

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所 属 (主指導教官)	箱嶋 敏雄		
氏 名	尾崎 淳	提 出	平成12年 1月 6日
題 目	NMR studies of the Bombyx mori transcriptional coactivator MBF1 (カイコ転写コアクチベーターMBF1のNMRによる研究)		

要旨

Background: Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is a transcriptional coactivator necessary for transcriptional activation caused by DNA binding activators, such as FTZ-F1 and GCN4. MBF1 bridges the DNA-binding domains of these activators and the TATA-box binding protein (TBP), suggesting that MBF1 functions by recruiting TBP to promoter. In addition, MBF1 stimulates DNA binding activities of the activators to their recognition sites. To date, some of tertiary structure of coactivators had been determined. But MBF1 has some unique features compared to them: (1) MBF1 contacts with DNA binding domain, while all of these proteins with the activation domain of activators, (2) all of them contacts through hydrophobic interaction, while MBF1 through electrostatic interaction.

Results: The two-dimensional (2D) ^{15}N - ^1H correlation spectrum of ^{15}N labeled MBF1 indicated that MBF1 consists of both flexible and well structured parts. Limited digestion of MBF1 by α -chymotrypsin yielded a ~9 kDa fragment. N-terminal sequence analysis and NMR measurements revealed that this fragment originates from the C-terminal 80 residues of MBF1 and form a well structured C-terminal domain of MBF1 (MBF1CTD). As previous deletion analyses have shown that MBF1CTD is capable of binding to TBP, it is suggested that MBF1CTD is the TBP binding domain of MBF1. Sequential assignments have been obtained by means of three-dimensional (3D) and four-dimensional (4D) heteronuclear correlation spectroscopies, and then the tertiary structure of MBF1CTD was determined. As a result, MBF1CTD was shown to contain four amphiphathic helices and a conserved C-terminal region (C-loop). While secondary structure analysis indicated that C-loop would not be any secondary structure, backbone dynamics and mutational studies suggested that the loop is well structured and structurally vital. Chemical shift mapping experiments for MBF1 mixed with TBP and the previous results of mutational studies suggested that an acidic cluster around Asp106 in third helix is responsible for the binding to TBP.

Conclusions: Structural analyses revealed that MBF1 consists of two structurally different domains. A N-terminal region is indispensable for the binding to activators, and does not form a well defined structure. In contrast, the C-terminal 80 residues, which is capable of binding to TBP by itself, form a well-structured domain, MBF1CTD. MBF1CTD is made up of four amphipathic helices and a conserved C-terminal tail. A putative TBP binding residue is found to be located on the hydrophilic surface of the third helix.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 尾崎 淳

平成12年1月6日に提出された論文は、カイコの遺伝子転写転写コアクチベーターMBF1の構造ドメインの同定、C末端ドメインの核磁気共鳴（NMR）法による溶液中での立体構造の決定、C末端ドメインと基本転写因子TBPとの相互作用、N末端ドメインと転写活性化因子との相互作用の考察を記述している。

申請者は蛋白質分解酵素処理、アミノ酸配列決定といった生化学的手法とNMRスペクトルの解析を併用して、MBF1のドメイン解析を行った。その結果、TBPという一定のリガンドと結合するC末端部分が安定な立体構造をとるのに対して、多くの転写因子の結合を担うN末端側66残基は溶液中で安定な立体構造をとらない事を示した。C末端ドメインの立体構造は、4本のヘリックスと特徴的なC末端ループを持つ。4本ヘリックスの部分は原核生物のリプレッサーと高い相同性を示す。

申請者はほぼ単独で、MBF1、TBPなどの蛋白質試料調整、ドメイン解析、NMRによる立体構造決定、TBPとの結合などの一連の実験を行った。立体構造決定と得られた構造に対する評価・解析は緻密、かつ正確に行われ、溶液中の立体構造解析として十分な分解能が得られおり、申請者が生化学、構造生物学の手法と専門的知識を修得していると判断できる。得られた構造を基に結合実験や変異体実験を解釈し、MBF1-TBP相互作用のモデルとMBF1の機能の合理的な説明を行っている点も申請者の能力を示すものである。一方、MBF1のN末端ドメインとDNA結合性転写因子との相互作用のモデルは多分に推論的ではあるが、得られている実験事実を合理的に解釈していると見なせる。

TBP結合性のコアクチベーターの構造決定はこれが最初であり、その構造が機能としては異なるものの、原核生物の転写因子と共通の立体構造モチーフを持つ点を明らかにしたことは、分子進化や次世代の構造ゲノムの観点からも意義がある。またMBF1のN末端側とC末端側が構造的に異なる性質をもつことは、その分子機能との関係において重要である。

以上のように、本論文は遺伝子転写研究に大きな貢献をするもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。