



Title	Thermus thermophilus HB8 のヌクレオイド構成タンパク質 HU は独特なヌクレオチド結合能を持つだけでなく、翻訳後修飾によって新規な多様性を示す
Author(s)	西田, 優也
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56101
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

高度好熱菌における核様体構成タンパク質 HU の
多様な核酸結合能と機能

A variety of nucleotide-binding activities and functions of
the nucleoid-associated protein HU in an extreme thermophile

西田優也

Yuya Nishida

大阪大学 大学院生命機能研究科
Graduate school of frontier bioscience, Osaka University

2016 年 3 月
March 2016

1. 目次

1. 目次.....	1
2. 略語.....	3
3. 研究の背景.....	5
4. 要旨.....	8
5. 英文要旨.....	10
6. 序文.....	12
7. 方法.....	17
7-1. TtHU の精製.....	17
7-2. 合成オリゴ DNA の調製.....	17
7-3. Electrophoresis-mobility shift assay.....	17
7-4. <i>T. thermophilus</i> HB8 の培養.....	20
7-5. <i>T. thermophilus</i> HB8 の形質転換、及び、ゲノム遺伝子の組換え.....	20
7-6. Pull down assay.....	21
7-7. Native PAGE assay.....	22
7-8. Far-Western blotting assay.....	22
7-9. RNase protection assay.....	22
7-10. TtHU のモデル構造の構築.....	22
7-11. Circular dichroism (CD) spectra の測定.....	23
7-12. NMR 用 TtHU の精製.....	23
7-13. NMR spectroscopy.....	24
7-14. <i>T. thermophilus</i> HB8 からの TtHU の精製.....	24
7-15. <i>In vitro</i> kination assay with [γ - 32 P]ATP.....	24
7-16. <i>In vitro</i> kination assay by mass spectrum.....	24
7-17. チタニアカラムを用いたリン酸化ペプチドの精製.....	25
7-18. Phos-tag agarose を用いたリン酸化ペプチドの精製.....	25
7-19. TtSpoVS の精製.....	25
8. 結果.....	27
8.1. TtHU の DNA 結合能、並びに、RNA 結合能の解析.....	27
8.2. TtHU の RNA 結合能の解析.....	27
8.3. TtHU の構造学的解析.....	31
8.4. TtHU の細胞生物学的な機能解析.....	37
8.5. TtHU の翻訳後修飾の探索.....	40
8.6. 新規 NAPs の探索.....	44

9. 考察.....	47
10. 参考文献	51
11. 業績.....	62
11-1. 原著論文 (査読有り).....	62
11-2. 学会・シンポジウム等における発表	63

2. 略語

ATP	Adenosine triphosphate
<i>B. stearothermophilus</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CaCl ₂	Calcium chloride
CD	Circular dichroism
<i>D. radiodurans</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
dsDNA	Double stranded DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EMSA	Electrophoresis mobility shift assay
EtBr	Ethidium bromide
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMG	High-mobility group proteins
HTK	Thermostable kanamycin-resistance gene
HU	H protein from <i>E.coli</i> U93
IPTG	Isopropyl beta-D-1-thiogalactopyranoside
KCl	Potassium chloride
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser-desorption / ionization time of fly mass spectrometry
MgCl ₂	Magnesium chloride
NaCl	Sodium chloride
NAPs	Nucleoid associated proteins
NMR	Nuclear magnetic resonance
ORF	Open reading frame
PAGE	Poly-acrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
Q-TOF MS	Quadrupole time of fly mass spectrometry
R.M.S.D.	Root mean square deviation
rpm	Revolution per minute
rRNA	Ribosomal RNA
scRNA	Small cytoplasmic RNA
SDS	Sodium dodecyl sulphate

SpoVS	Stage V sporulation protein S
ssDNA	Single stranded DNA
T _m	Melting temperature
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
<i>T. thermophilus</i> HB8	<i>Thermus thermophilus</i> HB8
TtHU	HU of <i>T. thermophilus</i> HB8

