

「生命活動のプログラム」
平成8年度採択研究代表者

鈴木 理

(生命工学工業技術研究所 室長)

「超好熱性古細菌転写因子ネットワークの構造生物学的解析」

1. 研究実施の概要

ゲノムは、遺伝子の単なる集合体ではない。ゲノムを音楽テープにたとえるなら、遺伝子は音楽テープ中の「曲」に対応する。音楽テープで「曲」の前に「読み出しのシグナル」が配置されているように、各遺伝子の前に、その遺伝子を使用される（発現する）条件がシグナル配列（プロモーター）として書きこまれている。遺伝子は通常“眠って”いる。「プレイヤー」が「読み出しのシグナル」を認識する事によって「曲」が演奏されるように、読み出し蛋白質（転写制御因子）がプロモーター配列に結合する事によって遺伝子の on、off 制御がなされる。今、仮に 1000 個の遺伝子があり、各々が独立に制御されているとする。1000 種のプロモーターを認識するためには、1000 個の読み出し蛋白質が必要となる。これら読み出し蛋白質も遺伝子によってコードされているので、1000 個の読み出し蛋白質遺伝子の制御のために、さらに別の 1000 の読み出し蛋白質が必要となる。この連鎖が続けばゲノムは無敵大になってしまう。現実には、ゲノムの大きさは有限で、全遺伝子のうち、わずか 10%以下が読み出し蛋白質をコードしているにすぎない。ゲノムという箱に遺伝子を入れて制御するこのカラクリが本研究の対象とする「転写ネットワーク」である。古細菌のゲノムは約 2 百万塩基対からなり、コードされる全遺伝子数は 2000 弱程度、予想される読み出し蛋白質遺伝子数は 2 ケタであり、真核生物や真正細菌のゲノムに比べてきわめて簡単なシステムである。この簡単さが転写ネットワーク解明への大きな助けになると思われる。

古細菌の中には超好熱性のもの（生育温度 100℃）があり、その蛋白質はいずれも高い熱安定性を持ち、これが古細菌を研究対象とするもう一つの利点である。蛋白質が高温下で機能するためには、蛋白質各ドメインの安定性が高いのみならず、ドメイン間の運動が高温下で適切に推持されている事が要求される。たとえば酵素が機能するためには、酵素は基質のいろいろな状態に対応した複数のコンフォメーションをとらねばならない。複数のコンフォメーションは酵素の各ドメインの構造を変化させるというよりは、ドメイン間の配置を変化させる事によって、形成される。転写因子の各ドメインの熱安定性ととも、ドメイン間運動の熱依存性が DNA

との相互作用にどのように利用されているかを調べることにより、蛋白質の機能構築に関する重要な知見が得られるであろう。

2. 研究実施内容

本研究では超好熱性古細菌の転写調節機構を系統的に解析する事により、

1. 転写調節系全体像の解明を目指すとともに
2. 生体高分子（蛋白質、核酸）の耐熱機構の解明を目指し、さらに
3. 古細菌、真核生物の進化に関する情報を得る事を目標とする。

ゲノム科学的研究の成果

古細菌遺伝子、プロモーターの情報科学的同定-全ゲノムDNA配列解析の第一の重要課題は、決定されたゲノム DNA 配列を遺伝子部とプロモーター部に切りわけける事である。これができなければ遺伝子の同定すら可能ではない。またプロモーター配列の同定はゲノムというシステムの理解への出発点である。平成9年度に、転写、翻訳のシグナルの予測をもとに古細菌遺伝子を同定する情報科学システムの開発に成功した。このシステムを用いて平成10年度に超好熱性古細菌 *Pyrococcus* OT3 の全ゲノム DNA 配列を解析し、全遺伝子、全プロモーターを同定するとともに、後述するような生物学的知見を得た。より将来的には他の系(ヒトなど)に応用できるようこのシステムをさらに発展させる事により、新規で独創的な情報科学技術が確立されると期待される。

Pyrococcus OT3 ゲノム遺伝子構成の研究-同定された約1700の遺伝子は真核生物の遺伝子に類縁関係を持つもの(約4分の1)と真正細菌の遺伝子に類縁関係を持つもの(約4分の3)に大別され、両者の中間的性格を持つものはない。真正細菌型遺伝子がゲノム全体に分散するのに対し、真核生物型遺伝子は特定の領域(環状ゲノム DNA 分子を12時間一周の時計にみたてた時の1時半~3時半の領域)に集中する。性格の異なる2つの遺伝子群の存在は、起源の異なる2つのゲノムの融合によって古細菌が誕生した可能性を強く示唆する。

