

[論文の内容の要旨]

論文題目

系統的一塩基置換実験による SYCRP1 と DNA
との結合の定量的解析

Quantitative analysis of binding between SYCRP1 and
DNA by using systematic single base-pair substitution
experiments

尾曲克己

SYCRP1 は *Escherichia coli* の cAMP 受容体蛋白質 (CRP) の標的コンセンサス DNA 配列(5'-A₁A₂A₃T₄G₅T₆G₇A₈T₉C₁₀T₁₁A₁₂G₁₃A₁₄T₁₅C₁₆A₁₇C₁₈A₁₉T₂₀T₂₁T₂₂-3') に結合する。SYCRP1 の全アミノ酸配列は *E.coli* CRP の全アミノ酸配列とは 23% しか一致していないが、*E.coli* CRP の DNA 結合部位のアミノ酸配列と類似したアミノ酸配列をもつ。3次元構造予測によると SYCRP1 の構造は *E.coli* CRP の構造と類似していると報告されており、*E.coli* CRP の DNA 結合ドメインに対応する SYCRP1 のアミノ酸配列領域には直接認識に関係するアミノ酸がすべて保存されている。これらのことより、SYCRP1 と *E.coli* CRP との DNA 結合特性は類似していると推測される。しかし、SYCRP1 の DNA 結合特性は実験的には詳細に調べられていない。本研究では、SYCRP1

と DNA との結合特性を明らかにするために、系統的一塩基置換実験により、SYCRP1 と DNA との結合を定量的に解析した。

はじめに、特異性に関係する塩基を調べた。 *E.coli* CRP コンセンサス DNA 配列の中で保存度の高い T₄G₅T₆G₇A₈ 部位を他の 3 種類の塩基対に系統的に置換した配列とコンセンサス DNA 配列を含め 16 種類の DNA 配列を準備した。この *E.coli* CRP のコンセンサス DNA 配列と SYCRP1 との結合自由エネルギーを基準にして、系統的に 1 塩基置換した DNA との結合自由エネルギーの変化 ($\Delta \Delta G$) を測定した。この結果、調べた 16 種類の配列の中でコンセンサス DNA 配列が SYCRP1 においても最も高いアフィニティーを示した。G₅ と G₇ の位置には、 $\Delta \Delta G$ の値を 4 kcal/mol 以上も変える塩基対置換があり、G₅ と G₇ が特異的結合にもっとも強く影響していた。このように SYCRP1 と DNA との $\Delta \Delta G$ の傾向は、同様の実験で測定された *E.coli* CRP の $\Delta \Delta G$ の傾向と全体的には類似していた。しかし、詳細においては違いが見られた。G₅ の位置での一塩基置換において、SYCRP1 の $\Delta \Delta G$ の順番は A:T<C:G<<T:A であったが、*E.coli* CRP では T:A<A:T<<C:G である。また、G₇ については、SYCRP1 では A:T<<T:A~C:G であったが、*E.coli* CRP では T:A<<A:T~C:G である。SYCRP1 は G₅ と G₇ の位置で T:A 置換より A:T 置換のほうが $\Delta \Delta G$ の値が小さい。SYCRP1 と *E.coli* CRP の構造が全く同じであると仮定すると、この $\Delta \Delta G$ の相違は説明できない。これらの実験結果と予測構造の類似から考えると、ローカルな構造と直接認識に関係するアミノ酸との相互作用が結合の基本的な特異性を決定しており、保存されていないアミノ酸との相互作用を含む他の相互作用が特異性を調節していると推測される。

次に、DNA との結合様式を調べるために解離定数の塩濃度依存性と温度依存性について調べた。SYCRP1 の解離定数の塩濃度依存性を [Na⁺]=60 mM から 200 mM の範囲で調べると、塩濃度が上がると SYCRP1 の解離定数はわずかに増加した。*E.coli* CRP の解離定数は [Na⁺]=150 mM から 350 mM の範囲で調べられており、塩濃度が上がると

E.coli CRP の解離定数は大きく増加する。 SYCRP1 の解離定数の温度依存性について、0 °C、21 °C、37 °Cで調べると、37 °Cで解離定数は増加した。 *E.coli* CRP の解離定数の温度依存性は 5.5 °C、23 °C、37 °Cで調べられている。 温度が上昇すると *E.coli* CRP の解離定数は減少する。 このように、SYCRP1 と *E.coli* CRP の解離定数の塩濃度および温度依存性には違いが見られた。 このことから SYCRP1 と *E.coli* CRP の結合様式は異なることが推測される。

最後に、本研究で測定した $\Delta \Delta G$ から導かれる mutation matrix を利用して、*Synechocystis* sp. PCC6803 の全ゲノム配列に対して $\Delta \Delta G$ を予測した。 これらの中で、 $\Delta \Delta G$ が 2.6 kcal/mol 未満であり、その配列が ORF の間かつ ORF 上流に位置する配列を選び出した。 この結果、39 個の推定上の結合部位を得た。 これらの中には、SYCRP1 が制御していると報告されている遺伝子 slr1667 が含まれていた。 同様の解析を *E.coli* CRP の $\Delta \Delta G$ を用いて行った。 これは SYCRP1 の代わりに *E.coli* CRP を *Synechocystis* ゲノムに導入したとき *E.coli* CRP が結合する *Synechocystis* ゲノム上の位置を表す。 この結果と SYCRP1 の結果を比較すると、SYCRP1 の結合部位 39 個のうち、SYCRP1 固有の結合部位 19 個と *E.coli* CRP にも共通に存在する結合部位 20 個に分類することができた。 SYCRP1 固有の結合部位 19 個を置換部位ごとに分類すると、11 個が G₅ と G₇ の位置に塩基置換をもち、残りの 8 個は他の位置に塩基置換が起こっていることが分かった。 5 位と 7 位の位置の塩基対が結合部位の決定に深く関わると考えられる。 このことより、G₅ と G₇ の位置でのアフィニティーの相違が結合部位の決定に大きな違いを生み出す可能性が示唆される。