3. 研究の背景

遺伝情報の実体である DNA はあらゆる生物にとって極めて重要な物質であり、多様な機能を持つ。遺伝情報の継承の際は、細胞が分裂する前に DNA の複製が行われ、それに続いて娘細胞へと DNA の分配が行われる。この流れが適切な細胞段階において正確に実行されなければ、遺伝情報の継承は完遂できない。また、遺伝情報の発現においては、各細胞段階や外的刺激に応じて、必要な遺伝情報を正確、かつ、適切に mRNA へと転写する必要がある。ここに不具合があれば、異常な形質が発現されることとなる。さらに、時として DNA には損傷が生じるが、遺伝情報を守るために、それらの損傷の種類に応じて様々な修復機構が発現し、的確に修復が行われる。このような DNA の機能、すなわち、DNA の複製や分配、遺伝子の発現や修復は、生物にとって必須な機構であり、数多くのタンパク質が関与することで精密に制御されている。それらの調節機構には様々な経路が存在するが、DNA の挙動に大きな影響を与えるものの一つとして、DNA 自体の立体構造も挙げられる。例えば、全体的な DNA の構造は凝集構造と弛緩構造を行き来している。ここで、きつく凝集した構造をとる部分では、遺伝情報の発現に必要なタンパク質が結合できなくなり、遺伝情報の発現が抑制される。逆に、凝集が緩んだ構造では、遺伝情報の発現が促進されることが知られる。また、DNA は主として二本鎖螺旋構造として存在するが、全て均一な螺旋構造というわけではない。巻き数が多いきつく巻かれた螺旋から、巻き数が少いゆるく巻かれた螺旋まで、様々な状態の螺旋構造が存在する。DNA の複製や遺伝子の発現の際には、二本鎖螺旋構造が開き一本鎖 DNA となる構造を形成するが、きつい螺旋構造の部分ではそれらの反応が阻害される。逆に、螺旋構造を緩めることで、DNA の複製などが促進される。このように、DNA の機能と DNA の構造は密接な関係を持つが、その DNA の構造は多数のタンパク質によって調節されている。つまり、DNA を凝集させる働きを持つタンパク質や弛緩させるタンパク質、DNA の二本鎖螺旋構造を絞めるタンパク質や緩めるタンパク質、それらがお互いに協調して働くことで、DNA の構造が調節され、DNA の機能が適切に働けるようになる。

DNA の構造を調節するタンパク質は、一時的に DNA と結合し酵素的に DNA の構造を変化させるタンパク質と、恒常的に DNA と結合し物理的に DNA の構造を維持することに働くタンパク質とに分けられる。ここでは、後者の、DNA の全体的な構造を物理的に維持するタンパク質に注目する。それらのタンパク質には、真核生物では ヒストン と呼ばれるタンパク質が、原核生物ではヌクレオイド構成タンパク質群 (nucleoid-associated proteins (NAPs)) と呼ばれるタンパク質群が、主要な働きを担う。本研究では、原核生物の NAPs の研究を行った。NAPs には多数のタンパク質が含まれるが、それぞれが特長的な立体構造を持ち、多様な機能を持つ。

例えば、DNA を折り曲げる NAP や DNA 同士を橋渡しする NAP、DNA を凝集させる NAP、などがあるが、それらが協調してはたらくことで DNA の構造が適切に保たれる。よって、原核生物の DNA の機能を理解する上で NAPs の解明は必須であり、多くの研究が行われている。

NAPs は原核生物の DNA の機能に重要な役割を持つが、特に重要な NAPs として HU と呼ばれるタンパク質が挙げられる。HU は、原核生物において見つかったヒストンに似た性質を持つタンパク質群 H protein のひとつで、大腸菌 *Escherichia coli* U93 株で発見された。そこで、“H protein の U93 から見つかったもの” ということから HU という名前がつけられたとされる。NAPs の種間での分布は非常に異なるが、HU は全ての原核生物が持つ。また、細胞内での発現量は他の NAPs と比べて多く、DNA 上に満遍なく結合しているとされる。これらのことから、HU は最も重要な NAPs として注目されてきた。実際に、原核生物の DNA の構造の主軸となっていることが示されており、DNA の複製や修復、遺伝子の発現や修復といった、DNA の挙動全般に深く関与することも示されている。さらに、NAPs の種類が特に少ない生物種では、HU の欠損は致死になることから、HU の重要性が示唆される。HU は配列非特異的に DNA と結合し DNA を折り曲げ、さらに、DNA を凝集させることで他の DNA 結合タンパク質を阻害する性質も持つが、逆に、螺旋構造を緩めることで二本鎖が開きやすくする機能も持つ。HU は NAPs の中でも特に重要なタンパク質であるが、その機能が幅広い上に、他の NAPs と機能が混在して曖昧になることから、未解明な部分も多い。

