

機能解析第1研究チーム

Functomics Biology I Research Team

チームリーダー 新海 暁男

SHINKAI, Akeo

転写システムは、DNA の遺伝情報が mRNA に読み取られる反応であり、分子生物学のセントラルドグマの最初のステップに相当する。この反応は、全生物に共通して RNA ポリメラーゼによって司られており、転写因子と呼ばれるタンパク質因子によって正あるいは負に調節されている場合もある。我々の研究課題は、分子生物学的、及び、構造生物学的手法を用いた機能未知転写因子の機能発見研究を通し、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株における転写制御ネットワークシステムの全貌を明らかにすることである。*T. thermophilus* HB8 株のゲノムは、およそ 2 Mbp 程度と比較的小さく、転写因子の数も 50 個程度と比較的少ない。さらに、本菌株は進化の起源に近いと考えられていることから、本研究により、より基本的な転写調節機構が明らかになると考えている。さらに、本研究結果は、“一つの細胞内”における転写制御の実態を解析する、分子イメージング解析のための基礎データにもなり得、システム生物学の発展に多大に貢献できると期待している。

1. *T. thermophilus* HB8 株由来転写因子様機能未知タンパク質の機能発見研究 (新海、上利、寺田¹、白水¹)

ゲノム解析の結果、基本的生命現象が進化の過程で濃縮されてきた高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 株には約 50 種類の転写因子が存在することが強く示唆されている。それらの転写因子は、環境変化に適応するためや外部からの刺激に応答するために、直接、或いは、間接的に、全 2,200 遺伝子の発現に関与している。*T. thermophilus* HB8 株には約 500 種類の機能未知遺伝子が残されているので、それらの機能を発見するためにも各転写因子に調節されている遺伝子群の解明が急務である。約 50 種類の転写因子群そのものにも機能未知のものが多く残されている。

そこでまず、転写因子群の中でも、非常に多くの遺伝子を調節するという理由で、「グローバル転写因子」と呼ばれている重要な転写因子群に注目した。グローバル転写因子群の中でも、cyclic AMP (cAMP) レセプタータンパク質 (CRP) ファミリーは多くの微生物に共通な転写因子であるにも関わらず、その役割が不明である。高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 株には、4 つの CRP ファミリー (TTHA1437, TTHA1359, TTHA1567, TTHB099) が存在するが、今年度は、TTHA1437 (ttCRP) 及び TTHA1359 の機能解析を行った。

我々は、DNA マイクロアレイ解析及び *in vitro* 転写実験により、ttCRP タンパク質が cAMP に結合して転写を促進する転写因子であることを見だし、本転写因子に依存して機能するプロモーターを 6 つ同定した。それらのプロモーターの支配下にある遺伝子は、外来 DNA に対する防御装置と推測されている clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated (Cas) タンパク質群、転写因子様タンパク質、exonuclease III 様タンパク質、GCN5-related acetyltransferase ホモログタンパク質、及び、*Thermus* 属に特有の機能未知タンパクをコードしていた。*Cas* 遺伝子群は多くの微生物に存在しているが、CRP が *cas* 遺伝子群の遺伝子発現を調節していることを示したのはこれが初めてである。

TTHA1359 タンパク質は、対数増殖期後期から静止期にかけて発現する転写調節因子である。本タンパク質の X

線結晶構造を 1.5 Å の分解能で解析した結果、本タンパク質の構造は、DNA 結合型である *E. coli* CRP-cAMP 複合体の構造と類似していた (r.m.s.d. = 2.3 Å)。一般に、CRP は cAMP と結合すると構造変化を起こし、DNA 結合型へと変化するが、TTHA1359 タンパク質には cAMP は結合していなかった。次に、TTHA1359 タンパク質の DNA 結合能を、ピアコアを用いて解析した。その結果、興味深いことに、本タンパク質は、*E. coli* CRP が結合するコンセンサス DNA 配列に cAMP 非存在下でも結合した。従って TTHA1359 は、cAMP 非依存的に機能する転写因子であることが強く示唆された。