DNA 配列を用いたゲノムの比較-*Pyrococcus* OT3 と *Pyrococcus furiosus* のゲノム DNA 配列を比較したところ、全体としては良く対応するものの、平均20K塩基程度の単位でゲノム中のDNA位置が移動している事が分かった(ゲノムのシャッフル)。一方、各種古細菌のゲノムの中で約30塩基からなる配列が合計100回以上も反復している事が明らかになった。これら高度反復配列は各ゲノム内に2-10群程度に分かれて配置されており、ゲノムDNAのシャッフルとの何らかの関連が示唆される。

栄養要求性とゲノム遺伝子構成の対応-ゲノムDNA配列からその生物が適応している環境を予測する試みの一環として、中央代謝経路(解糖系とTCA回路)に関与する遺伝子を4種の古細菌のゲノムDNA配列をもとに同定した。これらの古

細菌の解糖系は、Embden-Mayerhof 型に近い点で共通する。また *Archaeoglobus* (従属栄養性) では TCA 回路がほぼ完成しているのに対し、*Pyrococcus* (従属栄養性)、*Methanococcus* (独立栄養性)、*Methanobacterium* (独立栄養性) では回路の左半分のみが存在する。独立栄養性の 2 種は、メタン合成により直接 H^+ 勾配をつくり ATP を合成しているため、TCA 回路は生合成のみを目的として使われ、回路の左半分は反時計まわりに運転されている。*Pyrococcus* と *Archaeoglobus* の TCA 回路の差は、前者が主にアミノ酸を栄養源としていて、その中間代謝物は TCA 回路左半分に位置する α -ケトグルタル酸やフマル酸であるらしく、一方、後者は乳酸や脂肪酸に依存し、通常どおりにアセチル CoA から TCA 回路に入る事にあるらしい。両者ともこれを時計回りに運転して補酵素を還元するものと考えられる。以上のような栄養依存性特異的な特徴が明らかになった。

分子生物学的研究の成果

Thermoplasma volcanium GSS1 ゲノム全 DNA 配列の決定-大阪大学他 5 大学 3 企業との協力により平成 10 年度に古細菌 *Thermoplasma volcanium* GSS1 の全ゲノム DNA 配列 (1.6M 塩基対) を決定した。決定にはコスミド、BAC、 λ 等のライブラリーを用い、冗長度は 8.1 程度である。これにより、*Pyrococcus* 属とともに本研究の対象となる古細菌、*Thermoplasma*、の転写ネットワークを解明するための重要な手がかりが得られた。

古細菌特異的転写系の同定-平成 9 年度に *Sulfolobus* や *Thermoplasma* に銅、亜鉛に依存して特定遺伝子の発現を制御する系が存在する事を発見した。これは古細菌として同定された初めての環境適応性遺伝子制御系である。平成 10 年度にはこの系のプロモーター DNA 配列と、これに結合する転写因子、およびそのアミノ酸配列を決定した。

好熱性古細菌遺伝子の実験的同定-古細菌の遺伝子とは異なる点が多く、遺伝子の情報科学的同定にもまだ疑問の余地がある。平成 8 年度以降、古細菌からの mRNA の単離を試みた結果、一部の報告に反し、少なくとも大部分の mRNA はポリ A リンカーを持たない事が明らかになった。したがって通常の方法で mRNA を分画する事はできない。平成 10 年度、試験管内で酵素を反応させる事により、比較的選択的に、mRNA にポリ A リンカーを人工的に付加する事に成功した。おそらく tRNA や rRNA の持つ立体構造のため、この酵素はこれらの RNA には反応しにくいのであろう。これにより RNA プールからの mRNA の分画がより現実的となった。

構造生物学的研究の成果

X 線結晶法による転写因子立体構造の研究-平成 8、9 年度に複数の古細菌種より基本転写因子、TATA ボックス結合蛋白質 (TBP) の遺伝子を単離し、大量発

現系を確立した。平成 10 年度に好気性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来 TBP の単結晶を得、 2.0 \AA (R 因子 22%) の精度で立体構造の決定に成功した。また *Sulfolobus acidocaldarius*、*Pyrococcus*、*Thermoplasma* 由来 TBP の耐熱性を測定、比較した結果、耐熱性は各生物の生育温度のみならず pH、KCl 濃度等に大きく依存する事が明らかになった。