ここでは、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の HU (TtHU) を用いて実験を行った。高度好熱菌のタンパク質は安定なため、生化学的解析に適している。また、遺伝子数が比較的少ないため、網羅的な遺伝学的解析が容易に行える。さらに、NAPs においても、*T. thermophilus* HB8 には比較的少ない数しか存在せず、より HU の機能が顕著に観察できることが期待された。これらの利点を利用して、本研究では、原核生物の DNA の挙動に対して重要な役割を持つ HU の機能を解明するために実験を行った。

本研究では、まず、HU が DNA 結合タンパク質として多様な役割を担うにも関わらず、一本鎖 DNA にも配列非特異的に結合し、RNA にも強く結合することに注目した。それらの性質は HU 研究の初期に示されていたにも関わらず、その詳細はわかっていなかった。しかしながら、HU の細胞内濃度は高いことから、HU は生体内でも一本鎖 DNA や RNA に結合し、何がしかの機能を持っている可能性が高い。逆に、それらの結合能が DNA 結合タンパク質としての HU の機能に影響を与える可能性も考えられる。つまり、HU の幅広いヌクレオチド結合能を解明することは、原核生物における DNA の挙動を解明する上でも重要なものである。実験の結果、RNA 結合能に関して、TtHU が RNA、および、RNA 分解酵素と結合し、RNA を分

解から守ることを示した。ssDNA 結合能に関しては、TtHU は配列非特異的に ssDNA に結合するが、特異的な一本鎖 DNA により立体構造が大きく変化することが示された。これらの結果は、これまでゲノム DNA の構造を調節するタンパク質として注目されてきた HU が、RNA や 一本鎖 DNA 結合タンパク質としても重要であることを示した。

次に、HU の機能多様性を制御する仕組みに注目して研究を行った。HU は幅広い機能を持つことで DNA の機能を様々な点で調節するが、逆に、HU の機能を適切に働かせる必要性が推察される。例えば、今回の研究で示された RNA を保護する機能は、常に働き続けると不要な RNA が残存することになり、やはり、機能の切り替えが必要であることを支持する。タンパク質の機能調節機構としては、翻訳後修飾による調節と他のタンパク質との相互作用による調節がまず考えられたため、それらの探索を行った。結果として、TtHU の機能が翻訳後修飾によって調節されていること、および、*T. thermophilus* HB8 では新規な NAP が働いている可能性があることが示された。これらの結果は、原核生物における DNA の機能調節は、これまで考えられていたよりも多くの因子によって複雑に調節されていることを示唆する。また、その主軸である HU の解明においては、単独の HU の機能を研究するだけでなく、翻訳後修飾によって多様性を与えられた、それぞれの HU の研究も進めなければならないことが示された。

4. 要旨

原核生物のゲノム DNA は複数のヌクレオイド構成タンパク質群 (nucleoid-associated proteins (NAPs)) と共にヌクレオイドと呼ばれる凝集構造を作っている。NAPs は、それぞれが様々な構造と機能を持ち、互いに協調して働くことで、DNA の複製や分配、転写や修復等、DNA の関与するあらゆる現象が適切に働くとされる。原核生物の DNA にとって NAPs は重要な役割を果たすが、NAPs の種類が多いことや、生物種によって保存性が異なることを原因として、解明が進んでいない部分も多い。多様な NAPs の中でも DNA 結合タンパク質 HU は、全ての原核生物に保存されること、細胞内での発現量が他の NAPs より多いこと、ヌクレオイド全体に遍在していることなどから、最も主要な NAPs とされ、様々な生物種において研究が進められてきた。HU は配列非特異的に DNA に結合することで屈曲や負のスーパーコイルを引き起こし、ヌクレオイドの凝集構造の主軸となることが示されている。HU は、DNA の複製や分配、修復、転写にも深く関与することが示されており、種々の原核生物において HU の変異体は顕著な表現型を示す。これまでに、HU に関する様々な研究が行われてきたが、その機能多様性のため、不明な点も多い。本研究では、タンパク質が安定で、生化学的、構造学的解析が容易で、遺伝子数が少なく簡便に遺伝学的解析が可能な *Thermus thermophilus* HB8 由来の HU (TtHU) を用いて、HU の多彩なヌクレオチド結合能の解明と、HU を含めた NAPs の多様性に注目して実験を行った。

