いて大腸菌内で大量発現させ、陽イオン交換カラムとアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した。一方、*Ter*配列を含む短鎖DNAは、各一本鎖を合成後、逆相カラムを用いて純化し、相補鎖同士を会合させて二本鎖を準備した。*Tus*蛋白質・*Ter*DNA複合体の結晶化は透析法を用いて行なわれた。*Tus*蛋白質の認識配列をもつが、長さと末端の塩基配列の違う約50種類のDNAを調査した結果、構造解析に最も適した結晶は、5'-T突出-16merDNAを含む*Tus*蛋白質複合体結晶であった。また様々な結晶化条件を検索した結果、沈殿剤ポリエチレングリコール4000を含む溶液で、一ヶ月で0.3 x 0.2 x 0.2 mmの柱状結晶が得られた。この結晶は空間群 $P4_12_12$ に属し、格子定数 $a = 68.1$, $c = 230.7$ Åであった。X線回折強度データは筑波高エネルギー物理学研究所の巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いて測定し、その結果、分解能2.7 Å, $I > 1\sigma(I)$, completeness 90.4 %, R margin 6.0 %であった。位相決定には、 CH_3HgCl と K_2PtCl_4 をsoakingによって導入した置換体結晶を用いた。また、*Ter*DNAの特定部位のthymine塩基を5-iodo-uracilに置換したDNA誘導体を用いて、共結晶を調製した。同型置換法と異常分散効果を組み合わせることによって位相計算を行い、さらに、得られた電子密度に対して溶媒領域平滑化法を適用したところ、モデルを構築するに十分な電子密度マップを得ることができた。このモデルはR factor = 0.17まで立体化学的に精密化した。

Tus-*Ter*複合体の立体構造解析の結果、*Tus*蛋白質は、N末ドメインとC末ドメインの二つに分けられ、それぞれ $\alpha+\beta$ 型の構造をもっていた。二つのドメインの間には、大きな溝が形成されており、その中に*Ter*DNAを抱え込んでいた。これらのドメインを結ぶ二本のねじれた β -ストランドと一本の長いループは、DNAの主溝と副溝にそれぞれ挿入されていた。*Ter*DNAはほぼB-DNAの構造をとっていたが、その二本の β -ストランドが結合している周辺では、DNAはやや巻き戻されていた。また、これらの β -ストランドとその長いループに挟まれたDNAのリン酸骨格には、若干のひずみが観察された。

*Tus*蛋白質による*Ter*DNAの特異的な塩基認識は、その二本の β -ストランドを含むドメイン間の β -シートのアミノ酸側鎖によって行われていた。これらは、直接的または水分子を介した水素結合の大きなネットワークを形成していた。特に、C末ドメインの β -シートは、DNAの主溝にほぼ垂直に挿入されており、*Ter*DNAの塩基やリン酸をシートの両面で認識していた。これは既存のDNA結合蛋白質には見

られない新しい結合モチーフであった。このドメイン間領域でのリン酸骨格の認識は片方のDNA鎖に限られており、反対側のリン酸骨格は、ほとんど溶媒側に露出していた。

上述の主要な認識領域は複製フォークの通過を許す側にあり、フォークの先端にあるヘリカーゼはその進行に伴い、Tus蛋白質が相互作用していない一本鎖のリン酸骨格を引き剥がしながら進行すると考えられる。この過程で、この主要な認識領域の水素結合のネットワークは破壊され、Tus蛋白質は遊離し、フォークの進行が可能になると考察できる。逆に、フォークの進行が阻止される側のTus蛋白質の表面には、 α -ヘリックスの領域がDNAを囲むようにクランプ状に配置し、フォークの進行を立体的にブロックできる構造となっている。特に、その領域の α IVと α Vヘリックスは、巻き戻されると考えられる一本鎖を絡ませて二本鎖解離を防ぐのに都合のいい構造的配置を持っている。おそらく、この α -ヘリックスの領域が、主要なDNA認識領域にヘリカーゼの接近を妨げることで、複製のフォークの進行を極性的に停止させると考えられる。

論文の審査結果の要旨

細菌染色体の複製は、決まった起点から開始され、終結部位も決まっている。複製の終結点には、特異的なDNA塩基配列があり、この終結シグナル(*Ter*)が機能するためには、その配列を認識し結合する蛋白質(*Tus*)が関与し、一方向からの複製だけを阻止することが分かっている。本論文は、染色体複製終結の機構の本質的理解を求めて、*Tus*蛋白質の立体構造から解明しようと試みた研究の報告である。

研究は、量産し純化した*Tus*蛋白質と、複製終結*Ter*シグナルの塩基配列を含む、人工合成短鎖DNAから複合体を作製し、X線結晶構造解析に向く良好な結晶を得るために、多大の努力が注がれたようである。即ち、少しずつ配列とサイズの違う、約50種類の短鎖DNAを合成し、さまざまな条件で、複合体の結晶化を試みた結果、末端の片鎖からチミン残基の露出した16塩基長の二本鎖DNAで、最適の結晶が得られた。その結果、最終的には、*Tus*蛋白質-*Ter*DNA複合体の立体構造構造を、分解能2.7Åで、解析に成功した。複合体中の*Tus*蛋白質は、それぞれ $\alpha+\beta$ 型の構造をもつ、N末端ドメインとC末端ドメインからなり、このふたつのドメインの間の大きな溝で、*Ter*DNAを抱え込んでいた。この溝の構成要素である、二本の β シートのアミノ酸側鎖によって、*Tus*蛋白質は*Ter*DNAを認識していることが同定された。また、この溝よるDNAリン酸骨格の認識は、DNAの片方の鎖に限られており、反対側は、溶媒に露出していた。*Tus*蛋白質が、片方向の複製だけを阻止する、機能の偏在性が、この事実でよく理解出来る。

蛋白質立体構造の決定は、技術が進んだ現在でも、長い時間と、相当の経験と運が作用する研究領域である。参加した研究室にすでに前任者の努力の基礎があったとはいえ、本学大学院生がこの研究を仕上げ、その成果で学位を取得し、しかも原著論文の発表までに漕ぎ着けたのは、特筆してよい。論文内容は、学位授与に値すると判定された。しかも、この研究は、結果的に、生命科学研究科のふたつの専攻に所属する複数の教官の指導のもとで、数物科学研究科の施設と教官にも支援を仰いで行った、総合研究大学院大学の組織を存分に利用して行なわれた研究であったことは、今後の本大学の、ひとつの在り方を示唆するものであろう。

学位審査会では、(1)*Tus*蛋白質-*Ter*DNA複合体の結晶化と構造解析実験の理論的、技術的問題点、(2)*Tus*蛋白質構造の特徴とそこから提起された新たな問題点、及び(3) *Tus*蛋白質の構造とその生理機能の相関、を中心に申請者と討論がなされた。

何れの質疑にも的確に応答し、構造決定を仕上げたことによる、論理的成長と自信が認められた。また、残された今後の課題についても、よく理解していた。抛って、学位を授与するに相応しい学力を獲得したと判断した。なお、英語学力については、学位論文の主たる内容を含む論文を作成投稿していることから、充分と判定した。