

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 姚 明東

本論文では、放線菌 *Streptomyces griseus* 由来の転写調節因子 AdpA と DNA の 2 種類の複合体の結晶構造を基に、AdpA による標的 DNA の認識機構を解析した結果について述べている。本論文は第一章『序論』、第二章『発現コンストラクトの調製』、第三章『AdpA-DNAadsA (type-I) 複合体の構造解析』、第四章『AdpA-DNAsgmA (type-II) 複合体の構造解析』、第五章『複合体構造の比較』、第六章『総合討論』の全六章からなる。

第一章では、これまでに知られている AdpA の役割と重要性が紹介され、申請者が着目した AdpA の性質について説明されている。すなわち、AdpA が認識して結合する DNA の塩基配列特異性に関する情報と、生化学的データから予想される AdpA と標的遺伝子の転写調節領域の結合様式に関する情報が記述されている。そして、塩基配列特異性と結合様式を実現する機構については現在までに明らかにされていないことを示した上で、本研究の目的がこれらの未知のメカニズムを説明する知見を構造学的見地から明らかにすることであるとしている。

第二章では、結晶化に適した AdpA の発現コンストラクトのデザインと、タンパク質試料の発現と精製について記されている。まず初めに、AdpA 全長の発現に成功したものの、その後の精製が困難であることが明らかとなった。次に、AdpA の DNA 結合ドメイン (AdpA-DBD) が標的 DNA と結合する役割を担うという知見から、AdpA-DBD のみを発現させて解析に用いるという考えに至り、AdpA-DBD のコンストラクトを複数デザインした。大腸菌を宿主とする発現系で AdpA-DBD を大量発現し、精製条件を確立した。

第三章では、AdpA-DBD-DNAadsA (type-I) 複合体の結晶構造解析に成功し、DNA の塩基配列認識機構を解明している。AdpA-DBD と DNA の複合体の立体構造は本論文が世界で最初の報告となる。分解能 2.9 Å で結晶構造が決定されていることから、タンパク質のアミノ酸残基の側鎖の配向を知るに十分な分解能と精度で構造が決定されていると考えられる。実際に、結晶構造から示唆された AdpA-DBD と DNA 塩基との相互作用様式を、変異体解析によって実証することができた。具体的には、AdpA のコンセンサス配列のうち、保存傾向の強い 2 つの塩基 (コンセンサス配列の 2 番目の G と 4 番目の C) のみが AdpA-DBD のアミノ酸残基 (Arg-262 と Arg-266) によって認識されていることが示された。また、AdpA-DBD と DNA 主鎖リン酸基の間に多数の相互作用が見られ、AdpA-DBD と湾曲した DNA 分子の間の強固な結合を形成していることが示唆されている。

第四章では、AdpA-DBD-DNAadsA (type-II) 複合体の結晶を決定し、第三章と同様に DNA の塩基配列認識機構を明らかにしている。

第五章では、AdpA-DBD-DNAadsA (type-I) 複合体の構造と、AdpA-DBD-DNAadsA (type-II) 複合体の構造を比較することにより、AdpA-DBD は DNA の塩基配列に依らずほぼ同じ結合機構を有することを明らかにしている。具体的には、2 つの複合体の結晶構造において、DNA 塩基と相互作用しているアミノ酸残基がともに Arg-262 と Arg-266 であり、また、AdpA と相互作用している DNA 塩基がコンセンサス配列の 2 番目の G と 4 番目の C であることを示唆する結果が述べられている。また、DNA 主鎖リン酸基との間の多数の相互作用においても、2 つの結晶構造で見られた相互作用はほとんどが共通していることが述べられている。例外的に 2 つの結晶構造の間で異なっていたのは HTH2 のアミノ酸残基 (Arg-309 と Arg-320) と主鎖リン酸基の相互作用における、アミノ酸残基側鎖のコンホメーションおよび結合距離である。これらのアミノ酸残基に見られた結合様式のわずかな違いによって、AdpA-DBD-DNAadsA (type-I) よりも AdpA-DBD-DNAsgmA (type-II) の方が主鎖リン酸基を介した結合力が強固になるというモデルを申請者は提唱している。相互作用にわずかな違いが見られた理由は、DNAadsA と比較して DNAsgmA 配列の後半部分には塩基対 AT が連続しているため、マイナーグループが狭くなり、DNA が湾曲しやすくなることであると申請者は主張している。そして、ゲルシフトアッセイによって AdpA-DBD と DNA の間の結合力を調べ、申請者の主張を裏付けた。これらの結果から、申請者は type-II の結合様式を有するコンセンサス配列の特徴について一つの結論を導いている。すなわち、type-II の結合様式を有するコンセンサス配列の特徴として、後半部分の塩基 A と T の保存性が type-I のコンセンサス配列よりも高いことが見られ、この DNA 配列の特徴は AdpA-DBD と DNA の間に強固な結合を引き起こすものであり、それゆえに 1 つの DNA 結合領域のみで DNA との結合を行うことが可能になっていると述べている。

第六章では、第五章までに明らかになった AdpA-DBD の標的 DNA との結合機構に基づき、同じファミリーに属する DNA 結合タンパク質と比較して AdpA-DBD の塩基配列特異性は低いと結論づけている。この性質により、AdpA はゲノム上の様々な部位に結合することができ、したがって 500 以上の遺伝子の転写を制御することができるという従来の予想を説明することに成功している。

本論文において、転写調節因子 AdpA による標的 DNA の認識機構が解明された。AdpA は放線菌の形態分化と二次代謝に必須である遺伝子の大部分の転写調節機能を果たしていることから、この機能の解明は放線菌の研究分野に貢献するところが大きいと考えられる。また、本論文に述べられた実験方法、構造情報の解釈、そして AdpA に関する既知の知見を踏まえた考察は論理性に富む。以上のように、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。