

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： FFRPたんぱく質群によるDNA・リガンド識別機構の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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 グループリーダー)

主たる共同研究者：

牧野 耕三(防衛大学校応用化学科 教授)(平成15年10月～)

荒牧 弘範(第一薬科大学薬学部 准教授)(平成15年10月～)

3. 研究内容及び成果：

環境変化に対応して変化する能力は、生命を特徴づける重要な特性である。自らを構成する部品(遺伝子)を選択しなおす、生命特有の変化のプロセスが転写調節であり、一群のたんぱく質、すなわち転写因子によって制御されている。古細菌と真正細菌に系統的に分布する、唯一の転写因子群であるFFRP(Feast/Famine Regulatory Proteins)を研究対象とした。地球上に現存する全ての生物の共通祖先(コモノート)はまず、古細菌と真正細菌に分化したと考えられている。したがって、コモノートが持っていた特性は古細菌と真正細菌の共通項に求められるはずである。本研究の結果、FFRPによるDNA認識とリガンド識別の機構が解明され、コモノートが持っていたであろう転写調節機構、すなわち、今や多様化した転写調節機構のプロトタイプ(原型)が明らかになった。

多数の立体構造、FFRP二量体とDNA複合体、FFRP八量体とリガンド・アミノ酸の複合体構造4種、FFRPのシリンダー型会合体構造、さらにはFFRP八量体と120塩基対DNAの複合体の電子顕微鏡三次元再構成像などを決定し、これら立体構造を出発点として、FFRPがDNA、アミノ酸を識別する一般的な機構を解明した。得られた知見を古細菌 *Pyrococcus* OT3 由来のFFRP、FL11に統一的に適用し、さらに、プロモーターの解析による被制御遺伝子の同定といったゲノム配列に基づくアプローチや、イン・ビトロ発現実験等と組み合わせた結果、FL11が *P. OT3* の増殖を饗宴・飢餓制御(Feast Famine Regulation)する機構が明らかになった。FL11は細胞あたり千分子のオーダーで存在し、リジン濃度で外界の栄養状況を検知して、栄養状況に対応して全転写ユニットの20%以上の転写を促進あるいは抑制する(饗宴・飢餓制御)。このFL11による制御と大腸菌のFFRP、Lrpによる代謝制御に多くの共通点がみられることから、共通祖先細胞(コモノート)においても、アミノ酸濃度で栄養状態を検知しながら、多数の遺伝子をFFRPが制御したであろう事を結論した。

### 鈴木グループ

古細菌FFRPに関する研究を分担し、上記の成果を達成する主力となった。立体構造決定及びFL11による饗宴・飢餓制御以外の成果をいくつか以下に記す。

#### 1. セレックス法に基づくFFRPのDNA認識コードの解明

セレックス法を開発、適用して、各種FFRPが最も強く結合するDNA配列を決定し、いずれの配列も **abcdeWWWedcba**形式に合致する事を結論した(WはAもしくはT、**edcba**は**abcde**と相補的な5塩基配列)。DNA結合ドメインのアミノ酸残基を置換したFFRPを設計してDNA結合特性の変化を解析するとともに、FL11の会合ドメインに他種FFRPのDNA結合ドメインを繋いだキメラ分子を設計して大きな会合体を形成するため扱いが困難なFFRPのDNA結合特性を決定した。これらの実験結果をFL11二量体と標的DNAの共結晶構造に照らして解析した結果、様々なFFRPが共通の結合モードでDNAを識別すること、アミノ酸残基を置換す

るとこの結合モードから予想されるようにDNA結合特性が変化することを結論した。こうして、相互作用の際のFFRPアミノ酸残基とDNA塩基の対応の概略(DNA認識コード)を解明した。

## 2. 多角度光散乱計測に基づくFFRPのリガンド識別機構の解明

HPLCと直結した多角度光散乱計測により、各種FFRPの会合度を測定し、リガンド・アミノ酸の種類と、アミノ酸依存的な会合の変化を解析した。この結果、イソロイシン、フェニルアラニン、リジン、グルタミン、グルタミン酸等様々なアミノ酸をリガンドとするFFRPの存在が明らかになった。FFRPとアミノ酸の相互作用は多くの研究者により議論されてきたが、本研究以外には、Lrpがロイシン存在下に十六量体から八量体へと変化することしか明確になっていない。実験結果をFL11とリジン/アルギニン、DM1とイソロイシン/メチオニンの共結晶構造に照らして解析し、アミノ酸をリガンドとするFFRPが共通して特定の位置にアスパラギン酸/アスパラギン(アミノ酸N端に結合)とスレオニン/セリン(アミノ酸C端に結合)を持つことを結論した。さらに、アミノ酸側鎖を取り囲む位置に配置された残基の種類をもとにアミノ酸配列からリガンド・アミノ酸の種類を特定できることを明らかにした。

## 3. 古細菌の好気・嫌気適応とFFRP

*Thermoplasma volcanium* は好气的環境にも嫌气的環境にも生育できる古細菌である。前者では活性酸素を除去する酵素群が、後者では嫌气的にATPを合成する酵素群が生合成されることを明らかにした。さらに、六つのFFRPのうち、TvFL1が好气的環境特異的に転写されることを明らかにした。TvFL1は酸素存在下では八量体を形成するが、酸素がないと二量体へと解離する。TvFL1のリガンド結合部位付近にヒスチジン残基やシステイン残基が多く、これらの残基で鉄あるいは銅のような金属に結合し、金属原子の間に酸素分子が結合する可能性がある。