まず、TtHU が関わる生体内システムを探索するために相互作用解析を行った。結果として、複数の RNA 分解酵素との相互作用が示された。そこで、それらの RNA 分解酵素の RNase 活性に対する TtHU の影響を調べたところ、TtHU の濃度依存的に RNase 活性がネガティブに調節された。ここから、TtHU の新規機能として RNA の保護が示唆された。次に、構造学的に TtHU のヌクレオチド結合能を解析するため、円偏光二色性 (CD) スペクトルを用いて、一本鎖 DNA、あるいは、二本鎖 DNA との結合に伴う TtHU の二次構造の変化を測定した。結果として、*Calv thymus* DNA、および、配列特異的な一本鎖 DNA によって、二次構造が大きく減少することを示す現象が観測された。そこで、より詳細にこの現象を解析するために、特異的な一本鎖 DNA 存在下での TtHU の構造変化を NMR によって測定した。結果として、X 線結晶構造解析の HU-dsDNA 複合体から考えられる DNA 結合機構とは異なる結合機構が示された。続いて、HU の多様な機能を調節する機構として、翻訳後修飾に注目した。リン酸化修飾の探索を行った結果、*T. thermophilus* HB8 由来の特定のリン酸化酵素によるリン酸化を発見した。また、その修飾が細胞内での TtHU の機能調節に働くことが示唆された。最後に、DNA の機能の複雑さに対して *T.*

thermophilus HB8 が持つ NAPs の種類の少なさを補い、TtHU の機能を補佐する因子として、新規 NAPs の探索を行ったところ、アーキアの NAPs の機能ホモログと考えられる新規の NAPs を発見した。また、この NAPs も翻訳後修飾によって機能が調節されていることが推察された。

これらの結果から、ヌクレオイド構造の主軸として注目されてきた HU が、RNA や ssDNA にとっても重要なタンパク質であること、また、原核生物におけるゲノム DNA の調節は、翻訳後修飾による HU の多様性や新規な NAPs など、これまで考えられているより多様な因子が関与し、複雑に調節されている可能性が示唆された。

5. 英文要旨

In prokaryotic cells, the genomic DNA forms an aggregated structure with various nucleoid-associated proteins (NAPs). NAPs have their own structures of variety and hence diverse functions. The functions of genomic DNA, such as replication, segregation, translation and repair, interrelate with its own structure, which is cooperatively modulated by NAPs.

HU (H protein from *E.coli* U93) is the most conserved and the most abundantly expressed NAP. The binding of HU leads to bent and negative supercoil of dsDNA structure. HU also works as an axis of dsDNA architecture and plays important roles in DNA replication, segregation, repair and transcription. Interestingly, it was reported that HU can also bind RNA or ssDNA. However, structural information is lacked, and functional relevance of their binding still remains elusive

In this study, I used HU from *Thermus thermophilus* HB8 (TtHB8) (TtHU). First, I confirmed that TtHU can bind both RNA and ssDNA. Proteomic approach for the search for binding partners of TtHU identified that HU interacts with RNA-binding proteins including RNase. Biochemical analysis revealed that HU protects RNA from degradation by its binding to RNase. I also found by circular dichroic spectroscopy that ssDNA induced a significant change in the secondary structure of TtHU. Of particular note, this change of secondary structure was sequence specific as complementary ssDNA, dsDNA or oligo dA did not induce such change. NMR structural analysis confirmed that HU with ssDNA formed a unique structure, which is different from the one that was shown with dsDNA earlier.

