

平成21年6月22日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18370073

研究課題名（和文） 転写制御蛋白質による転写終結領域の構造変化と機能解析

研究課題名（英文） Structural change and functional analysis of HutP-mediated anti-termination

研究代表者 Penmetcha Kumar

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80357938

研究成果の概要：

転写制御蛋白質 HutP と標的 RNA 複合体のX線解析を行った。その結果、HutP は6量体を形成していること、HutP は6量体の両面で、RNA の2個所のUAG 繰り返し配列と結合していた。生化学的実験においても、UAG 繰り返し配列の重要性が明らかにされた。また、*in vivo* 実験により、活性発現が HutP により誘導された。以上より、HutP はUAG 繰り返し配列と結合し、RNA をステムループから3角形様構造に変化させるすることによって、転写終結解除する機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5200000	1560000	6760000
2007年度	5000000	1500000	6500000
2008年度	4900000	1470000	6370000
年度			
年度			
総計	15100000	4530000	19630000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：核酸、生体分子、蛋白質、発現制御

## 1. 研究開始当初の背景

枯草菌の転写制御タンパク質HutPは、mRNAの転写制御領域の構造を変化させることで転写終結を解除する。逆に、転写制御タンパク質TRAPの場合は転写を終結に導く。このアンチターミネーションあるいは後者

のアテニュエーション（ターミネーション）とよばれる仕組みは、Stanford大学のYanofskyのレビューにあるように巧妙な分子機構で説明されているが、仮説や未解明な部分も多く、今後の発展が期待されている。我々は、Oda等により発見されたHutPを用いて、

アンチターミネーション機構の解明をめざし、構造生物学的及び生化学的研究を行ってきた。その成果は、Natureはじめ主要雑誌に報告してきた。

## 2. 研究の目的

枯草菌は、栄養が足りなくなるとL-ヒスチジンを分解して、生じた窒素、炭素をエネルギー源として利用する仕組みをもっている。L-ヒスチジン分解系オペロンは、L-ヒスチジン分解酵素をコードする遺伝子群と、その転写を制御する遺伝子からなる。上流の転写制御遺伝子と下流のL-ヒスチジン分解酵素遺伝子群との間に、ステムループからなる2次構造が存在する(図1上)。通常状態ではL-ヒスチジン分解酵素は発現しないが、これはステムループがターミネーターとして働いていて、L-ヒスチジン分解酵素遺伝子群の手前で転写が終結するためである。栄養飢餓になると、L-ヒスチジンにより活性化された転写制御タンパク質HutPがステムループあるいはその周辺の標的配列と特異的に結合し、ステムループ構造を大きく変化させる。これによって、ターミネーターとして機能していた領域がアンチターミネーターに変換され、RNAポリメラーゼによって下流に続くL-ヒスチジン分解酵素遺伝子群の転写が行われる。我々は、今までの研究から、HutPは6量体を形成していること、リガンドのL-ヒスチジン及びMg<sup>2+</sup>イオンによりHutPは活性化され、構造変化をひきおこすこと、これによってRNA標的配列(UAGの繰り返し配列)と特異的に結合すること、結合部位はHutP6量体の上面と下面の2箇所存在すること等が明らかになっている。この結合の様子はX線構造解析から解明されたものであるが、RNAの材料としては、UAGの繰り返し配列を含む21-mer RNAを使用し

ている。従って、HutP6量体に対し2分子の21-mer RNAが結合している。しかし、実際には、転写制御遺伝子のストップコドンから分解酵素遺伝子群の開始コドンに至るnon-coding領域のRNA配列(残基番号+489~+600)を用いての結合実験では、HutP6量体に対し1分子のRNAが結合していることが判明した。non-coding領域のRNA配列には、UAG繰り返し配列が2箇所存在する(図1上)ことから、おそらくHutP6量体はこの2箇所で結合すると考えられる。この結合によって、non-coding領域の中心的構造をなしていたステムループ構造は壊れ、すなわち巻き戻されることになり、この結果、ターミネーターがアンチターミネーターに変換されるものと考えられる。本研究課題では、これを実証するために、2箇所のUAG繰り返し配列を含むRNAとHutPとの複合体(L-ヒスチジンとMg<sup>2+</sup>イオンを含む)のX線解析を行い、RNA結合部位及び結合時の構造変化を明らかにする。さらに生化学的手法を取り入れて、HutPとmRNAと間の相互作用部位をマッピングし機能解析を行うことである。これらの実験結果を基にして、HutPによるアンチターミネーション機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

X線解析法と生化学的手法の2本立てで実験を行う。UAG繰り返し配列2箇所を含む55mer-RNA(図1下)の合成を行い、この55mer-RNAを用いてHutP-L-histidine-RNA-Mg<sup>2+</sup>イオン複合体を結晶化し、X線解析法によりその立体構造を明らかにする。一方、HutPとmRNAと間の相互作用部位のマッピングに関しては、in-line-mapping法を用い、HutPとの結合がある場合と無い場合での開裂個所を解析し、



この結果、HUTPN1株では、塩基置換する/しないにかかわらず活性は見られず、1A1株においては、塩基置換のないものは、活性があり、塩基置換のあるものは活性がないことが明らかになった。以上より、UAG 繰り返し配列 (site I と site II) の HutP への結合は、mRNA の安定なステムループ構造から不安定な構造への変化を可能にし、アンチターミネーションを引き起こす重要なステップであることが明らかになった。

(3)連携研究者  
Subash C.B. Gopinath

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Subash C.B. Gopinath, B. Dhakshnamoorthy, T.S. Kumarevel, Tomoko S. Misono, H. Mizuno and Penmetcha K.R. Kumar (2008). Insights into antitermination regulation of *hut* operon in *Bacillus subtilis*: importance of dual RNA-binding surfaces of HutP., ***Nucleic Acids Res.***, 36, 3463-3473.

[学会発表] (計 1 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし。

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

**Penmetcha Kumar**

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80357938

(2)研究分担者

なし