

Structural and functional analysis of TetR family transcriptional regulators from *Streptomyces coelicolor*

(放線菌 *S. coelicolor* 由来の TetR family 転写調節因子の構造・機能解析)

学位論文内容の要旨

バクテリアにおいて温度や湿度の変化、栄養素の枯渇、他種の侵略などに応じて、生体内の化学反応の経路を切り替えることは重要であるが、それは転写調節因子が機能タンパク質の発現量を調節することによって行われている。転写調節因子の1種である TetR family はバクテリアに広く保存されており、薬剤排出タンパク質などの転写調節を担い、近年院内感染などで問題となっている病原菌の薬剤耐性機構に関与している。放線菌 *Streptomyces coelicolor* は、抗生物質などの多く種類の2次代謝産物を作ることで知られているが、ゲノム解析の結果、150個もの TetR family 転写調節因子をもっていることが明らかになった。しかしそれらの遺伝子は、実際に生体内でどのような遺伝子の転写調節をしているか、シグナル分子は何なのかについて明らかになっておらず、これらの機能を明らかにすることは、薬剤耐性機構の解明、さらには新たな抗生物質の発見の可能性も秘めている。そこで本研究では、*S. coelicolor* 由来の推定転写調節因子 SCO0332 および SCO7815 について機能解明を試みた。

機能解明のための手法としてX線結晶構造解析法と SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) を用いた。SELEX 法は標的タンパク質分子と特異的に結合する核酸配列を同定する方法で、結合配列を選別、それを PCR 法によって増幅するというサイクルを複数回繰り返す、至適配列を決定する。

結晶構造解析法によって、SCO0332 の立体構造を 2.25 Å の分解能で決定した。構造解析により SCO0332 が多くの転写調節因子に共通してみられる helix-turn-helix (HTH) DNA 結合モチーフをもち、2量体構造をとっていることが明らかとなった。また、他の TetR family の転写調節因子と有意な立体構造相同性が確認された。構造相同性が高い、*Staphylococcus aureus* 由来の多剤耐性転写調節因子 QacR のリガンド認識部位に相当する位置に、SCO0332 にもポケットが確認され、その内部に環状構造をもつ低分子化合物の電子密度が確認された。また2量体間の HTH モチーフの DNA 認識 helix の距離が 45.9 Å と DNA と結合するには大きすぎるため、本研究で明らかとなった構造は DNA 非結合型であり、リガンド結合時に SCO0332 が DNA 非結合型となって転写調節を行っている可能性が高いことが明らかとなった。

SELEX 解析および EMSA (electrophoretic mobility shift assay)により SCO0332 のゲノム上の結合位置、オペレーター部位を決定した。その配列は *sco0332* の 2 つ上流の遺伝子 *sco0330* のプロモーター部位と重なって存在しており、SCO0332 が *sco0330* の転写調節を行うリプレッサーである可能性が高いことが明らかとなった。

結晶構造解析により SCO7815 の立体構造を 2.22 Å 分解能で決定した。SCO0332 と同じく、HTH モチーフをもち、2 量体を形成していた。他の TetR family 転写調節因子に共通しているリガンド結合部位に、SCO7815 は複数の芳香族アミノ酸に囲まれたポケットが確認された。このような認識ポケットは、QacR にも存在する、構造の違うさまざまな種類の薬剤を 1 つのタンパク質が認識する多剤認識機構に特徴的なポケットである。このことから SCO7815 も多剤認識タンパク質である可能性が疑われた。

SCO7815 についても同様に SELEX 法と EMSA によりオペレーター部位を決定した。SCO7815 のオペレーター部位は自身の遺伝子 *sco7815* のプロモーター部位と重なっており、自らの転写調節をしていることが明らかとなった。また、*sco7815* のすぐ下流には多剤排出膜タンパク質と弱い相同性をもった機能未知遺伝子 *sco7816* が存在しており、構造学的な特徴と合わせて考えると、*sco7815* と *sco7816* はオペロンを構成し、SCO7815 はこれらの遺伝子の発現を制御し、薬剤耐性に関する転写調節因子である可能性が示唆された。さらに、SCO7815 とオペレーター DNA の複合体を形成後、臭化エチジウム、マラカイトグリーンを加えると、タンパク質から DNA が外れることが EMSA によって確認された。これらの薬剤は SCO7815 と高い構造相同性をもつ QacR が認識する薬剤であり、SCO7815 もこれらの薬剤に応答してオペレーター部位への結合を切り替え、自身と下流に存在している推定薬剤排出ポンプの遺伝子 *sco7816* の発現量をしている可能性が高いと考えられる。