TtHB8 has only one HU in its genome and fewer number of NAPs compared to other prokaryotes. I found that TtHU was phosphorylated at residue 80 by protein kinases from TtHB8. Strains with mutations at residue 80 showed significant time-lags of growth in culture compared to the wild-type although these mutant HUs did not show any change in binding affinity with ssDNA or dsDNA. These suggest that post-translational modifications of HU produce a functional diversity or fine-tuning that can substitute the function of NAPs in other prokaryotes. I also found a novel NAP in TtHU by structural prediction.

Our data suggest that, in addition to well-known roles of HU with dsDNA, TtHU also interacts with RNA and ssDNA and receives post-translational modifications to exert diverse functions. Particularly, TtHU showed a novel structural

change when it associates with ssDNA of a specific sequence. Further analyses will provide novel structural insights into the functions of NAPs with nucleotides.

6. 序文

DNA の複製や修復、mRNA への転写、といったゲノム DNA を取り巻く細胞内機能は、真核細胞と原核細胞とで非常に似通っている。しなしながら、ゲノム DNA の物理的な周辺環境を見てみると、真核細胞と原核細胞とで大きく異なる。真核生物のゲノム DNA は、通常、核膜の中に収められている。そして、ヒストンタンパク質 8 量体と共にヌクレオソームを形成した上で、さらに高次構造のクロマチン構造を形成している。これに対して、まず、原核生物の細胞に核膜もヒストンタンパク質も存在しない。代わりに、ゲノム DNA はヌクレオイド構成タンパク質群 (nucleoid associated proteins (NAPs)) と共にヌクレオイドと呼ばれる凝集構造を形成し存在している(Dillon and Dorman, 2010; Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987; Kim et al., 2004; Stavans and Oppenheim, 2006)。ヒストンがゲノム DNA の構造を調節し、遺伝子の転写調節や、複製、修復にも関わるのが深く研究されているが、NAPs もヒストンと同様の機能を担うと考えられている。NAPs は、局所的、並びに、高次的な DNA の立体構造を変化させることが知られる(Luijsterburg et al., 2006; Maurer et al., 2009; Sato et al., 2013)。例えば、NAPs の 1 つである HU タンパク質は、DNA と結合することで局所的に DNA を捻じ曲げ、高次的には負のスーパーコイルを導入することが示されている。これに対して、同じく NAPs の 1 つである H-NS は離れた DNA 同士をつなぎ止めることで DNA を折り曲げることが示されている。このような NAPs による DNA の高次構造の変化は、複製(Donczew et al., 2014; Dorman and Deighan, 2003)、転写(Browning et al., 2010)、修復(Collier et al., 2012)の調節に関与すると考えられる。NAPs には機能や構造の異なる多数のタンパク質が含まれており、例えば、*Escherichia coli* (*E. coli*) では 12 種類以上の NAPs が知られている(Azam and Ishihama, 1999)。また、それらの NAPs の分布は生物種によって大きく異なる (**Table 1**)。ここでは、多様な NAPs が、細胞段階や外界からの刺激依存的に挙動を変えることで、DNA の高次構造、並びに、その周辺機能を調節すると考えられている(Ali Azam et al., 1999)。

多様な NAPs の中でも、HU と呼ばれるタンパク質は、全ての原核生物に保存され (**Table 1**)、タンパク質発現量も最も多いことから(Rouvière-Yaniv et al., 1979)、NAPs の主要なタンパク質として注目を集めてきた(Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987; Grove, 2011)。HU はおよそ 10 kDa からなるタンパク質で、通常は二量体で存在する(Geider and Hoffmann-Berling, 1981)。1960 年～1970 年代に行われた、DNA 結合タンパク質の網羅的な解析において発見された(Dixon and Kornberg, 1984; Rouvière-Yaniv and Gros, 1975)。

Table 1. Distribution of NAPs

	HU homologous genes													
	<i>hupA</i>	<i>hupB</i>	<i>ihfA</i>	<i>ihfB</i>	<i>dnaA</i>	<i>hfq</i>	<i>dps</i>	<i>lrp</i>	<i>cbpA</i>	<i>fis</i>	<i>hns</i>	<i>stpA</i>	<i>rob</i>	<i>iciA</i>
<i>T. thermophilus</i> HB8		○			○				○					
<i>E. coli</i>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>H. influenzae</i>		○	○	○	○	○	○	○		○	○			
<i>D. radiodurans</i>		○			○		○	○	○					
<i>B. subtilis</i>		○	○	○	○	○	○	○						
<i>T. maritima</i>		○			○	○								

* The table was constructed based on KEGG database (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>).

