

論文内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 22 年度博士課程 進学
氏名 姚 明東
指導教員名 田之倉 優

論文題目

Crystal structure of AdpA, the central transcriptional factor in the filamentous bacterium

Streptomyces griseus, in complex with duplex DNAs

(放線菌 *Streptomyces griseus* 由来中心転写調節因子 AdpA 及び DNA 複合体の X 線結晶構造解析)

研究背景

Streptomyces griseus は特徴的な形態分化を行うこと及び二次代謝によって医薬品などの有用物質を生産することが広く知られている。転写因子 AdpA はその形態分化と二次代謝を司るグローバルな転写因子であり、A-factor 制御カスケードにおいて中心的な役割を担っている。A-factor 制御カスケードを Fig. 1 に示す。

AdpA は、その二量体化に関与する N 末端側の二量体化ドメインと、C 末端側の DNA 結合ドメインからなる。N 末端側は二量体化ドメインで、ThiJ/PfpI/DJ-1 ファミリータンパク質である。一方、C 末端側の DNA 結合ドメインは、2 つの helix-turn-helix (HTH) モチーフを特徴として、AraC/XylS ファミリーに帰属される。2 つのドメインは、そのアミノ酸配列から高い運動性を持つと予測されるリンカーによって接続されている。AdpA が結合するコンセンサス配列は、5'-TGGCSNGWWY-3' (S: G or C; W: A or T; Y: T or C; and N: any nucleotide)、という 10 bp 長の塩基配列であることが過去に報告されている (1)。細菌由来の他の転写調節因子のコンセンサス配列との比較から、AdpA が非常に低い塩基認識特異性を持っていると考えられている。そのため、AdpA は 500 以上の遺伝子群の転写調節領域に結合することができ、結果としてそれらの遺伝子群の転写を直接制御することができると考えられている。