以上のように、結晶構造解析と SELEX 法によって、SCO0332 および SCO7815 の機能を明らかにした。これらの手法の組み合わせは、機能未知転写因子の機能同定において、非常に有効であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 教 授 渡 邊 信 久 (名古屋大学)
副 査 准教授 姚 閔

学 位 論 文 題 名

Structural and functional analysis of TetR family transcriptional regulators from *Streptomyces coelicolor*

(放線菌 *S. coelicolor* 由来の TetR family 転写調節因子の構造・機能解析)

バクテリアにおいて温度や湿度の変化，栄養素の枯渇，他種の侵略などに応じて，生体内の化学反応の経路を切り替えることは重要であるが，それは転写調節因子が機能タンパク質の発現量を調節することによって行われている．転写調節因子 TetR family はバクテリアに広く保存されており，薬剤排出タンパク質などの転写調節を担い，近年院内感染などで問題となっている病原菌の薬剤耐性機構に関与している．放線菌 *Streptomyces coelicolor* は，抗生物質などの多く種類の 2 次代謝産物を作るが，ゲノム解析の結果，150 個もの TetR family 転写調節因子をもっていることが明らかになった．しかしそれらの遺伝子は，生体内でどのような遺伝子の転写調節をしているか，シグナル分子は何なのかについて明らかになっておらず，これらの機能を明らかにすることは，薬剤耐性機構の解明，さらには新たな抗生物質の発見の可能性も秘めている．そこで本研究では，*S. coelicolor* 由来の推定転写調節因子 SCO0332 および SCO7815 について機能解明を試みた．

機能解明のための手法として X 線結晶構造解析法と SELEX 法を用いた．SELEX 法は標的タンパク質と特異的に結合する核酸配列を同定する方法で，結合配列を選別，それを PCR 法によって増幅するというサイクルを複数回繰り返し，至適配列を決定する．

結晶構造解析法によって，SCO0332 の立体構造を 2.25 Å の分解能で決定した．構造解析により SCO0332 が多くの転写調節因子に共通してみられる helix-turn-helix (HTH) DNA 結合モチーフをもち，2 量体構造をとっていることが明らかとなった．また，他の TetR family の転写調節因子と有意な立体構造相同性が確認された．構造相同性が高い黄色ブドウ球菌由来の転写調節因子 QacR の

リガンド認識部位に相当する位置に、SCO0332にもポケットが確認され、その内部に環状構造をもつ低分子化合物の電子密度が確認された。また2量体間のHTHモチーフのDNA認識helixの距離が45.9 ÅとDNAと結合するには大きすぎるため、本研究で明らかとなった構造はDNA非結合型であり、リガンド結合時にSCO0332がDNA非結合型となって転写調節を行っている可能性が高いことが明らかとなった。

SELEX法およびゲルシフト法によりSCO0332のオペレーター部位を決定した。その配列はsco0332の2つ上流の遺伝子sco0330のプロモーター部位と重なって存在しており、SCO0332がsco0330の転写調節を行うリプレッサーである可能性が高いことが明らかとなった。

結晶構造解析によりSCO7815の立体構造を2.22 Å分解能で決定した。SCO0332と同じく、HTHモチーフをもち、2量体を形成していた。他のTetR family転写調節因子に共通しているリガンド結合部位に、SCO7815は複数の芳香族アミノ酸に囲まれたポケットが確認された。このような認識ポケットは、構造の違うさまざまな種類の薬剤を1つのタンパク質が認識する多剤認識機構に特徴的なポケットである。このことからSCO7815も多剤認識タンパク質である可能性が疑われた。

SCO7815についても同様にSELEX法とゲルシフト法によりオペレーター部位を決定した。SCO7815のオペレーター部位は自身の遺伝子sco7815のプロモーター部位と重なっており、自らの転写調節をしていることが明らかとなった。また、sco7815の下流には多剤排出膜タンパク質と弱い相同性をもった機能未知遺伝子sco7816が存在しており、構造学的な特徴と合わせて考えるとsco7815とsco7816はオペロンを構成し、SCO7815はこれらの遺伝子の発現を制御し、薬剤耐性に関する転写調節因子である可能性が示唆された。さらに、SCO7815とオペレーターDNAの複合体を形成後、臭化エチジウム、マラカイトグリーンを加えると、タンパク質からDNAが外れることを確認した。これらの薬剤はSCO7815と高い構造相同性をもつQacRが認識する薬剤であり、SCO7815もこれらの薬剤に応答してオペレーター部位への結合を切り替え、自身と下流に存在している推定薬剤排出ポンプの遺伝子sco7816の発現量をしている可能性が高いと考えられる。

以上、本研究では、結晶構造解析とSELEX法によって、SCO0332およびSCO7815の機能を明らかにした。これらの手法の組み合わせは、機能未知転写因子の機能同定において、非常に有効であることを示した。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があるものと認めた。