2P101

FFRP 蛋白質の構造と機能 3. FL11 蛋白質と *fl11* プロモーター DNA との相互作用

○横山 勝志^{1,2}、小池 英明²、石島 早苗^{1,2}、クロウニー レスター²、菊地 智子²、鈴木 理² (¹ 科学技術振興機構、² 産総研・脳神経情報・DNA 情報)

FFRP は真正細菌及び古細菌の代謝・感染・増殖等を共通に制御する転写因子群である。超好熱性古細菌 *Pyrococcus* sp. OT3 の 14 種類の FFRP の 1 つである FL11 は DNA と結合して円盤状の会合体を形成する。

FL11 の標的候補である *fl11* 遺伝子のプロモーター DNA と FL11 との相互作用をフットプリント法で解析した。*fl11* 遺伝子の上流から内側を含む 222bp の領域を持つ DNA の top strand あるいは bottom strand を FAM で蛍光ラベルし DNaseI 及び Micrococcal Nuclease を用いてフットプリンティングした。DNaseI を用いた実験においては FL11 が *fl11* 遺伝子の上流の約 20bp の領域に特異的に結合しているのが確認された。Micrococcal Nuclease を用いた実験においては FL11 が約 100bp の広範囲に渡って結合している事が分かった。特に *fl11* 遺伝子の内側に存在する約 20bp の領域では major groove がプロテクトされている事が明らかになった。

以上の実験結果は 100bp 程度の DNA が FFRP 八分子から成るディスク型会合体の周りを 1 周してヌクレオソーム程度の大きさの複合体を形成するというモデルを支持する。現在、結晶構造を元に複合体のモデリングを行うと共に、特異性を確認する為に Selex 実験を準備中である。

K.Yokoyama, H.Koike, S.A.Ishijima, L.Clowney, T.Kikuchi and M.Suzuki : Structure and function of feast/famine regulatory proteins: 3. interaction between the FL11 protein and the *fl11* promoter

2P103

転写因子とターゲット予測システムの構築

○皿井 明倫¹、Ahmad Shandar¹、河野 秀俊² (¹ 九工大・情報工学、² 原研)

現在多くの生物種のゲノム解析から膨大な機能未知の遺伝子がもたらされている。これらのデータから転写因子の同定やそのターゲット予測をゲノムスケールで行うことは、遺伝子発現制御のネットワークを明らかにする上で重要である。我々は、機能未知の遺伝子から DNA 結合蛋白質や転写因子のターゲットを予測する方法を開発してきた。そこで現在、これまでに開発してきた方法やデータベースを統合し、ゲノムスケールで DNA 結合蛋白質や転写因子のターゲットを予測するシステムを構築している。まず、DNA 結合蛋白質と DNA 結合部位の予測では、既知の転写因子の配列データに基づき配列の組成やコンテキストを解析し、それらの非転写因子蛋白質との違いをニューラルネットワークで学習させ、新たな蛋白質が転写因子か否かを判別する。さらに予測精度を上げるため、配列アラインメントの進化的情報や、2 次構造、露出表面積、電荷分布の特性 (全電荷、双極子等) などの構造情報を加えた。一方、転写因子のターゲット予測では、蛋白質・DNA 複合体の構造データを統計的に解析することにより、アミノ酸と塩基の相互作用による直接認識及び DNA のコンフォメーションによる間接認識の統計ポテンシャルを導出し、それらを予測に用いた。このほか、配列情報を用いる方法、蛋白質・DNA 結合データを用いる方法、計算機シミュレーションによる情報などがあり、これらの相補的な方法を用いて精度を上げようとしている。ゲノムレベルの予測では、さらにゲノム特有の情報 (遺伝子のアノテーション、ゲノムの進化的情報、パスウェイの情報など) を活用する。これらの方法を組み合わせて、正確な予測を行い、予測結果をターゲットライブラリとしてデータベース化する。酵母の試験的な解析では、実験データとよく合う結果が得られた。

A.Sarai, S. Ahmad, H. Kono : Development of Prediction System for Transcription Factors and Their Targets

