

「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

平成 18 年度はきわめて重要な展開の年となった。10 月の中間評価までに、またそれ以降にも、様々な進展が相次いだ。

パイロコッカス OT3 由来の FFRP、FL11 を標的 DNA とともに共結晶化し、その塩基配列特異性を確認した。この結果をもとにゲノム中の全プロモーター配列を検索し、被制御遺伝子を系統的に同定した結果、FL11 によるゲノムワイドな転写制御の全貌が明らかになった。この展開が最重要の成果である。

パイロコッカス OT3 は、沖縄海溝の熱水チムニーにふりそそぐ魚の死骸を食糧として増殖する。ポリペプチドを分解して ATP を合成するとともに様々な物質を生産する機構の全体を FL11 は制御しており、栄養状態をアミノ酸のリジンの濃度で感知する。代表的な FFRP である大腸菌の Lrp のように、古細菌においても FFRP は Feast (宴会)・Famine (飢餓) 制御をおこなっていたのである。細胞あたり数千分子も FL11 が存在し、コールド・ショックによりさらに 10 倍程度にも誘導される事も明らかになった。平成 15 年度に決定したシリンダー型 FL11 会合体のような一種のクロマチン構造が低温下に形成され、低温への抵抗性を発揮する機構も明らかになりつつある。

別の FFRP、DM1 とリガンド 2 種の複合体の解析をもとに各 FFRP のリガンドの予想、同定が可能になった事、FFRP の DNA 結合ドメインの多重リン酸化の解明、イン・ビトロ転写系を用いた FL11 による転写抑制実験、アルギニン存在下に DM1 と FL11 がヘテロ会合体を形成する事実の解明、サーモプラズマ・ボルカニウムの好気・嫌気適応を制御する FFRP、TvFL1 の同定など、話題に事欠かない 1 年であった。今後はこれらの成果をいっそう発展させるとともに、成果を戦略的に発信していく事が重要と考える。

2. 研究実施内容

1. FL11 と標的 DNA の共結晶化

FL11 二量体と **TGAAA**WWWT**TTTCA** 配列 (W は T または A) を含む 17 塩基対 DNA を共結晶化し、各単量体の 2 つの α ヘリックス間に形成されたループが **TGAAA** 塩基配列認識の主要部である

事を見出した。FL11 は WWW 配列には直接、接触しないが、この 3 塩基対を G-C 対に置換すると、ほとんど結合が観られない。この部分で A-T 塩基対の平面性が崩れプロペラ・ツイストする事により DNA が湾曲化する事が、相互作用に重要であると結論した。

2. FL11 によるイン・ビトロ転写抑制実験

パイロコッカス OT3 の RNA ポリメラーゼ各サブユニットを大腸菌で発現、再構成し、*h11* プロモーターからの転写が FL11 により抑制される事を示した。このプロモーターは **TGAAAWWTTTCA** 配列を二つ持つ。**TGAAAWWTTTCA** が標的である事実は、もともと平成17年、このプロモーターを用いたフットプリント実験により明らかになった。同様にサーモプラズマ・ボルカニウムの RNA ポリメラーゼ各サブユニットを発現、再構成し、イン・ビトロ転写調節実験が可能になった。

3. FL11 に制御される遺伝子群の同定

パイロコッカス OT3 のゲノム配列中に **TGAAAWWTTTCA** 配列を検索し、TATA ボックスからスタートコドン下流百塩基までにこの配列を持つプロモーター218 個を同定した。このうちのいくつかを使ってフットプリント実験を行い、予想された部位に FL11 が結合する事を確認した。これらのプロモーターは、情報科学的に同定した 1025 の全転写ユニット(オペロンおよび独立遺伝子)の 21% にも達する。その内訳は ATP 合成関係が最も多く、膜輸送(たとえば ABC トランスポート系)がこれに続く。ポリペプチドを取り込みアミノ酸を分解しながら、NADH デヒドロゲナーゼを使ってプロトン を排出し ATP を合成するとともに、TCA サイクルを逆に回して物質を生産する経路を FL11 が制御していると解釈される。

4. リジン存在下での FL11 八量体の形成

リジン存在下で FL11 二量体4つが会合し、円盤状の八量体を形成する事を明らかにするとともに、この円盤構造、さらには DNA との複合体の構造を電子顕微鏡により解析した。*h11* プロモーターには二量体結合部位2つが約 60 塩基離れて位置し、リジン存在下ではこの二つを中心に、その中央、さらには上流、合計4つの部位を八量体がカバーする。したがって、二量体結合部位間の標準的な距離は 30 塩基と考えられる。類似の八量体結合部位が、リジン合成オペロンのプロモーターにも見つかった。

パイロコッカスにとりリジンは栄養状態の指標となっているらしく、富栄養状態(宴会モード)では、リジンとともに FL11 の合成が停止すると予想される。数少ない FL11 は細胞内のリジンとともに八量体を形成し、少数の八量体結合部位に結合する。貧栄養状態(飢餓モード)では、リジン濃度の低下とともに八量体が解かれ、*h11* の転写抑制が弱まって FL11 分子の数が増えるとともに、FL11 二量体がより多くのプロモーターに結合して転写を抑制し休眠モードへと移行しはじめ、こうして宴会・飢餓制御が可能になると考える。

5. コールド・ショックへの応答

本当の休眠モードは、低温下に誘導される。熱水チムニーで 100 度以上の高温下に生育するパイロコッカス OT3 も、数週間は冷蔵庫中で生き延びる事ができる。対数増殖中のパイロコッカス OT3 を 30 分間、氷中に置いたところ、細胞内の FL11 分子数が著しく増加し、細胞あたり万のオーダーの FL11 分子が誘導される事が明らかになった。平成 15 年度に FL11 のシリンダー型会合体