当時、真核生物のヒストンに似た性質を持つタンパク質の一群を、その頭文字をとって H proteins として分類した。中でも、特に *E.coli* U93 株から初めて同定されたものを、U 株から発見された H protein ということで HU という名前がついた (Rouvière-Yaniv and Gros, 1975)。発見当初は、真核生物のヒストンに相同するタンパク質として扱われたが、現在では、high-mobility group proteins (HMG) の方がより性質が似ていると考えられている (Bianchi, 1994)。

これまでに様々な原核生物種の HU で研究が行われてきた。例えば、HU 変異株を用いた実験においては顕著な表現型の変化が観察されており、特に *E.coli* を対象にした実験が多く行われている。HU 欠損株では、細胞の極度な伸張や極小な細胞の形成が見られ、ヌクレオイドの肥大や、DNA を持たない、あるいは、DNA が少ない細胞が観察されることから、HU がヌクレオイドの構造基盤に対して重要な役割を持つことがわかる (Dri et al., 1991; Huisman et al., 1989; Wada et al., 1988)。さらに、NAPs の種類が少ない生物種であるほど HU 欠損株の表現型は顕著になり、例えば、NAPs を二種類しか持たない *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*) などでは致死となることが示されている (Bartels et al., 2001; Liu et al., 2008; Nguyen et al., 2009; Toueille et al., 2012)。また、自然突然変異率が上がることに加えて、UV や gamma 線などへの感受性が上がることも示されていることから (Boubrik and Rouvière-Yaniv, 1995; Whiteford et al., 2011)、DNA 修復への関与も窺える。加えて、温度の変化や (Wada et al., 1988)、浸透圧の変化への感受性も上がり (Wang and Maier, 2015)、それに伴う遺伝子発現プロファイルの変化も示されていることから、遺伝子の発現調節においても重要な役割を持つことが示唆されている (Berger et al., 2010; Flashner and Gralla, 1988; Lewis et al., 1999; Oberto et al., 2009; Rouvière-Yaniv and Gros, 1975)。

HU の生化学的な解析においては、様々な生物種で、HU が二本鎖 DNA (double stranded DNA (dsDNA)) に対して配列非特異的に結合することが示されている (Krylov, 2001)。HU が DNA に結合すると、DNA が 160°前後屈曲させられることや、ヌクレオソーム状の凝集を示すことが、AFM や電子顕微鏡を用いた観察で示されている (Rouvière-Yaniv et al., 1979)。これは、HU 変異株においてヌクレオイドが膨張する現象の原因を示唆する。二次元電気泳動 (2D electrophoresis mobility shift assay (2D-EMSA)) を利用した実験では、HU によってプラスミド DNA が負のスーパーコイルを形成することも示されている (Kundukad et al., 2013; Mukherjee et al., 2008)。負のスーパーコイルは DNA を凝集させるだけでなく、DNA の複製や転写によるよじれを解消することにも働くことから、HU はヌクレオイドの凝集だけでなく、DNA の複製や転写においても重要な役割を果たすことが示唆される。

また、DNA の構造に対する HU の結合親和性が調べられた実験においては、ミスマッチやニックの入った DNA、ホリデイジャンクション DNA 等、様々な DNA

中間体に強く結合することが示されており、ここからも、HU が DNA 修復や複製に関与することを裏付けている(Balandina et al., 2002; Ghosh and Grove, 2006, 2004; Kamashev and Rouviere-Yaniv, 2000; Kamashev et al., 2011; Le Meur et al., 2015; Zelwer, 1995)。

