

機能未知タンパク質の機能発見に向けて：

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 における転写制御メカニズムの研究

Toward functional identification of functionally unknown proteins：

Study of transcriptional regulatory network system of *T. thermophilus* HB8 strain

新海暁男

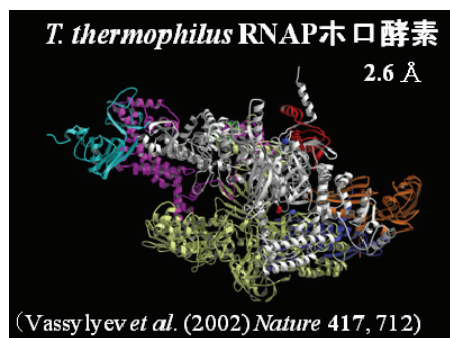
Akeo Shinkai

(理研 播磨研 放射光科学総合研究センター)

(RIKEN SPring-8 Center, Harima Inst.)

e-mail: ashinkai@spring8.or.jp

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 (RNAP) によって司られている。細菌由来の RNAP は、 $\alpha_2\beta'\omega$ サブユニットから成るコア酵素と、コア酵素に σ 因子が結合したホロ酵素の二つの形態で存在している。これらのうち、ホロ酵素のみが、プロモーターと呼ばれる、遺伝子上流に位置する特徴的な部分に結合し、転写を開始できる。転写がある程度進行して σ 因子が遊離した

後は、コア酵素が転写反応を司り、ターミネーターと呼ばれる特徴的な部分で反応を終結させる(図1)。転写は、環境の変化や外部の刺激に応答する際に、各種の σ 因子や、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。

T. thermophilus HB8 株のゲノム長、遺伝子数は、ともに、モデル生物として長年研究されてきている大腸菌や枯草菌の 1/2 程度 (2.1 Mb, 2,200 個) であり、転写因子数も 1/6 程度 (60~70 種類) と予想されている。従って、本菌株は、基本的な転写調節機構を持つ、転写研究の格好のモデル生物である。本菌株の転写因子様蛋白質の多くは機能未知である。我々は、分子生