2. 各種機能未知タンパク質の機能発見へ向けた X 線結晶構造解析 (上利、別所¹、寺田¹、白水¹、竹中²、掘²、新海)

転写因子の標的遺伝子が、アミノ配列からは機能を推定することの困難な、いわゆる機能未知タンパク質をコードしていた場合、転写因子の生理機能を推測することが困難である。我々は、X 線結晶構造を解析することによってそれらの機能未知タンパク質の機能を推測することを試みている。さらに、進化の過程で保存された重要な部分がどこにあるかを探るために、*T. thermophilus* HB8 株のみならず、各種好熱性細菌由来の、転写に関連する各種機能未知タンパク質の構造解析も行った。

T. thermophilus HB8 株由来の転写因子 ttCRP によって発現が調節されている Cas タンパク質群の一つであり、Cse2 ファミリーに属すると考えられている機能未知タンパク質 TTHB189 の X 線結晶構造解析を行った結果、本タンパク質は 9 個のヘリックスから成る、新規構造を有していることが明らかとなった。Cas タンパク質群は外来 DNA に対する防御装置と推測されているがそれらの活性は不明である。

転写因子 TetR ファミリータンパク質は、土壌細菌など、主として変化の著しい環境に生息している細菌に広く分布している転写因子である。本転写因子は、通常は遺伝子発現を抑制しているリプレッサーとして機能しているが、抗生物質などの薬物と結合するとコンフォメーション

変化をおこし、DNA から遊離する。その結果、薬物排出ポンプなどの、薬物耐性に関与する遺伝子が発現する。TetR ホモログの一つである *Aquifex aeolicus* VF5 由来 aq_1058 タンパク質の X 線結晶構造解析を行った結果、本タンパク質は、 α -ヘリックス構造から構成されているホモダイマーであることが明らかとなった。 $\alpha 2$ と $\alpha 3$ は、ヘリックス - ターン - ヘリックスモチーフを構成しているもので、この部分で DNA に結合していると思われる。 $\alpha 5$ - $\alpha 9$ は、薬物などのリガンドと結合するドメインであると思われる。

Sua5-yciO-yrdC ドメインタンパク質スーパーファミリーは、原核生物および真核生物に広く分布する機能未知タンパク質ファミリーで、N 末端 YrdC ドメインと C 末端 Sua5 ドメインとから成る。YrdC ドメインの X 線結晶構造は既に明らかにされており、本ドメインには二本鎖 RNA および DNA に結合することが知られていた。我々は、C 末端 Sua5 ドメインを有する *Sulfolobus tokodaii* Sua5 タンパク質 (ST1526) の X 線結晶構造を解析した結果、N 末端 YrdC ドメインに nucleotide monophosphate 様の低分子が結合していた。一方、Sua5 ドメインはロスマンフォールドを有しており、既知のヌクレオチド結合タンパク質の構造と類似していた。これらの知見をもとに、Sua5 によるヌクレオチド分解活性を測定した結果、Sua5 が ATP を分解し、AMP が生成されるという新たな知見が得られた。

*1 チーム兼務、*2 客員

Our research subject is to elucidate the transcriptional network system, using the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8 as a model organism. The genome size and the number of putative transcriptional regulators of this strain are relatively small, as compared with those of other organisms, and this strain is considered to be close to the origin of life. Therefore, the basic transcriptional regulatory system will be elucidated by this research. Furthermore, this research will contribute to the development of single molecule imaging of transcription in cells and systems biology.

