

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22510208

研究課題名（和文）mRNA 発現解析に基づいた、機能未知遺伝子の分類

研究課題名（英文）Classification of functionally unknown genes based on their transcriptional regulation

研究代表者

新海 暁男（SHINKAI AKEO）

独立行政法人理化学研究所・機能解析第 1 研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10391989

研究成果の概要（和文）：DNA 上の遺伝情報が mRNA へと写し取られる転写反応は、転写因子と呼ばれる蛋白質によって制御されている場合があり、多くの場合、関連する機能を持つ遺伝子群は同じ転写因子の制御下にある。そこで我々は、機能未知遺伝子の機能を推測するために、*Thermus thermophilus* HB8 株をモデル生物として用い、機能既知遺伝子と同時に転写制御されている機能未知遺伝子を探索した。その結果、4 つの新規転写因子に制御されている合計 6 つの機能未知遺伝子を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：In order to find a clue to identify the function of the functionally unknown genes, we categorized them based on their transcriptional regulation, using *Thermus thermophilus* HB8 as a model organism. Genetic information in DNA is transcribed to mRNA, which is often regulated by protein called transcription factor. In many cases, the transcription reaction of several genes sharing similar cellular functions is simultaneously regulated by a transcription factor. Here, we investigated the function of four novel transcription factors, and identified six functionally unknown genes which were transcriptionally regulated together with functionally identified genes. This study may lead to identify the function of the functionally unknown genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	0	0	0
2009 年度	0	0	0
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：遺伝子発現調節、X 線結晶構造、機能発見、高度好熱菌、*Thermus thermophilus*、蛋白質、TetR ファミリー、転写因子

1. 研究開始当初の背景

構造・機能ゲノム科学の発展により、ゲノム配列や蛋白質の立体構造の情報が大量に

蓄積している今日においてもなお、微生物から高等生物に至るまで、1 つの生物のゲノムの約 30%は、機能の推定すら困難な、いわゆ

る機能未知遺伝子（蛋白質）である。これらの機能を解明することは、生命現象を理解するために重要な課題であるが、解明の手がかりが乏しいために困難である。一方、あらゆる生命現象をシステムとして理解する学問であるシステム生物学のための格好のモデル生物として、遺伝子数が約 2,200 個と比較的少ない高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株が注目されていた。

2. 研究の目的

DNA 上の遺伝情報は、先ず、mRNA へと転写される。この転写反応は、転写因子と呼ばれる蛋白質によって正または負に調節されている場合がある。多くの場合、ある 1 つの転写因子によって制御されている遺伝子群の機能は関連している場合が多いので、機能未知遺伝子の機能を、同時に制御されている機能既知遺伝子の機能から推測できる可能性がある。本研究課題の目的は、遺伝子数、転写因子数共に比較的少ない *T. thermophilus* HB8 株をモデル生物として用い、転写制御の観点から機能未知遺伝子を分類し、機能未知遺伝子の機能発見の手がかりを得ることである。

ゲノム解析の結果、*T. thermophilus* HB8 株は約 2,200 個の遺伝子に対して、約 70 個の転写因子を持っていると予想されているが、機能が明らかにされている転写因子は十数種類に過ぎなかった。そこで我々は、残された全ての転写因子の機能を解明することを目指している。本研究課題では、特に、数多くの遺伝子を標的としている、いわゆるグローバル転写因子の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

機能を解析する転写因子の遺伝子破壊株を作製し、本変異株における全 mRNA の発現を、DNA マイクロアレイを用いて野生株の場合と比較し、発現が変動した遺伝子とその転写因子の標的遺伝子候補とした。或いは、ゲノミックセレクトクス法によって、転写因子と結合する DNA 断片を *T. thermophilus* のゲノムより単離し、その転写因子の標的配列候補とした。これらの標的遺伝子候補の中から、転写因子と DNA との結合実験や、*in vitro* 転写実験によって、転写因子の標的遺伝子を絞り込み、転写因子が認識する塩基配列を同定した。標的遺伝子産物の機能は、そのアミノ酸配列、或いは、立体構造から予測した。そして、同じ転写因子によって調節されている機能未知遺伝子もそれらと関連した機能を持つと予想した。さらに、可能なものについては、転写因子に結合し、その活性を調節す

る低分子化合物（リガンド）を同定し、標的遺伝子産物の機能予測の一助とした。さらに、転写因子の立体構造を X 線結晶構造解析によって決定するか、或いは、ホモロジーモデルを構築し、転写因子の作用機作を考察した。