TBP は、ほぼ等価な 2 つのドメインから構成される。決定した *Sulfolobus* の TBP (耐熱性) の立体構造を、他グループの決定した *Pyrococcus* 由来 TBP (超耐熱性)、真核生物 由来 TBP (常温性) と比較したところ、2 ドメインの接触面上のある位置が、耐熱性の高いものほど、より大きなアミノ酸に置換されている事が明らかになった。このアミノ酸はドメイン間の角度を決定するとともに、おそらくドメイン間運動を制限していると予想される。

電子顕微鏡法-本研究予算で購入したエネルギー分光型電子顕微鏡が平成 9 年 6 月末から使用可能となった。エネルギー分光装置は画像の S/N 比の向上に貢献するとともに特定の原子、例えば DNA のリン原子からの情報を選択的に画像化したり (カラー電子顕微鏡法とよばれる)、エネルギー変化のない電子線のみを用いて位相差像を結像したりする事が可能である。平成 10 年度、3 次元構造を凍結した大腸菌プラスミド DNA の位相差像を、ステージを傾斜しながら連続的に得、これをもとに、プラスミド DNA の 2 重らせん軸を 3 次元でトレースする事に成功した。このようなものとしては世界で初めての成果である。

NMR 分光法-平成 9、10 年度、植物由来転写因子の DNA 結合ドメイン GBD と標的 DNA の複合体立体構造の決定に成功した。平成 10 年度には古細菌由来 Zn フィンガードメインの立体構造を決定した他、転写、翻訳関連蛋白質 NusG をはじめとする古細菌由来各種蛋白質の立体構造、熱安定性、DNA との相互作用等の研究を行った。NusG 蛋白質の分子量は 2 万に近く、NMR による研究対象としては比較的大きく、常温での構造決定は難しい。NMR シグナルの分離度は分子の運動性に依存しており、運動性が高いほど良いスペクトルが得られる。逆に対象蛋白質の分子量が大きくなると、運動性が低下し、良好なスペクトルが得られなくなる。これを解決するためには、温度を上げて分子の運動性を良くすることが考えられるが、通常のプロテインでは立体構造が不安定になってしまう。NusG のように高い耐熱性をもつ蛋白質に対してのみ、高温下での立体構造決定となる。

NMR 分光法による立体構造決定に際して、生体高分子の安定型アイソトープによる標識が必要となる (NMR の観測の対象となる元素種が限られるため、たとえば N14 は不可能で N15 は可能)。平成 9 年度に米国イェール大学から酵素合成法による DNA のアイソトープ標識を学び、平成 10 年度にはこの方法を用いて古細菌 TATA ボックス結合蛋白質 (TBP) の結合部位 DNA 2 種を合成した。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Suckow J. M., Amano N., Ohfuku Y., Kakinuma J., Koike H., and Suzuki M.,
A Transcription Frame-based Analysis of the Genomic DNA Sequence of a
Hyper-Thermophilic Archaeon for the Identification of Genes, Pseudo-Genes
and Operon Structures, *FEBS Letters*, 426, 86-92 (1998)
- Ohfuku Y., Koike H., Azuma Y., Kawashima T., Kudo N., Amano N.,
Kakinuma J., Suckow J. M., and Suzuki M.,
Identification of Genes in the Complete Genomic DNA Sequence of a Hyper-
Thermophilic Archaeon, *Pyrococcus* sp. OT3, *Proceedings of the Japan
Academy*, B74, 90-95 (1998)
- Shimofurutani N., Kisu Y., Suzuki M., and Esaka M.,
Functional Analyses of the Dof Domain, a Zinc Finger DNA-Binding Domain
in a Pumpkin DNA-Binding Protein AOBP, *FEBS Letters*, 430, 251-256 (1998)
- Allen M. D., Yamasaki K., Takagi M., Tateno M., and Suzuki M.,
A Novel Mode of DNA Recognition by a β -Sheet Revealed by the Solution
Structure of the GCC-Box Binding Domain in Complex with DNA, *The EMBO
Journal*, 17, 5484-5496 (1998)
- Kisu Y., Ono T., Shimofurutani N., Suzuki M., and Esaka M.,
Characterization and Expression of a New Class of Zinc Finger Protein That
Binds to Silencer Region of Ascorbate Oxidase Gene, *Plant Cell Physiol*, 39,
1054-1064 (1998)
- Tateno M., Yamasaki K., Amano N., Kakinuma J., Koike H., Allen M. D., and
Suzuki M.,
DNA Recognition by β -Sheets, *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)*, 44, 335-
359 (1998)
- Yamasaki T., Yamasaki K., and Suzuki M.,
Methylation of Adenine Bases at the N6H2 Groups Decreases the Melting
Temperature of the DNA Duplex Independently of the Nucleotide Sequence,
Proceedings of the Japan Academy, B74, 210-215 (1998)
- Makino S., Amano N., Koike H., and Suzuki M.,
Prophages inserted in archaeobacterial genome,
Proceedings of the Japan Academy, B75, 116-171 (1998)
- Yamasaki T., Suckow J.M., Yamasaki K., and Suzuki M.,
Zinc Finger Prpoteins of the Archaeobacterial Origin,
Proceedings of the Japan Academy, B74, 227-232 (1998)

