

出芽酵母由来 Tup1 の N 末端ドメインの結晶構造解析 Crystal structure of Tup1 N-terminal domain from *Saccharomyces cerevisiae*

松村浩由^{1*}, 中村太一¹, 日下菜花², 田中直子², 井上豪¹, 向由起夫²

¹大阪大学大学院工学研究科、〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

²長浜バイオ大学バイオサイエンス学科、〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266

1 はじめに

Tup1-Cyc8 コリプレッサーは、真核生物に広く保存された転写抑制因子であり、性分化、グルコース、酸素、DNA 損傷などによって制御される 180 種類以上の遺伝子の転写抑制に関わっている。Tup1-Cyc8 は、自己 4 量体化した Tup1 と 1 分子の Cyc8 から構成されており、RNA ポリメラーゼを含む転写装置やヒストン H3/H4 と相互作用することで転写抑制を行うと考えられている。

これまで我々は、Tup1-Cyc8 全長の構造解析に取り組んできたが結晶が得られなかったため、Tup1 の N 末端ドメインに着目し X 線結晶構造解析に取り組んだ。Tup1 の N 末端ドメイン(1-92 残基)は、Cyc8 との結合と自己四量体の形成に必須のドメインであるため機能面で特に重要とされてきたが、その立体構造は不明であった。

2 実験

組み替え大腸菌を用いて Tup1 の N 末端ドメイン(1-92 残基)を発現させ、精製した後、結晶化を行った。結晶化方法としては、シッティングドロップ蒸気拡散法を用い、沈殿剤として 10 % (v/v) 2-propanol と 0.2 M LiSO₄、緩衝液 0.1 M phosphate-citrate (pH 4.2) を用いた。得られた単結晶を、KEK BL1A, 17A にて X 線回折実験を行った。その結果、1.9Å 分解能の回折強度データを収集することができた。さらに、SeMet 置換体結晶を作製し、SAD 法によって位相を決定した。最終的に 1.9Å 分解能で Tup1 の N 末端ドメインの構造を決定した[1]。

3 結果および考察

構造解析の結果、Tup1 の N 末端ドメインは 1 本の α -ヘリックスを形成しており、さらにそれが 4 本集合してテトラマーを形成している様子が明らかとなった(図 1)。各 α -ヘリックスは逆平行の 4 ヘリ

ックスバンドルを形成しており、テトラマー分子の大きさは約 130 × 25 × 25 Å であった。

Tup1 の N 末端ドメインのテトラマーはコイルドコイルと呼ばれるモチーフによって安定化されていた。このモチーフは 7 残基の反復構造からなっており、その反復構造のうち 1、4、7 番目に位置する疎水性アミノ酸が隣接分子との相互作用に関わることが知られている。Tup1 の N 末端ドメインの構造では、これら疎水性アミノ酸のほとんどが N 末端および C 末端に局在していることが分かった。さらに、これらのアミノ酸を変異すると Cyc8 との相互作用、ならびに Tup1 の転写抑制能が欠損することが分かった。このように、これらの疎水性アミノ酸が、構造・機能の両面においての重要であることが明らかとなった。

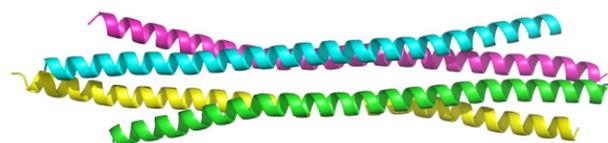


図 1 : Tup1 の N 末端ドメインの立体構造

4 まとめ

本研究によって Tup1 の自己集合様式、ならびにその構造安定性と機能との相関が明らかとなった。

謝辞

ビームラインサイエンティストの方々には回折強度データの収集に当たり大変御世話になりました。この場をお借りし深く感謝いたします。

参考文献

- [1] H. Matsumura, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, (2012) 75-86. * matsumura@chem.eng.osaka-u.ac.jp