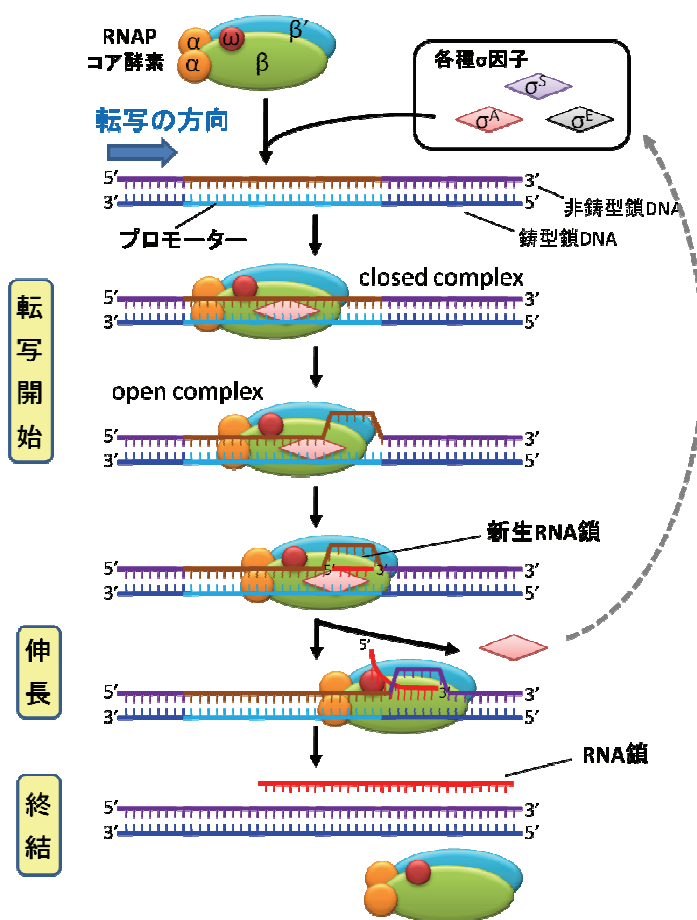


図1. 細菌における転写反応

物学的、構造生物学的手法を用い、それら転写因子様蛋白質の機能発見研究を通し、転写制御システムの全貌をイメージすることを目指している。その中でも特に、数多くの遺伝子を調節するグローバル転写因子を中心に解析を進めている。一般に、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性があるので、本研究は、本菌株に残されている推定約 500 種類の機能未知遺伝子 (Clusters of Orthologous Group of proteins; COGs で分類できない 434 個の遺伝子) を分類する手がかりを得ることにも貢献できると考えている。

今回の発表では、6 つの転写因子の機能解析の結果から機能未知遺伝子 20 個を含む合計 70 個の遺伝子を分類した例、及び、薬剤処理やファージ感染による転写プロファイルの変化から機能未知遺伝子を分類した例を紹介する。

References

Shinkai A, Kira S, Nakagawa N, Kashihara A, Kuramitsu S, and Yokoyama S (2007) Transcription activation mediated by a cyclic AMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 189, 3891-3901.

Shinkai A, Ohbayashi N, Terada T, Shirouzu M, Kuramitsu S, and Yokoyama S (2007) Identification of promoters recognized by RNA polymerase- σ^E holoenzyme from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 189, 8758-8764.

Agari Y, Kashihara A, Yokoyama S, Kuramitsu S, and Shinkai A (2008) Global gene expression mediated by *Thermus thermophilus* SdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 70, 60-75.

Sakamoto K, Agari Y, Yokoyama S, Kuramitsu S, and Shinkai A (2008) Functional identification of an anti- σ^E factor from *Thermus thermophilus* HB8. *Gene* 423, 153-159.

Agari Y, Yokoyama S, Kuramitsu S, and Shinkai A (2008) X-ray crystal structure of a CRISPR-associated protein, Cse2, from *Thermus thermophilus* HB8. *Proteins* 73, 1063-1067.

Sakamoto K, Agari Y, Agari K, Yokoyama S, Kuramitsu S, and Shinkai A (2009) X-ray crystal structure of a CRISPR-associated RAMP superfamily protein, Cmr5, from *Thermus thermophilus* HB8. *Proteins* 75, 528-532.