- Amano N., Ohfuku Y., Kakinuma J., Koike H., Tateno M., Suckow J. M., and Suzuki M.,
Informatical Analysis of Archaeal Genomic DNA Sequences 1: Informatical Basis for ORF Identification and Its Application to Developing an Efficient Algorithm for the Precise ORF Identification, *Microbial & Comparative Genomics*, 3, C21 (1998)
- Azuma Y., Ohfuku Y., Koike H., Amano N., Kakinuma J., Tateno M., Suckow J. M., and Suzuki M.,
Informatical Analysis of Archaeal Genomic DNA Sequences 2: Gene Composition of Archaeal Genomes, *Microbial & Comparative Genomics*, 3, C21-C22 (1998)
- Ohfuku Y., Koike H., Amano N., Kakinuma J., Tateno M., Suckow J. M., and Suzuki M.,
Informatical Analysis of Archaeal Genomic DNA Sequences 3: Positioning of High Repetitive DNA Sequences in Reference to the Direction of Transcription and Replication, *Microbial & Comparative Genomics*, 3, C31-C32 (1998)
- Suckow J. M., and Suzuki M.,
Genomic DNA Shuffling in Archaeobacteria,
Proceedings of the Japan Academy, B75, 10-15 (1999)
- Suckow J. M., and Suzuki M.,
A Sequence of Thirty Bases That Is Highly Repetitive in Archaeobacterial Genomes,
Proceedings of the Japan Academy, B75, 16-21 (1999)
- Koike H., Amano N., Tateno M., Ohfuku Y., Suckow J. M., and Suzuki M.,
Distribution and Orientation of Genes in the Genome of Pyrococcus OT3,
Proceedings of the Japan Academy, B75, 37-72 (1999)
- Tateno M., Koike H., Amano N., Ohfuku Y., and Suzuki M.,
Archaeobacterial Ribosome is a Chimera of Eubacterial-Type RNAs and Eukaryotic-Type Proteins, *Proceedings of the Japan Academy*, B75, 64-69 (1999)
- Suzuki M.,
An Outline of an Informatical Method for Identifying the Complete Set of Genes Using the DNA Sequence of a Whole Genome, *Proceedings of the Japan*

- Academy*, B75, 81-86 (1999)
- Koike H., Kawashima T., and Suzuki M.,
Comparison of Archaeobacterial Central Metabolic Pathways Using the
Genomic DNA Sequences, *Proceedings of the Japan Academy*, B75, 101-106
(1999)
- Makino S., Amano N., Koike H., and Suzuki M.,
Prophages inserted in archaeobacterial genomes,
Proceedings of the Japan Academy, B75, 166-171 (1999)
- 鈴木理 「超好熱性古細菌ゲノム DNA 配列の解析」
『生物工学』 第 76 巻 6 号, 256-258 1998. 6.
- 鈴木理 「DNA の立体構造-2 塩基対ステップ模型からのアプローチ-」
『現代化学』 No.329, 23-30 東京化学同人 1998. 8.
- 鈴木理 「DNA の立体構造-その 2: 溝からの展望-」
『現代化学』 No.331, 48-57 東京化学同人 1998. 10.
- 鈴木理 「DNA の立体構造-その 3: 転写ネットワークと DNA 認識コード-」
『現代化学』 No.334, 16-21 東京化学同人 1999. 1.
- 鈴木理 「DNA の立体構造-その 4: DNA 認識コードの立体化学的基礎-」
『現代化学』 No.335, 26-34 東京化学同人 1999. 2.