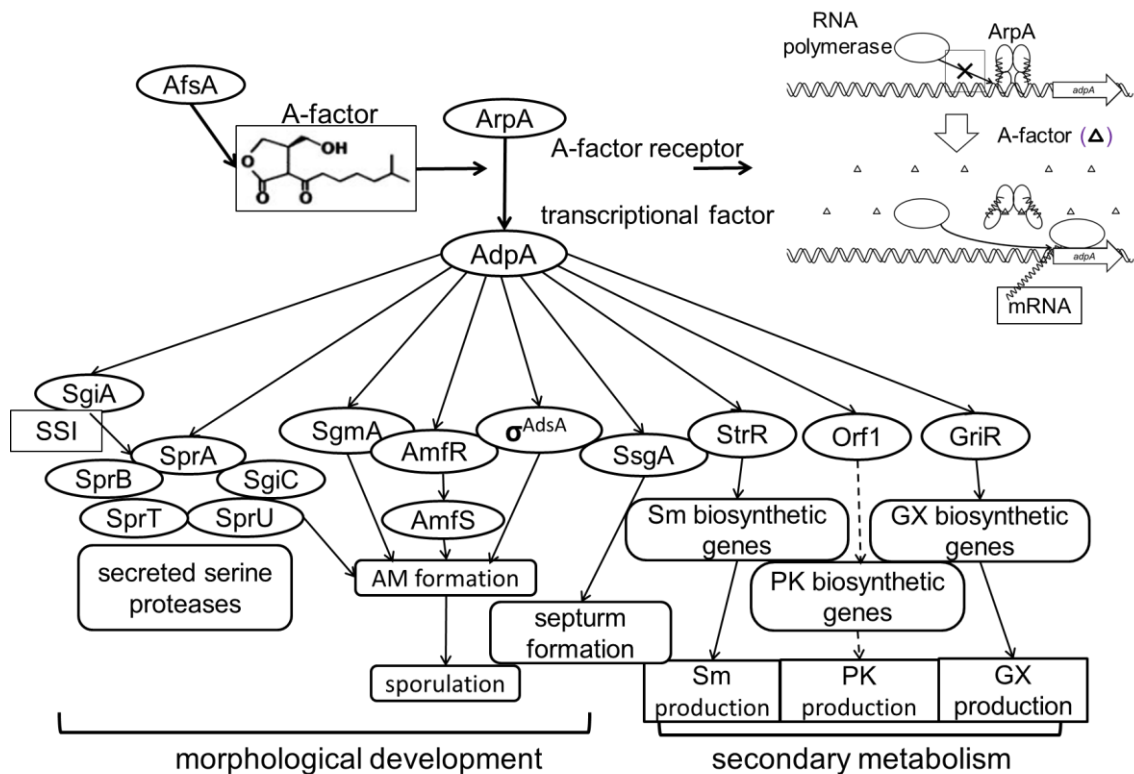


Fig.1 A-Factor 制御カスケード

AdpA と多種の標的遺伝子のプロモーター領域の結合様式は、type I と type II と呼ばれる 2 種類の様式に分類される。type I の結合様式は、2 か所のコンセンサス配列が 2 bp、13 bp、または 14 bp を隔てて逆向きに存在する場合に起こると考えられている結合様式であり、AdpA の 2 量体が 2 つのコンセンサス配列を同時に認識するというモデルが提唱されている。一方、type II の結合様式は、1 か所のコンセンサス配列のみが AdpA によって認識される場合に起こると考えられている結合様式であり、AdpA の 2 量体を形成するプロトマーの一方のみがコンセンサス配列を認識するというモデルが提唱されている。

本研究では、AdpA の認識配列特異性が低いという性質が、どのようなメカニズムで実現されているのかを明らかにするため、AdpA の DNA 結合ドメインと DNA の複合体の結晶構造を決定し、AdpA による転写調節機構を原子レベルで解明することを目的とした。

2 種類の結合様式に対応する AdpA-DBD-DNA 複合体結晶構造の決定

AdpA の認識配列特異性がどのように実現されているのかを明らかにするために、AdpA の DNA 結合ドメイン(AdpA-DBD)と、10 bp のコンセンサス配列を含む dsDNA の複合体の結晶化に成功し (2)、その結晶構造を決定した。Type I の結合様式に分類される配列を含む”DNA(DNA_{type I})”と、type II の結合様式に分類される配列を含む”DNA(DNA_{type II})”の、2 種類の

dsDNA を使用し、いずれにおいても結晶構造を決定することができた。Fig. 2 に AdpA-DBD-DNA(DNA_{type I})および AdpA-DBD-DNA(DNA_{type II})の全体構造を示した。2つの結晶構造の間に大きな差は見られなかった。AdpA-DBDのN末端側の HTH motifに含まれる α ヘリックスが dsDNA の主溝に深く入り込むように結合していて、後述のように α ヘリックスに含まれるアミノ酸残基の側鎖と塩基の間に相互作用が見られた。C末端側の HTH motif はN末端側ほど深くは dsDNA の主溝に入り込んでおらず、塩基配列の認識には関わっていないことが示唆された。この構造は AraC/XylS ファミリーの転写調節因子の DNA 認識機構に共通にみられる特徴である。

AdpA-DBD-DNA(DNA_{type I})と AdpA-DBD-DNA(DNA_{type II})を比較すると、C末端側 HTH motif と dsDNA の間の距離においてわずかに違いが見られた。Type II の結合の方は結合距離が短いため、dsDNA の主鎖リン酸基とタンパク質との間のより強固な結合が期待された。ゲルシフトアッセイを用いた結合力の比較により、AdpA-DBD は DNA(DNA_{type I})よりも DNA(DNA_{type II})により強固に結合する性質を有することが確かめられた。



Fig. 2 AdpA-DBD-DNA 複合体の結晶構造の比較。type I (black) および type II (grey).

