JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	Adaタンパク質N末ドメインとDNAの複合体の相互作用
Author(s)	谷口，修一
Citation	
Issue Date	1998-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/2468
Rights	
Description	Supervisor:大久保 忠恭，材料科学研究科，修士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

Ada タンパク質 N 末ドメインと DNA の複合体の相互作用

谷口 修一　(大久保研究室)

[**諸言**] 大腸菌の DNA 修復蛋白質 Ada の N 末ドメイン（N-ada16k）は DNA の修復反応に伴う自身の Cys69 のチオール基のメチル化により、特定の DNA 配列（*ada* 遺伝子のプロモーター領域及び他の DNA 修復蛋白質をコードする *alkA* 遺伝子のプロモーター領域）に対する親和性が千倍以上大きくなり転写制御因子として作用する。僅か一個のメチル基の付加が引き起こす立体構造上の変化により、活性が大きく変化するため、N-ada16k は蛋白質の機能スイッチの良いモデル系となると考えられる。さらに興味深いことに N-ada16k は *ada* 遺伝子に対しては負の制御を行ない、*alkA* 遺伝子に対しては正の制御を行なっている。このメカニズムを解明するには、DNA と蛋白質の相互作用を分子レベルで詳細に解析することが必要である。そこで、NMR を用いて転写制御活性を持つメチル化した N-ada16k（meC69 N-ada16k）と DNA の複合体の解析を行なった。

[**実験**]N-ada16k を得るために大腸菌の大量発現系を用いた。その際、M9 最小培地で ^{15}N ラベル化アンモニウムを用いて蛋白質を安定同位体でラベルした。その後、あらかじめ N- メチルニトロソウレアでメチル化した DNA と反応させ、N-ada16k のメチル基転移活性により Cys69 のメチル化を試みた。得られた meC69 N-ada16k と *alkA* のプロモーター領域を含む合成 DNA21mer（*alkA21*）と 1:1 で混合し、^{15}N-^{1}H HMQC スペクトルを測定した。

[**結果と考察**] 大量発現系を用いて NMR 測定に必要な蛋白質試料 20-40mg を得た。その際 ^{15}N ラベル化塩化アンモニウムを用いて蛋白質を同位体ラベルしたが、ほぼ 100％ラベルすることに成功した。メチル化した DNA との反応後の NMR スペクトルの結果より Cys69 だけがほぼ 100％選択的にメチル化されていた。*alkA21* 添加による HMQC スペクトルの変化より meC69 N-ada16k の DNA 結合部位を同定した。基本的に Cys69 近傍のβシート部位と HTH の２ヶ所で結合していた。既に報告されている *ada* のプロモーター領域を含む合成 DNA18mer（*ada18*）との結合の結果と比較すると、*alkA21* 結合では N 末、C 末部分も結合に関与しており、両者の DNA 結合モードは違っていた。この違いにより転写制御活性の違いが生ずると考えられる。

図は 平成 9 年度修士論文研究発表要旨集参照

keywords　Ada タンパク質,NMR, 正の転写制御, 負の転写制御

Copyright © 1998 by Shuiti Yaguchi