X 線結晶構造解析では複数の構造が決定されており、dsDNA との複合体構造でも、種々の考察が行われている。特に、beta-sheet からなる"arm"が dsDNA の副溝にはまり込み、dsDNA を 140°~160°折り曲げると共に、DNA の軸を捻じ曲げている構造は、HU による DNA の負のスーパーコイルへの寄与をうまく説明している(Bhowmick et al., 2014; Swinger and Rice, 2007, 2004; Swinger et al., 2003; Tanaka et al., 1984)。

近年では、HU が原核生物にしか保存されていないことを利用して、抗菌剤の標的としての研究も進められている(Bhowmick et al., 2014)。また、HU がバイオフィルム形成に関与していることも示唆されており、予防医学的にも重要であると考えられる(Devaraj et al., 2015)。

このように、原核生物における DNA の関わる現象において、HU は非常に重要な役割を持つタンパク質あり、数々の研究が進められてきた。しかしながら、不明な点も多く、研究の余地がある。ここでは、二つの点に着目した。

一つ目に、HU は dsDNA だけでなく、一本鎖 DNA (single stranded DNA (ssDNA)) にも配列非特異的に結合し、さらに、RNA にも強く結合することは、初期の研究で示されているが、その詳細や生理的意義は未解明のままである(Balandina et al., 2001; Holck and Kleppe, 1985; Kamashev et al., 2008; Kim et al., 1996; Krylov, 2001; Suryanarayana and Subramanian, 1978)。しかしながら、細胞内濃度が高い HU は、生体内においても、ssDNA や RNA に高頻度に結合している可能性が高く(Jeon et al., 2010)、何がしかの機能を持つことが推察される。逆に、それらの機能が NAPs としての HU の機能に影響を及ぼす可能性も考えられることから、その機能を解明することは、原核生物の DNA の機能を理解する上でも意義がある。近年、一部の mRNA や、small cytoplasmic RNA (scRNA) と相互作用することが示されており、翻訳への関与などが示唆されているが、その詳細は不明である(Macvanin et al., 2012; Nakamura et al., 1999; Qian et al., 2015; Tjokro et al., 2014; Yamazaki et al., 1999; Zhang et al., 2015)。本研究では、HU が RNA 結合タンパク質に与える影響の解析と、一本鎖ヌクレオチドが HU に与える影響に関して生化学的および構造学的解析を行った。

二つ目に、HU は幅広い機能を持つことで DNA の複雑な機能を様々な点で調節するが、逆に、それらの HU の機能も何がしかの方法で調節される必要があると考

えられる。*E. coli* を含む一部の種では HU ホモログが複数存在し、お互いに協調的に働くことで、機能分化していることが示されている(Berger et al., 2010; Huisman et al., 1989)。また NAPs に関しても同様で、*E. coli* 等 NAPs の種類が多い生物種では、役割を分化させることで複雑な細胞機構に対応していると予想される。それに対して、HU ホモログが他の生物種に比して少なく、かつ既知の NAPs 数が少ない生物種では、複雑な機能調節のためには翻訳後修飾をはじめとした他の調節メカニズムの存在が予想される。そこで本研究では、NAPs の多様性を補う要素として、HU の機能を分化する内在性因子としての翻訳後修飾の探索、および、新規の機能を有する NAP の探索を行った。

7. 方法

7-1. TtHU の精製

TtHU を *E. coli* BL21 (DE3) でレコンビナントに発現させ、精製した。大腸菌の形質転換に際して用いた TtHU 発現用プラスミド TtHU/pET-11a は RIKEN BioResource center から入手した。まず、TtHU を大量発現させた大腸菌を sonication buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,8) に懸濁し、超音波破碎を行った。続いて、大腸菌破碎液に 70°C で 20 分間の熱処理を行った後で、22,500 g で 60 分間の遠心をするこゝで TtHU の粗精製液を得た。ここから、TtHU を Toyopearl SP-650M (Tosoh Bioscience) に吸着させた後、NaCl 濃度に関して 500 mM から 1.5 M の線形濃度勾配をかけた緩衝液で溶出し、SDS-PAGE で TtHU を含む画分を選択した。それらを、Vivaspin 20-10K (MWCO 10,000 Da) (GE healthcare) を用いて限外濾過濃縮した後、HiLoad 16/60 Superdex 75 (GE healthcare) で分離した。再び、SDS-PAGE で TtHU を含む画分を選択し、それらを Vivaspin 20-10K (MWCO 10,000 Da) で濃縮したものを最終精製標品とした。