1. Functional identification of putative transcription factors from *T. thermophilus* HB8.

We have primarily focused on cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) family proteins, which are global transcription factors that regulate the transcription of multiple genes. *T. thermophilus* strain HB8 has four CRP family proteins. We have investigated the target genes/operons of one of the family proteins, TTHA1437 (ttCRP), and found six genes/operons comprising clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated (*cas*) ones, and the genes of a putative transcriptional regulator, a protein containing the exonuclease III-like domain of DNA polymerase, a GCN5-related acetyltransferase homolog, and *T. thermophilus*-specific proteins of unknown function. In addition, we determined the X-ray crystal structure of the another CRP family protein, TTHA1359, which is expressed in the stationary growth phase, and found that its structure was similar to the DNA-bound form of the *E. coli* CRP-cAMP complex. In general, CRP undergoes conformational changes upon cAMP binding; however, cAMP was not found in the TTHA1359 protein structure. We found, by means of a

BIACore analysis, that the TTHA1359 protein bound the consensus sequence of *E. coli* CRP, independently of cAMP. Thus, the TTHA1359 protein may be a transcriptional regulator that functions in a cAMP-independent manner.

2. X-ray crystal structures of functionally unknown proteins for function identification.

We determined several X-ray crystal structures of functionally unknown proteins, to speculate about their function and to detect evolutionarily conserved structures. The *T. thermophilus* TTHB189 protein, which belongs to the Cse2 family and is regulated by ttCRP, adopts a novel fold comprising nine α -helices. *Aquifex aeolicus* aq_158, annotated as the TetR transcriptional regulator, is composed of a putative DNA-binding domain and a ligand-binding domain. *Sulfolobus tokodaii* Sua5 protein (ST1526) is composed of an N-terminal YrdC domain and a C-terminal Sua5 domain. We found that the C-terminal domain adopted the Rossmann fold, which is present in several nucleotide-binding proteins. In addition, a nucleotide monophosphate-like molecule was found in the N-terminal domain. Based on these findings, we investigated the hydrolase activity of Sua5, and found that Sua5 exhibited ATP hydrolysis activity, and AMP produced, which is a novel finding for this protein.

Staff

Head

Dr. Akeo SHINKAI

Members

Mr. Yoshihiro AGARI

in collaboration with

Dr. Mikako Shirouzu (Protein Research Group, GSC)

Dr. Takaho Terada (Protein Research Group, GSC)

Dr. Yoshitaka Bessho (Protein Research Group, GSC)

Visiting Members

Dr. Akio Takenaka (Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Inst. Technol.)

Dr. Hiroyuki Hori (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Ehime University)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Nakano N., Okazaki N., Sato S., Takio K., Kuramitsu S., Shinkai A., and Yokoyama S.: "Structure of the Stand-alone RAM-domain Protein from *Thermus thermophilus* HB8", Acta Cryst. F 62, No. 9, pp.855--860 (2006). *

Tanaka T., Sawano M., Ogasahara K., Sakaguchi Y., Bagautdinov B., Katoh E., Kuroishi C., Shinkai A., Yokoyama S., and Yutani K.: "Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150°C", FEBS Lett. 580, 4224--4230 (2006). *

- Okazaki N., Kumei M., Manzoku M., Kuramitsu S., Shirouzu M., Shinkai A., and Yokoyama S.: "Structure of a UPF0150-family Protein from *Thermus thermophilus* HB8", Acta Cryst. F 63, No. 3, pp.173--177 (2007). *
- Kanaujia S. P., Ranjani C. V., Jeyaraman J., Baba S., Chen L., Liu Z., Wang B., Nishida M., Ebihara A., Shinkai A., Kuramitsu S., Shiro Y., Sekar K., and Yokoyama S.: "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of molybdenum-cofactor biosynthesis protein C from *Thermus thermophilus*", Acta Cryst. F 63, 27--29 (2007). *
- Kanaujia S. P., Ranjani C. V., Jeyaraman J., Baba S., Kuroishi C., Ebihara A., Shirouzu M., Kuramitsu S., Shiro Y., Sekar K., and Yokoyama S.: "Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of DHNA synthetase from *Geobacillus kaustophilus*", Acta Cryst. F 63, 103--105 (2007). *
- Shibata R., Bessho Y., Shinkai A., Nishimoto M., Fusatomi E., Terada T., Shirouzu M., and Yokoyama S.: "Crystal structure and RNA-binding analysis of the archaeal transcription factor NusA", Biochem. Biophys. Res. Commun. 355, No. 1, pp.122--128 (2007). *