表 1. *T. thermophilus* HB8 株由来 σ 因子、転写因子、及び、転写因子様タンパク質

Gene name	Protein name (containing hypothetical)	Structure (yellow is that of a homolog)		Target gene	Note	Reference
		PDB ID	identity of amino acid sequence (%)			
TTHA0020	response regulator	1YS7	43.89			
TTHA0057	nitrogen regulatory protein P-II	1VFF	100			Sakai <i>et al.</i> (2005) <i>J. Struct. Biol.</i> 149 , 99-110.
TTHA0058	transcriptional repressor of class I heat-shock genes	1STZ	29.97			
TTHA0101	transcriptional repressor, TetR family			TTHA0400-0401, TTHA0604, TTHA0846, TTHA0890-0891-0892, TTHA1117, TTHA1144-1145-1146, TTHA1463, TTHB012-013-014-015-016-017	This study	Manuscript in preparation.
TTHA0123	transcriptional regulator, LysR family	1I6A	33.82			
TTHA0143	phosphate transport system regulatory protein PhoU	1T8B	44.29			
TTHA0145	phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	2OQR	42.17			
TTHA0167	transcriptional regulator (TetR/AcrR family)	1V10	26.97			
TTHA0168	hypothetical protein (transcriptional regulator ?)	2EYQ	28.57			
TTHA0186	probable transcriptional regulator	2H9B	36.33			
TTHA0225	biotin operon repressor/biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase	2CGH	37.71			
TTHA0248	transcription antitermination protein NusG	1NZ8	100	none (It binds RNAP.)	anti-termination, (Solution structure)	Reay <i>et al.</i> (2004) <i>Proteins</i> 56 , 40-51.
TTHA0255	ferric uptake regulatory protein	2RGV	35.07			
TTHA0344	ferric uptake regulatory protein	2RGV	32.79			
TTHA0455	rrf2 family protein, transcriptional regulator	1ICH	24.64			
TTHA0483	probable transcriptional regulator, ArsR family	2GLU	41.3			
TTHA0507	transcriptional regulator	1MKM	31.45			
TTHA0508	transcriptional regulator, MerR family	2ZHH	30.34			
TTHA0532	RNA polymerase σ^A factor	3DXJ	100	housekeeping genes	Structure of RNAP holo enzyme	Vassilyev <i>et al.</i> (2002) <i>Nature</i> 417 , 712-719.
TTHA0622	transcription elongation factor GreA	2FZ3	40.65	none (It binds RNAP.)	stimulate nuclease activity	Symersky <i>et al.</i> (2006) <i>J. Biol. Chem.</i> 281 , 1309-1312.
TTHA0655	probable transcriptional regulator	2P4W	34.03		Its expression is regulate by SdrP (TTHA1359).	
TTHA0689	putative xylose repressor [C-terminal] (Mlc)	2QM1	29.8	TTHA0689-0688-0687-0686	It binds glucose.	Chevance <i>et al.</i> (2006) <i>J. Bacteriol.</i> 188 , 6561-6541.
TTHA0701	N utilization substance protein A (NusA)	1L2F	45.82	none (It binds RNAP.)	termination, anti-termination	
TTHA0705	transcriptional repressor SmtB	1SMT	48.11			
TTHA0733	transcriptional regulator MarR family	1S3J	31.5			
TTHA0754	transcriptional repressor	1U8R	37.89			
TTHA0783	PyR bifunctional protein [pyrimidine operon regulatory protein/uracil phosphoribosyltransferase]	1UFR	100			
TTHA0807	transcriptional regulator	2H0A	100			
TTHA0814	putative response regulator	2OQR	42.74			
TTHA0889	transcription-repair coupling factor	2EYQ	48.83			
TTHA0973	transcriptional regulator, TetR family	3DCF	34.97			
TTHA0995	response regulator	1YS7	43.33			
TTHA1002	response regulator	1KGS	36.82			
TTHA1030	response regulator	1RNL	35.35			
TTHA1042	anti-cleavage anti-GreA transcription factor Gfh1	2EUL	100	none (It binds RNAP.)	repress GreA function	Perederina <i>et al.</i> (2006) <i>Acta</i> F62 , 44-46; Symersky <i>et al.</i> (2006) <i>J. Biol. Chem.</i> 281 , 1309-1312.
TTHA1065	transcription termination factor Rho	1XPV	52.81			
TTHA1142	response regulator receiver domain protein	2A9R	35.04			