尚、本研究においては、COG (Clusters of Orthologous Group) [Tatusov *et al.* (1997) *Science* 278, 631-637.] による遺伝子の分類によって、カテゴリー code S (functionally unknown) に分類される遺伝子、及び、何れのカテゴリーにも分類されない遺伝子を機能未知遺伝子とした。

4. 研究成果

CRP/FNR ファミリー転写因子、及び、TetR ファミリー転写因子は、細菌において、数多くの遺伝子を標的としているグローバル転写因子である。ゲノム解析の結果、*T. thermophilus* HB8 株は、CRP/FNR ファミリー転写因子と TetR ファミリー転写因子をそれぞれ 4 つ持っていることが明らかとなっていた。我々は、これまで 2 つの CRP/FNR ファミリー転写因子の機能を明らかにしてきた。本研究課題では、本菌株が持つ 4 つ全ての TetR ファミリー転写因子；TTHA0101 (FadR)、TTHA0973 (PaaR)、TTHB023 (PfmR)、TTHA0167 (SbtR) の機能を明らかにすることができた。これらの TetR ファミリー転写因子は、全て、標的遺伝子の発現を負に調節するリプレッサーであった。FadR は脂肪酸の分解に関連している 21 個の遺伝子（機能未知遺伝子 2 個を含む）を、PaaR はフェニル酢酸の分解に関連している 11 個の遺伝子（機能未知遺伝子 2 個を含む）を、PfmR は脂肪酸代謝とフェニル酢酸の分解に関連している 8 個の遺伝子（機能未知遺伝子は含まない）を、SbtR はトランスポーター、及び、糖・アミノ酸・核酸の代謝に関連している 10 個の遺伝子（機能未知遺伝子 2 個を含む）を、標的としていた。興味深いことに、PfmR が結合する塩基配列は、PaaR が結合する塩基配列と類似しており、PfmR と PaaR は、*in vitro* で、それぞれの標的遺伝子に対して互いに弱い負の転写調節活性を示した。

以上の結果、これまでに得られていた知見と合わせると、*T. thermophilus* HB8 株が持つ約 70 個の転写因子のうち、20 個の転写因子の機能が明らかになった。そして、本菌株の全遺伝子約 2,200 個のうち、30 個の機能未知遺伝子を含む 117 個の遺伝子を、転写制御の観点から分類できたことになる。今後は、各分野の専門家によって、我々が分類した機能未知遺伝子（蛋白質）の機能が解明されることを期待している。

一方、我々は、各転写因子の作用機作を考察するために、各転写因子の立体構造を解析

した。FadR、PfmR、及び、SbtR の場合は X 線結晶構造を決定し、PaaR の場合はホモロジーモデルを構築した。その結果、何れの転写因子も、典型的な TetR ファミリー転写因子と同様に、N 末端側に塩基性アミノ酸に富んだ DNA 結合ドメインを持つ二量体を形成していた。FadR 分子の中央部にはラウロイル (C12)-CoA が結合していた。FadR は、中鎖或いは長鎖脂肪酸 (C10~C18) -CoA の存在下ではリプレッサーとしての機能を失ったので、今回決定した構造は DNA 非結合型であると考えている。すなわち、FadR は、中鎖或いは長鎖脂肪酸の代謝中間体である脂肪酸-CoA が結合すると DNA 結合能を失い、その結果標的遺伝子群が発現し、脂肪酸の分解が促進されると考えられる。PaaR は、フェニル酢酸の代謝中間体であるフェニルアセチル-CoA の存在下では DNA 結合能を失った。したがって、PaaR がリガンド；フェニルアセチル-CoA と結合すると標的遺伝子群が発現し、フェニル酢酸の分解が促進されると考えられる。PaaR 分子の中央部にも、リガンドが結合する可能性のある特徴的な構造が見つかった。PfmR 分子、及び、SbtR 分子の中央部にもリガンド結合部位と思われる特徴的な構造が見つかったが、これらに結合するリガンドを同定することはできなかった。興味深いことに、SbtR 分子に分子間ジスルフィド (S-S) 結合が形成されていた。この S-S 結合は二量体化には寄与していないが、蛋白質の熱安定性に寄与していることが明らかとなった。この S-S 結合は、リガンドが結合する可能性のある部位の近傍に存在しているので、細胞内の酸化・還元状態に応じて S-S 結合の形成・切断が起こり、これがリガンドとの結合を制御している可能性もある。

本研究によって、1 つの菌株が持つ全種類の TetR ファミリー転写因子の構造、機能、及び、作用機作が明らかになったことで、6 つの機能未知遺伝子を転写調節の観点から分類できただけでなく、本ファミリー転写因子の分子系統解析や分子進化解析のための知見を提供することもできたと考えている。

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 4 件)