## 4. セリン・スレオニン残基のリン酸化を介した転写調節

*T. volcanium* 細胞から抽出したFFRP、TvFL3をLC-MS/MS解析し、9ヶ所のセリン/スレオニン残基がリン酸化されている事を結論した。このうち 8 残基はDNA結合ドメイン内のDNA塩基やリン酸基に結合する位置にあり、そのリン酸化はTvFL3のDNA結合を弱めると予想される。第9のリン酸化は会合ドメイン内の二つのスレオニンのどちらかでおけると結論された。二つはともにリガンドであるリジンのC末端に結合する位置にあり、そのリン酸化はリガンドとの相互作用、さらにはTvFL3の会合を阻害すると予想される。こうして、真核生物に多く見られる転写因子セリン/スレオニン残基のリン酸化による転写調節の起源が古細菌に遡る事が明らかになった。

## 牧野・荒牧グループ

病原性大腸菌O157株と日和見病原性の緑膿菌を対象として真正細菌のFFRPが病原性に関与する事を明らかにした。大腸菌FFRP(Lrp、AsnC、YbaO)が制御するプロモーターをO157株ゲノムの中に検出するシステムを構築・適用して、志賀毒素(感染患者のリボゾームを切断する)の遺伝子の転写をLrpが制御(ロイシン依存性に抑制)することを明らかにした。また、緑膿菌FFRP8種がピオシアニン色素の生合成を調節することを明らかにした。ピオシアニンは宿主ミトコンドリアの呼吸を阻害する毒物で、緑膿菌細胞数が増加して感染性が高まったときに特異的に合成される。さらに、ピオシアニン系色素存在下にアミノ酸依存性のFFRP会合が抑制あるいは促進される(ピオシアニン系色素によりFFRPのアミノ酸感受性が変化する)ことが明らかになった。ピオシアニン色素と緑膿菌FFRPの相互作用を出発点として、様々な有機化合物がFFRPに作用してその会合を変化させることを明らかにした。多様な有機化合物プールと標的病原菌を持つ企業との協力により、創薬と治療へのさらなる発展が期待される。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

発表論文28報、口頭発表33件、特許出願:国内1件、海外1件。

(平成20年12月18日現在)

研究成果のレベルは質、量ともに高い。代表論文は以下である。

##### 1. Yokoyama K. et al. (2007) *Structure* 15, 1542-1554.

FFRPと標的DNAとの共結晶構造を報告。ループ部を中心とする6残基がTGAAAWWWTTTCA配列両端の5塩基対を認識する機構を明らかにした。このDNA結合特性をもとに、古細菌*Pyrococcus* OT3の増殖を、FL11が饑餓・飢餓制御する機構を解明・報告した。FL11-100塩基対DNA複合体構造の電子顕微鏡三次元再構成、TvFL3のリン酸化も報告している。

##### 2. Okamura H. et al. (2007) *Structure* 15, 1325-1338.

FFRPのリガンド・アミノ酸識別機構を報告。*Pyrococcus* OT3由来のFFRP、DM1とイソロイシン/セレノメチオニンの共結晶構造を決定。さらに、FL11やFL4など各種FFRPのリガンドの種類と会合変化を報告。アミノ酸配列からアミノ酸をリガンドとするFFRPを特定し、リガンド・アミノ酸の種類を推定できることを明らかにした。さらにアルギニン存在下にDM1とFL11がヘテロ八量体を形成することを報告。これは、異種FFRP会合の初めての報告。

##### 3. Koike H. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2840-2845.

FL11のシリンダー型立体構造(二量体六つが1巻きを形成、2mmまで伸展する)を報告。同一FFRPが異なる会合体を形成することを明らかにし、その生物学的意義を議論。

特許に関しては、5年間で国内1件、海外1件とまずまず順調な出願状況といえる。基盤的な研究で、特許に関しては、一寸難しいテーマかもしれないので知財に関する特別な視点を持たないと出願できないと思われる、その点を評価したい。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

独自の発想に基づいて研究を展開し、古細菌と真正細菌に系統的に分布するFFRPの転写制御機構の全容を解明した。構造生物学的アプローチとゲノム生物学的アプローチを融合し、ポストゲノム研究を目指した当該研究領域の趣旨によく適合する研究を展開した。この結果、提案した目標の殆どを達成し、さらに、コモノートの転写調節機構、すなわち、転写調節機構のプロトタイプ(原型)を解明したことの意義は大きい。その成果は独創性が高く、比較生化学や進化生物学など多方面に及ぶインパクトを持つ。今後、原型が持っていた変化の可能性と変遷の歴史から転写調節機構を捉えなおす展開が期待される。

また、病原性大腸菌や日和見感染菌である緑膿菌におけるFFRPの転写調節を研究し、FFRPが病原性と深く関係することを明らかにした。FFRPの一つ、Lrpが病原性大腸菌の病因である志賀毒素遺伝子の転写を調節することを明らかにするとともに、様々な有機化合物がFFRPに作用するとの知見を得たことは、感染患者への有効な治療法へと発展する可能性がある。

##### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

Yokoyama K. et al. (2007)の発表に際して、日本経済新聞など3紙が「代謝の仕組み原型解明」等の記事を掲載した。

以上