TTHA1155	mercuric resistance operon regulatory protein (MerR)	3GP4	31.4			
TTHA1184	putative response regulator	1ZH4	29.76			
TTHA1292	metal uptake regulation protein, putative	2O03	33.61			
TTHA1352	response regulator	3C3W	37.56			
TTHA1359	transcriptional regulator, FNR/CRP family (SdrP)	2ZCW	100	TTHA0337, TTHA0425, TTHA0570, TTHA0634-0635-0636-0637-0638, TTHA0654-0655, TTHA0769-0770, TTHA0986, TTHA1028, TTHA0029, TTHA0557, TTHA1128, TTHA1215, TTHA1625, TTHA1635, TTHA1892, TTHB132	It is expressed in stationary phase, and up-regulates genes involved in nutrient and energy supply, redox control, and DNA/RNA modification.	Agari <i>et al.</i> (2008) <i>Mol. Microbiol.</i> 70 , 60-75. Manuscript in preparation.
TTHA1362	response regulator	1YS7	41.7			
TTHA1437	transcription regulator, Crp family (CRP)	3D0S	31.43	TTHA0176, TTHA0771, TTHB147-148-149-150-151-152, TTHB156-157-158-159, TTHB178, TTHB186-187-188-189-190-191-192-193-194	It binds cAMP to convert to active form. The CRP-cAMP complex up-regulates genes involved in DNA/RNA metabolism such as CRISPR-associated genes.	Shinkai <i>et al.</i> (2007) <i>J. Bacteriol.</i> 189 , 3891-3901.
TTHA1502	response regulator	1YS7	44.98			
TTHA1559	arginine repressor/activator	1B4A	46.31	TTHA1199-1198-1197-1196, TTHA1914	The apo-form is trimer and Arg-binding form is hexamer.	Fujikawa <i>et al.</i> (2006) <i>Microbiology</i> 152 , 3585-3594. (HB27株.)
TTHA1567	transcriptional regulatory protein	3D0S	29.91			
TTHA1580	transcriptional regulator, GntR family	3FMS	30.85			
TTHA1657	Rex (redox sensing repressor)	1XCB	100			Nakamura <i>et al.</i> (2007) <i>Proteins</i> 66 , 755-759; Sickmier <i>et al.</i> (2005) <i>Structure</i> 13 , 43-54. (Tag.)
TTHA1719	copper homeostasis operon regulatory protein			TTHA1718-1719-1720	This study	Manuscript in preparation.
TTHA1722	putative response regulator	2GWR	46.22			
TTHA1726	S-layer repressor (SlrA)	2CN3	24.47	TTHA1893 (S-layer protein precursor (P100 protein))	S-layer synthesis	Fernandez-Herrero <i>et al.</i> (1997) <i>Mol. Microbiol.</i> 24 , 61-72.
TTHA1766	S-layer-like protein (activator) (SlpM)	2R7F	42.31	TTHA1893 (S-layer protein precursor (P100 protein))	S-layer synthesis	Fernandez-Herrero <i>et al.</i> (1997) <i>Mol. Microbiol.</i> 24 , 61-72.
TTHA1876	probable repressor, phenylacetic acid catabolic pathway	1VHK	32.5			
TTHA1946	beta-lactamase regulatory protein (MazG)	3CRC	42.95			
TTHB023	transcriptional regulator, TetR family	3DCF	29.89			
TTHB073	transcriptional regulator	1MKM	35.22			
TTHB081	transcriptional regulator, IclR family	1CDB	34.14			
TTHB099	transcriptional regulator, Crp family	2ZDB	100			
TTHB100	transcriptional regulator, MerR family	2JML	42.47			
TTHB130	putative transcriptional regulator	3F6V	37.21			
TTHB136	probable transcriptional regulator, CopG family	1XM3	30.43			
TTHB173	response regulator	1ZH4	39.47			
TTHB186	putative transcriptional regulator	1SRV	32.18		Its expression is regulate by CRP (TTHA1437).	
TTHB211	RNA polymerase σ^E factor	2ZS2	34.97	TTHB210, TTHB211-212, TTHB213-214	unknown	Shinkai <i>et al.</i> (2007) <i>J. Bacteriol.</i> 189 , 8758-8764.
TTHB212	anti- σ^E factor	2CW5	27.27	none (It binds σ^E factor.)	It binds σ^E to inactivate the transcriptional activity.	Sakamoto <i>et al.</i> (2008) <i>Gene</i> 423 , 153-159.
TTHB248	transcriptional regulator, IclR family	1MKM	31.17			
TTHY7032	probable transcriptional regulator	1B0N	25.47			
TTHY7033	probable transcriptional regulator	2HSG	28.57			
TTHY7035	xylose repressor	1Z05	24.39			