(総説)

- 海老原 章郎, 新海 暁男, 中川 紀子, 増井 良治, 三木 邦夫, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト: 構造ゲノム科学からシステム生物学へ", 日本結晶学会誌 48, No. 6, pp.403--410 (2006).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Shinkai A., Kashihara A., Kira S., Kuramitsu S., and Yokoyama S.: "Transcriptional activation mediated by a cyclic AMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8", 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June (2006).
- Ogasahara K., Tanaka T., Sawano M., Sakaguchi Y., Bagautdinov B., Katoh E., Kuroishi C., Shinkai A., Yokoyama S., and Yutani K.: "Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150°C", 20th Symposium of The Protein Society and 20th Anniversary Celebration, San Diego, USA, Aug. (2006).
- Shibata R., Bessho Y., Shinkai A., Nishimoto M., Fusatomi E., Terada T., Shirouzu M., and Yokoyama S.: "Crystal structure of the archaeal transcription termination factor NusA", Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).
- Kikuchi K., Kondo H., Juan E., Adachi W., Masui R., Kuramitsu S., Suzuki K., Sekiguchi T., and Takenaka A.: "Structural study on full-size acetyltransferase (E2p) of pyruvate dehydrogenase complex from *Thermus thermophilus*", Joint Conference of the Asian Crystallographic Association and the Crystallographic Society of Japan (AsCA'06/CrSJ), Tsukuba, Nov. (2006).

(国内会議)

- 稲垣 栄二, 坂本 恵子, 大林 尚美, 寺田 貴帆, 白水 美香子, 別所 義隆, 黒石 千寿, 倉光 成紀, 新海 暁男, 横山 茂之: "Crystal Structure of Galactokinase from *Pyrococcus horikoshii*", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).
- 田中 智之, 澤野 雅英, 小笠原 京子, 坂口 安史, Bagautdinov B., 加藤 悦子, 新海 暁男, 横山 茂之, 油谷 克英: "150 近くに変性温度をもつ超安定なCutA1蛋白質の熱

安定化は分子内イオン結合による", 第6回日本蛋白質科学会年会, 京都, 4月 (2006).

- 田中 智之, 澤野 雅英, 竹平 美千代, 小笠原 京子, 坂口 安史, Bagautdinov B., 加藤 悦子, 新海 暁男, 横山 茂之, 油谷 克英: "150 近くに変性温度をもつ超安定なCutA1蛋白質の構造特性", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 阿部 暁美, 吉田 裕美, 神鳥 成弘, 上利 佳弘, 金川 真由美, 倉光 成紀: "高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 TT1324 のX線結晶解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 山田 貢, 吉田 裕美, 神鳥 成弘, 中川 紀子, 上利 佳弘, 金川 真由美, 倉光 成紀: "高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 TT1592 のX線結晶解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 新海 暁男: "Thermus thermophilus HB8株由来の転写因子、cAMPレセプタータンパク質の機能", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 房富 絵美子, 柴田 理恵, 新海 暁男, 西本 まどか, 寺田 貴帆, 白水 美香子, 別所 義隆, 横山 茂之: "古細菌型転写終結因子NusAの結晶構造解析及びRNA結合解析", 理研シンポジウム「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第5回連携研究会, 播磨, 8月 (2006).
- 中川 紀子, 新海 暁男, 海老原 章郎, 増井 良治, 横山 茂之, 倉光 成紀: "高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクトの進捗状況", 第7回極限環境微生物学会年会, 川崎, 11月 (2006).