2P102

FFRP 蛋白質の構造と機能 1. 極低温電子顕微法による多様な会合体の 3 次元再構成

○石島 早苗^{1,2}、小池 英明²、クロウニー レスター²、徳吉 美恵子^{1,2}、鈴木 理² (¹ 科学技術振興機構、² 産総研・脳神経情報・DNA 情報)

FFRP は真正細菌と古細菌に共通の転写因子群で、代謝、増殖、感染に必要な多数の遺伝子の転写を制御する。古細菌 *Pyrococcus* sp. OT3 のゲノム配列を基に 14 種の FFRP を同定したが、これらは同古細菌の唯一にして最大の転写遺伝子群である。

P. OT3 の FFRP の一つ FL11 の溶液、結晶、パラクリスタル中での構造を極低温電子顕微法で解析した。溶液中の FL11 をモリブデン酸アンモン染色後に急速凍結し画像を得た。(200KeV、CTF の第 1 ゼロ値は約 30 Å)

画像中には 4 つの高電子密度を持つ粒子が多く、その中で 2 回回転対称性の粒子 17 を選び、会合体がディスクを形成すると仮定してオイラー角を決定し、eman パッケージを用いてフーリエ空間で 3 次元再構成した。FL11 の 2 つのドメインは逆の電荷を持ち、陽電荷をもつ N ドメインがモリブデン染色されて高電子密度を示し、負電荷を持つ C ドメインの会合する中央部は染色されないと結論した。C ドメインに相当する結晶構造と再構成像から完成した立体構造と種々の結晶構造の比較から会合の単位は二量体で、FL11 は八量体と結論した。一方、FL11 は結晶中でシリンダー様に会合し、結晶の両端まで連結した高次構造を形成する事が判明した。超音波処理したパラクリスタルから得た画像をもとに同様の構造を 3 次元再構成した。また、溶液中の粒子像の中に八量体の 4 つでなく 6 つの高電子密度の粒子があり、二量体が 6 の十二量体のディスクの存在を示唆した。さらに、画像の背景に多数の小粒子が存在するが、フーリエ変換、光散乱、沈降係数から二量体と考えられた。

FL11 は二量体、八量体ディスク、十二量体ディスクとシリンダーと多様な会合体を形成する。異なった会合体が別の遺伝子を制御することにより、少数の FFRP が多数の遺伝子を様々に制御する転写機構を示唆する。

S.A.Ishijima, H.Koike, L.Clowney, M.Tokuyoshi and M.Suzuki : Structure and function of feast/famine regulatory proteins: 1. 3D-Reconstruction of various assembly forms by cryo-electron microscopy

2P104

環状 DNA の高次構造：AFM 観測の scaling 解析

○荒木 須美子、中井 唱 (京大理工)

近年、DNA の高次構造や物性が遺伝子活性に重要であることが明らかになってきている。本研究では生物由来の DNA に多く見られる環状構造に着目し、それが分子鎖の形態や機能に与える影響について議論したい。環状 DNA では線状とは異なった構造、振る舞いが期待される。このような系ではねじれが分子鎖のコンパクト化に効いているという報告がなされているが、100 キロを超える巨大 DNA については不明な点が多い。本研究では、106 キロ塩基対 (全長約 36 μ m) の環状 DNA 分子を蛍光顕微鏡 (FM) と原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察した (図 1)。図 1 の AFM image から DNA 鎖の座標をとり、scaling (図 2) 等の解析を行うと、硬い棒状の領域が鎖に沿った長さで 200 nm まで達した。線状 T4DNA での報告ではこの領域は約 100 nm までであり¹⁾、その値と比較すると 2 倍曲がりやすくなっていることが明らかになった。

図 1 AFM&FM image の一例 図 2 環状及び線状 (図右下: 文献 1 より改変) DNA の多量 scaling

1) Yoshinaga, N. et al.: J. Chem. Phys., 116, 9926 (2002).

本研究は京都大学大学院生命科学研究科 竹安邦夫教授、日誌光治氏との共同研究である。

S. Araki, T. Nakai : The higher order structure of circular DNA: Scaling analysis on the AFM data