- ① Agari Y, Sakamoto K, Yutani K, Kuramitsu S, Shinkai A. (2013) Structure and function of a TetR family transcriptional regulator, SbtR, from *Thermus thermophilus* HB8. *Proteins*, in press. (doi: 10.1002/prot.24266) (査読有り)

- ② Agari Y, Sakamoto K, Kuramitsu S, Shinkai A. (2012) Transcriptional repression mediated by a TetR family protein, PfmR, from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.*, 194(17), 4630-4641. (doi:10.1128/JB.00668-12) (査読有り)
- ③ Sakamoto K, Agari Y, Kuramitsu S, Shinkai A. (2011) Phenylacetyl-coenzyme A is an effector molecule of TetR family transcriptional repressor PaaR from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.*, 193(17) 4388-4395. (doi:10.1128/JB.05203-11) (査読有り)
- ④ Agari Y, Agari K, Sakamoto K, Kuramitsu S, Shinkai A. (2011) TetR family transcriptional repressor *Thermus thermophilus* FadR controls fatty acid degradation. *Microbiology*, 157(Pt 6), 1589-1601. (doi:10.1099/mic.0.048017-0) (査読有り)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 新海暁男：“高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株における転写因子の機能解析と機能未知遺伝子の分類” 第 13 回日本蛋白質科学会年会 (2013 年 6 月 13 日、とりぎん文化会館、鳥取)
- ② 坂本恵子、上利佳弘、倉光成紀、新海暁男：“分子間ジスルフィド結合を持つ *Thermus thermophilus* HB8 由来 TetR ファミリー転写因子 TTHA0167 の構造と機能” 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡、福岡)
- ③ 上利佳弘、坂本恵子、倉光成紀、新海暁男：“*Thermus thermophilus* HB8 由来 TetR ファミリー転写調節因子 PfmR による転写抑制” 第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡、福岡)
- ④ 新海暁男：“Functional identification of transcriptional regulators from *T. thermophilus* HB8” 第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会 (2012 年 9 月 29 日、SPRING-8、兵庫)
- ⑤ 上利佳弘、坂本恵子、新海暁男：“Structural and functional analysis of TetR family transcriptional regulator PfmR from *Thermus thermophilus* HB8 “第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会 (2012 年 9 月 29 日、SPRING-8、兵庫)
- ⑥ 坂本恵子、上利佳弘、新海暁男：“Structural and functional analysis of TetR family transcriptional regulator TTHA0167 from *T.*

- thermophilus* HB8” 第 2 回モデル生物丸ごと一匹学会 (2012 年 9 月 29 日、SPring-8、兵庫)
- ⑦ 坂本恵子、上利佳弘、倉光成紀、新海暁男：“*Thermus thermophilus* PaaR, a TetR family transcriptional repressor, is involved in phenylacetic acid degradation” 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜、横浜)
- ⑧ 新海暁男、上利佳弘、坂本恵子：“高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株をモデル生物とし、転写制御の観点から機能未知遺伝子を分類する：転写因子の機能発見研究と機能未知遺伝子の分類” 第 84 回日本生化学大会 (2011 年 9 月 23 日、京都国際会館、京都)
- ⑨ 新海暁男、上利佳弘、坂本恵子：“Study of transcriptional regulatory system of *T. thermophilus* HB8: Structure and function of two TetR family proteins” 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会 (2011 年 8 月 20 日、SPring-8、兵庫)
- ⑩ 坂本恵子、上利佳弘、倉光成紀、新海暁男：“Functional and structural characterization of the TetR family transcriptional repressor PaaR from *Thermus thermophilus* HB8” 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会 (2011 年 8 月 20 日、SPring-8、兵庫)
- ⑪ Shinkai A, Bessho Y, Agari Y, Iino H, Fukui K, Kitamura A, Sakamoto K, Kim K, Masui R, Yokoyama S, Kuramitsu S. “Structural and functional genomics of a model organism *Thermus thermophilus* HB8: toward functional discovery of functionally unknown proteins” International Conference on Structural Genomics (2011 年 5 月 13 日、Chestnut Conference Centre、トロント、カナダ)
- ⑫ 上利佳弘、上利和子、坂本恵子、倉光成紀、新海暁男：“脂肪酸の分解を制御する、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 TetR ファミリー転写因子 FadR の構造と機能” BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) (2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド、神戸)

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新海 暁男 (SHINKAI AKEO)
独立行政法人理化学研究所・機能解析第 1
研究チーム・チームリーダー
研究者番号：10391989

(2) 研究分担者

該当なし
研究者番号：

(3) 連携研究者

上利 佳弘 (AGARI YOSHIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・機能解析第 1
研究チーム・特別研究員
研究者番号：50469889