

「たんぱく質の構造・機能と発現メカニズム」
平成 15 年度採択研究代表者

鈴木 理

(独)産業技術総合研究所 脳神経情報研究部門 DNA 情報科学研究グループ グループリーダー)

「FFRP たんぱく質群による DNA・リガンド識別機構の解明」

1. 研究実施の概要

5 年間全体で、①FFRP の N ドメインが塩基配列を系統的に識別する機構 (DNA 認識コード) および②C ドメインが多様なリガンド (環境変化を伝える) を識別する機構を解明することを目的とする。これをもとに、③緑膿菌等の FFRP を標的として、細菌種ごとに対処する新しい創薬戦略の基盤を開発し、さらに全てを総合して、④少数の転写因子により多数の遺伝子群の環境適応的制御を可能とする機構の全体像を解明する計画である。4 つの研究項目の中では、①②が比較的前半の中心、③④が後半の中心となる。

2. 研究実施内容

平成 17 年度は、前半を締めくくる重要な年であり、また後半を開始するための準備期にもあたった。

4 つの目標のうち、①に関連して、平成 16 年度までに FFRP 蛋白質 FL11 が自身をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合する事、結合領域が転写、翻訳開始位置から遺伝子の一部までをも含む事を明らかにしていた。この結果をもとに、平成 17 年度には FL11 二量体の結合する 13 配列を同定し、これを含む DNA を合成し、FL11 との相互作用を確認した。蛋白質側、DNA 側双方に変異を導入し、13 配列の同定が正しかった事を証明するとともに、二分子の相互作用の詳細を解析しつつある。さらに、長さの異なる複数の合成 DNA を用いて FL11 と共に結晶化を試みた結果、良好な共結晶 1 種を得た。現在、これをさらに改良するとともに解析中である。

FL11 会合体とプロモーター DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡像を得るとともに、様々な電子顕微鏡技術を開発、応用し、FL11 に適用した。この結果、FL11 八量体（二量体が 4 つさらに会合）と DNA の複合体の良好なネガティブ染色像を得た。この像に 30 度から 50 度の傾斜をかける事により、複数の投影像を得、現在三次元構造の再構成にとりくんでいる。

さらに、セレクス、フットプリント法等を用いて、FL11 以外の各種 FFRP (FL10、FL4 等) の二量体も、共通して ABCD TTT DCBA 配列を認識する事を明らかにした。ここで ABCD と DCBA は互いに相補的な 5 塩基対である。

②に関連して、FFRP 蛋白質 DM1 の結晶（八量体会合）中のリガンド結合部位にセレノメチオニン分子をソーキングし、セレンの異常分散を使って結合の詳細を決定する事に成功した。また、光散乱、ゲルろ過等により、各種アミノ酸等のリガンド存在下で DM1 の会合度が様々に変化する様子を解析した。試験管内実験では DM1 の主要なリガンドはイソロイシンであると考えられるが、蛋白質発現に際して大腸菌細胞に存在する未知のリガンドを抱き込む形で DM1 は結晶する。この未知のリガンドがイソロイシンであるか否かが何年間かにわたる大問題だった。現在、この問題がやっと解決しつつあり、成果を近日中に報告する事が可能と予想する。さらに人工的な化合物の中にも DM1 の会合状態を変化させるものが多数、存在する事が明らかになった。

2 プラスミド系を使って、大腸菌の FFRP、Lrp と AsnC が会合する事、この相互作用にリガンドが影響する事、古細菌の異種 FFRP の中にヘテロに会合するものがある事を明らかにした。同じ 2 プラスミド系を使う事により、FL11 の会合部（C ドメイン）が TATA 結合蛋白質（TBP）と相互作用するとのプレリミナリーな結果を得た。この結果は、FFRP が TBP の下流に結合して転写を阻害する事もあれば、TBP のすぐ上流に結合して転写を活性化する事もできるという私達の仮説を支持する。

さらに、後半③への準備に関連して、緑膿菌 FFRP8 種の発現系を構築し、これらを緑膿菌内で発現させたところ、培養液の色が様々に変化する事が明らかになった。緑膿菌は 2 つの色素を産し、これら色素はクオラムセンシング等緑膿菌の重要なシグナル伝達機構に関与しているとされる。私達の結果は、FFRP がこれら色素の産生を制御している事を示唆しており、この確認をめざして、現在、より系統的な発現解析を試みている。また、2 種の緑膿菌 FFRP の大量生産系を構築するとともに、精製、結晶化を試みている。