の結晶構造を決定した。FL11 二量体各 6 個が一巻きを形成し、結晶の一端から他端まで2mmにわたってシリンダーは続いていた。コールド・ショックによりFL11が高濃度で誘導されれば、このようなシリンダーが細胞内に実際に形成される可能性がある。

パイロコッカス OT3 のゲノム配列の解析により、環状ゲノムの1時半付近に基本転写・翻訳関連遺伝子が集中しており、一方、反対側の 7 時およびその両脇、5 時と 9 時半あたりに FL11 結合配列が集中している事が明らかになった。したがって、コールド・ショックにより、ゲノム DNA の 7 時から 1 時半へと二方向に FL11 の会合が進む可能性がある。3 時半付近に集中する ATP 合成関連遺伝子の転写が停止した後、3 時近辺に位置する *fl1* を経て、一時半へとさらに転写の停止が進み、完全な休眠モードに入ると考えている。

6. DM1 と 2 種リガンドとの複合体構造の解析

リジンが FL11 のリガンドである事実は、偶然に発見されたわけではなく、本年度、別の FFRP、DM1 とリガンド二種の共結晶構造の決定と解析から得られた予想であった。大腸菌で発現した DM1 は、大腸菌細胞からイソロイシンを取り込んでいる。精製法を変えたりアミノ酸を添加したりすると DM1 の会合状態が変わる事に気づき、結局、イソロイシンを取り込んだまま結晶化した DM1 に、セレノメチオニン分子をソーキングしてイソロイシンを置換し、セレン原子からの異常分散を使ってセレノメチオニン共結晶の構造を決定、この位相を使ってイソロイシン複合体の結晶構造をも決定した。イソロイシンもメチオニンも平衡状態では DM1 の会合を安定化するが、解離速度はメチオニン存在下の方が速く、より動的に会合体が形成されている。

二つのリガンド共結晶構造中、リガンドの主骨格は同じように認識されていた。すなわち DM1 二量体 A のアスパラギン酸残基がリガンド N 末端に、また二量体 B のセリンやスレオニン残基がリガンド C 末端に結合していた。したがって、こういったアスパラギン酸やセリン残基を保持する FFRP は、アミノ酸をリガンドとする可能性が高い。イソロイシンの側鎖は疎水性のポケットに収まっていたが、より長いメチオニン側鎖は不自然に折れたたまっており、これが速い解離の原因になっている可能性が高い。ポケットを構成する残基に酸性アミノ酸が多い事から、FL11 のリガンドをリジンあるいはアルギニンと予想し、実験の結果、リジンと判定された。同様の解析から、FL4 のリガンドはグルタミン酸もしくはアスパラギン酸と予想し、グルタミン酸である事が明らかになった。

さらに、DM1 と FL11 が相互作用する事を見出した。相互作用はアルギニン存在下で最安定化し、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニンの存在下でも安定化する。リジンは有意の効果を示さなかった。会合体の分子量は DM1 二量体 2 つと FL11 二量体 2 つから構成されるヘテロ八量体に期待される値に一致し、この解釈に一致する電子顕微鏡像を得た。このヘテロ八量体の形成により、リジンのみが欠乏している時に“溶解”により休眠モードに入るのを防ぐのではないかと考え、実験を続けている。

7. サーモプラズマの好気・嫌気適応を制御する FFRP

サーモプラズマ・ボルカニウムは好気環境下にも嫌気環境下にも生育する好熱性古細菌である。環境変化に応答して ATP 合成等に関与する様々な遺伝子の転写を制御する。サーモプラズマの 6 種の FFRP のうち TvFL1 が好気環境下で発現する事を同定した。一方、TvFL5 の発現は嫌気環

境下で増加する。大腸菌で発現、精製した TvFL1 は八量体を形成するが、 Na_2S を加えて溶液中の酸素濃度を下げると、四量体を経て二量体へと解離する。二量体間に形成されるリガンド結合部位の両側にはヒスチジンやシステインが多く配置されており、各二量体がそれぞれ鉄原子をキレートし、鉄 2 原子間に酸素分子がトラップされるとともに会合度が上昇すると考えている。

8. 古細菌 FFRP の多重リン酸化

対数増殖期のパイロコッカス OT3 細胞からたんぱく質を抽出し、2 次元電気泳動後、抗体を使って FL11 を同定すると、分子量が同じで等電点が異なる数個のスポットに分かれる。これは、FL11 が多重リン酸化のような化学修飾を受けている可能性を強く示唆する。一方、アルカリ性培地内で ATP が合成できなくなった状態の細胞では、単一のスポットしか同定されなかった。

サーモプラズマ細胞から FFRP、TvFL3 を抽出し、トフマス解析により 8 箇所のセリン、スレオニンがリン酸化されている事が明らかになった。8 箇所は全て DNA 結合ドメイン内にあり、会合ドメインはリン酸化されない。8 つのうち 2 つは塩基に接触する DNA 認識ループ内にあり、別のスレオニンは FL11-DNA 共結晶内で DNA リン酸基に結合しているアルギニンの位置にあった。したがって、セリン、スレオニンのリン酸化は、標的 DNA との結合を弱めると考える。

3. 研究実施体制

(1)「鈴木」グループ

①研究者名

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。

(2)「牧野・荒牧」グループ

①研究者名

牧野 耕三(防衛大学校 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. 研究成果の発表等

(1) 特許出願

平成 18年度特許出願:1 件(CREST 研究期間累積件数:1件)