

Function of cAMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8

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

Akeo Shinkai

新海暁男

(SR System Biology Research Group, RIKEN Spring-8 Center, Harima Inst.)

(理研播磨研 放射光システム生物学研究グループ)

e-mail: ashinkai@spring8.or.jp

RNAポリメラーゼ (RNAP) は、DNAの遺伝情報をmRNAに転写する反応を司る重要な酵素である。微生物由来のRNAPは、 $\alpha_2\beta\beta\omega$ 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すると σ 因子が遊離するが、転写反応はさらに進行し、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。転写反応は、生育環境の変化に応じて、転写因子と呼ばれるタンパク質によって、正、或は、負に調節されている場合もある。転写は分子生物学のセントラルドグマの最初のステップなので、その詳細なメカニズムを解明すれば、生命現象の普遍性の一端を理解できることになる。2002年に、Dmitry Vassylyev、横山茂之らにより、*T. thermophilus* HB8株由来のRNAPホロ酵素のX線結晶構造が明らかにされて以来、転写の構造生物学が急速に進展している。従って、本菌株は、転写のメカニズムを原子のレベルで解析するための格好のモデル生物と言える。一方、*T. thermophilus* HB8株には、およそ35種類の転写因子様タンパク質の遺伝子が見つかるが、それらの機能はほとんど明らかにされていない。我々は、それらの転写因子様タンパク質の機能を明らかにし、*T. thermophilus* HB8株による転写調節の全貌を明らかにすることを目的として研究を進めている。

cAMP レセプタータンパク質 (CRP) は、RNAポリメラーゼによる転写反応を調節する転写因子であり、cAMPと結合して活性型の複合体を形成する。CRPは多くの微生物が有する転写因子であり、大腸菌のCRP (ecCRP) はそれらのプロトタイプとして長年研究されてきた。ecCRPは、一つのサブユニットが209 aaから成るホモ二量体で、一つのサブユニットに対して一分子のcAMPが結合する。ecCRP-cAMP複合体は、プロモーター近傍に存在する、22 bpから成る回文様配列 (コンセンサス配列; AAATGTGATCTAGATCACATTT) に結合し、RNAPのプロモーターへの結合を促進することによって、転写を促進する。ecCRPは、カタボライト抑制に関与している遺伝子の転写を促進することから、カタボライト遺伝子活性化タンパク質とも呼ばれているが、鞭毛合成や細胞表層蛋白質などカタボライト抑制に関与していない遺伝子も含め、100種類以上の遺伝子の発現を調節している。

Thermus thermophilus HB8株のゲノムには、アミノ酸レベルでecCRPと約26%の相同性を示す、216 aaをコードするORFが存在する。我々は、本タンパク質の性質を解析するために、まず、大腸菌BL21株を宿主とした組み換えタンパク質、ttCRPを取得した。ttCRPは、ecCRPと同様に二量体を形成していた。さらに、プロテアーゼV8感受性テストにより、ttCRPはcAMPと相互作用することが強く示唆された。次に、ttCRP遺伝子破壊株(Δ ttCRP株)を作製し、GeneChipを用いて各種mRNAの発現の変動を解析した。その結果、ttCRP遺伝子が破壊することにより発現が抑制

される遺伝子或は遺伝子群が見出された。これらの遺伝子の上流領域から、ttCRP-cAMP 依存性のプロモーターを四つ見いだした。ttCRP 結合配列を解析したところ、何れも、ecCRP 結合コンセンサス配列の ${}^7\text{G}$ 及び ${}^{15}\text{TCACA}$ に相当する塩基以外は保存されておらず、ecCRP 結合配列とは異なり、回文様の配列ではなかった。次に、ttCRP によって調節される遺伝子の特徴を調べた。その結果、四つの ttCRP 依存性プロモーターのうちの一つは、ttCRP 結合部位の上流の非翻訳領域に繰り返し配列が存在していた。繰り返し配列の下流に位置する遺伝子群は、好熱菌特有の DNA 修復に関与していると報告されている。その他の二つのプロモーターの支配下にある遺伝子は、それぞれ、DNA ポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ III ドメインを持つタンパク質、及び、転写因子様タンパク質をコードしていた。これらのことから、ttCRP は、DNA や RNA の代謝・合成の調節に関与していることが示唆された。