④に関連して、好気性、嫌気性特異的に発現する古細菌サーモプラズマの蛋白質を系統的に同定した結果、これらの中に FFRP 蛋白質が含まれる事を確認した。現在、イン・ビトロ 転写系の構築をめざして、RNA ポリメラーゼのサブユニット等、必要な蛋白質の約 3 分の 1 の発現系を構築、精製を順次、すすめている。

予想しなかった新展開として、計画開始時から知っていた標準的な FFRP に加えて、二次構造（ α ヘリックス、 β スtrand）間にリンカーを持つ古細菌 FFRP の存在が示唆された。このリンカーにはセリン、スレオニンが多く含まれ、多重リン酸化部位である可能性が高い。さらに、真核生物の中に FFRP に近い転写因子が存在する可能性を検討し、その候補を得た。

3. 研究実施体制

「鈴木」グループ

①研究分担グループ長：鈴木 理（産業技術総合研究所、グループリーダー）

②研究項目：

- FFRP 立体構造の決定、解析

- ・古細菌 FFRP の分子識別機能の解析

概要：①古細菌、真正細菌由来の FFRP 蛋白質、あるいは FFRP 蛋白質と DNA、もしくはリガンドとの複合体の立体構造を X 線結晶解析により決定する。あるいはクライオ電子顕微鏡法によりこれらの立体構造を解析する。②古細菌 FFRP の DNA、リガンドとの相互作用を物理化学的、生化学的手法を用いて解析する。

「牧野・荒牧」グループ

①研究分担グループ長：牧野 耕三（防衛大学校応用化学科 生物化学講座、教授）

②研究項目：

- ・緑膿菌等真正細菌 FFRP の分子識別機能の解析

概要：緑膿菌、大腸菌等の真正細菌由来の FFRP 蛋白質を発現し、その DNA、リガンドとの相互作用を生化学、物理化学的手法を用いて解析する。FFRP 蛋白質の機能を細菌中で分子遺伝学的に解明するとともに、効果的な人工、あるいは自然のリガンドが探索された場合には、菌への薬剤効果を調べる。

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- Light scattering from assemblies of an archaeal feast/famine regulatory protein, DM1(pot1216151),
Sakuma M., Nakamura M., Koike H. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.110-116, 2005/04
- Orthologous and paralogous FFRPs in E.coli and related proteobacteria,
Yokoyama K. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.129-139, 2005/05
- Identification of proteins present in the archaeon Thermoplasma volcanium cultured in aerobic or anaerobic conditions,
Kawashima T., Yokoyama K., Koike H. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.204-219, 2005/06
- Construction of Cloning System for CRP-cAMP Dependent Promoters in Escherichia,
Yokoyama K., Oyamada H., Suzuki M. and Makino K.,
Memoirs of The National Defense Academy, 45, pp.1-9, 2005/06
- GATC Methylation by Dam methylase in archaea: its roles and possible transcription regulation by an FFRP,

Koike H., Yokoyama K., Kawashima T., Yamasaki T., Makino S., Clowney L. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.278-290, 2005/09

- Comparison of modes of DNA-binding and bending by archaeal transcription factors, Phr, TrmB, GvpE, GvpD, NrpR, Lrs14 and MDR1,
Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.334-348, 2005/10
- Comparison of foot-prints of FFRPs on promoters designed for autoregulation:
FL10(pot0377090,LrpA), FL11(pot0434017), and Ss/Sa-Lrp,
Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.403-409, 2005/11
- A SELEX of the DNA-binding specificity of archaeal FFRPs: FL10(pot0377090, LrpA),
Yokoyama K., Ihara M., Ebihara S. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B81, pp.463-470, 2005/12
- A SELEX study of the DNA-binding specificity of archaeal FFRPs: 2. FL4(pot1613368),
Yokoyama K., Ihara M., Ebihara S. and Suzuki M.,
PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, B82, pp.33-44, 2006/01
- Feast/famine regulatory proteins(FFRPs): Escherichia coli Lrp, AsnC and related archaeal
transcription factors,
Yokoyama K., Ishijima S., Clowney L., Koike H., Aramaki H., Tanaka C., Makino K. and
Suzuki M.,
FEMS Microbiol Rev, 30, pp.89-108, 2006/02