AdpA-DBD の認識配列特異性

AdpA-DBD-DNA(DNA_{type I})および AdpA-DBD-DNA(DNA_{type II})複合体の結晶構造から、10 pb のコンセンサス配列のうち、5'側から 2 番目の G と 4 番目の C のみが、それぞれアミノ酸残基 Arg-262 と Arg-266 によって認識されていることが明らかとなった (Fig. 3)。AdpA の変異体および dsDNA の変異体を用いた結合解析により、これらのアミノ酸残基と塩基に間の相互作用が、AdpA-DBD と dsDNA の間の強固な複合体形成に必須であることが示された。この結果から、

AdpA は 10 bp のコンセンサス配列のうち 2 番目の G と 4 番目の C のみを認識しており、500 以上の遺伝子の転写調節領域を認識することができると推測された。

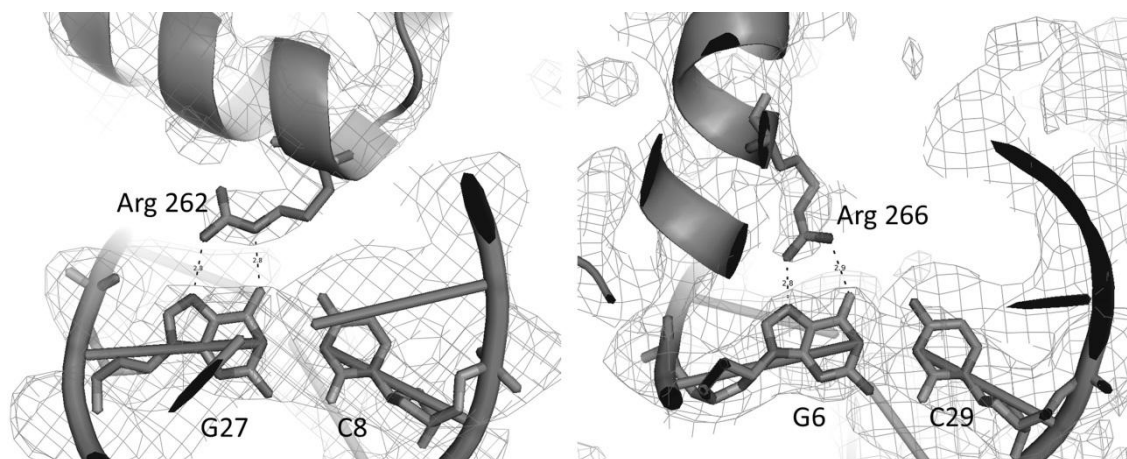


Fig. 3 DNA コンセンサスの塩基配列の認識機構

結論と展望

本研究では、2 種類の結合様式” type I ”および” type II ”に対応する DNA を用い、AdpA-DBD-DNA 複合体の結晶構造解析を行った。AdpA-DBD-DNA 複合体の結晶構造から、AdpA の DNA 結合ドメインによる DNA の塩基配列認識機構を決定することができた。この結果により、AdpA の認識配列特異性が低いことで 500 以上の遺伝子の転写を直接制御することができるというモデルが支持された。本研究の成果では、AdpA の DNA 結合様式のうち、type II の結合モデルを説明することができた。本研究の成果を足がかりとし、今後は AdpA 全長と DNA の複合体の立体構造解析を中心とした研究を展開していく必要がある。

参考文献

1. Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A., and Horinouchi, S. (2005) AdpA, a Central Transcriptional Regulator in the A-Factor Regulatory Cascade That Leads to Morphological Development and Secondary Metabolism in *Streptomyces griseus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 431-439
2. Yao, M. D., Miyazono, K., Ohtsuka, J., Hirano, S., Nagata, K., Horinouchi, S., Ohnishi, Y., and Tanokura, M. (2012) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the DNA-binding domain of AdpA, the central transcription factor in the A-factor regulatory cascade in the filamentous bacterium *Streptomyces griseus*, in complex with a duplex DNA. *Acta Crystallographica Section F* **68**, 946-949