熱感受性 TtHU 発現用プラスミド、および、T80 変異 TtHU 発現用プラスミドを構築する際は、TtHU/pET-11a とプライマーとして目的の 1 アミノ酸置換変異が入るよう設計されたオリゴ DNA No. 11–No. 34 を用いて、インバース PCR 法を行った (**Table 2**)。

7-2. 合成オリゴ DNA の調製

基質として用いた合成オリゴ DNA は **Table 3** にまとめた。

合成オリゴ DNA の 5' 末端のラジオラベル化は、[gamma-³²P]ATP を用いて、T4 polynucleotide kinase (TaKaRa Bio) によって 37°C で 1 時間反応させることで行った。反応後、エタノール沈澱を行い、未反応の [gamma-³²P]ATP を除いた。dsDNA は、相補的な合成オリゴ DNA を 100 mM NaCl 存在下で 98°C、10 分間の処理をしたあと、1°C/min で冷やして調製した。

7-3. Electrophoresis-mobility shift assay

オリゴ DNA を用いた際は、反応緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7.8) 中で濃度の異なる HU 精製標品と混合し、37°C で 1 時間反応させた後、polyacrylamide gel を用いて、TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) 中で電気泳動を行い分離した。泳動後のゲルはイメージングプレート (Fuji Film) にコンタクトし、BAS2500 image analyzer (Fuji Film) を用いて検出した。

Table 2. Sequences of primers used in this study.

No.	Name	Sequence (5' > 3')	Construct name	note
1	BglII-C6His-F	<u>CAG ATC TCA</u> CCA CCA TCA CCA CCA TTG AGG TAC	C6His/pHG305	BglII 切断部位を 下線で示した。
2	BglII-C6His-R	CTC AAT GGT GGT GAT GGT GGT <u>GAG ATC TGG</u> TAC	C6His/pHG305	BglII 切断部位を 下線で示した。
3	f-BamHI-down	<u>AGG GAT CCG</u> CGG CCC TTC CGC CG	TtHU-C6His/pHG305	BamHI切断部位を 下線で示した。
4	r-downHind3	AGC <u>AAG CTT</u> TCC GCA ACC CCA TGC TC	TtHU-C6His/pHG305	HindIII切断部位を 下線で示した。
5	f-EcoRIUP	<u>GGA ATT CGC</u> CAT CCC CGT GGA G	TtHU-C6His/pHG305	EcoRI切断部位を 下線で示した。
6	r-UPHUBgl2	AAG <u>AGA TCT</u> CTT CTT GAC CTT ATC CTT CAG	TtHU-C6His/pHG305	BglII切断部位を 下線で示した。
7	f-gHU	GAT GGC TGC GAA GAA GAC G	TtHU/pHG305	
8	r-BamHI-HU	<u>GAG GAT CCT</u> TAC TTC TTG ACC TTA TCC TTC AG	TtHU/pHG305	BamHI切断部位を 下線で示した。
9	f-bgl2-Hyg-2	ATA <u>AGA TCT</u> CGC CCC CAC CAC C	TtHU/pHG305	BglII切断部位を 下線で示した。
10	r-d1-UPofHU	TCT CAC CTC CTC GCT TCT TTG C	TtHU/pHG305	
11	r-HU-A17	TGG TCC ACC AGA TCC G	A17-mutant	
12	f-HU-A17I-2	GGT <u>GAT CCA</u> GGC CAC C	A17I/pET11a A17I/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
13	f-HU-A17V-2	GGT <u>GGT CCA</u> GGC CAC C	A17V/pET-11a A17V/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
14	f-HU-A17W-2	GGT <u>GTG GCA</u> GGC CAC C	A17W/pET-11a A17W/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
15	f-HU-A17D-2	GGT <u>GGG CCA</u> GGC CAC C	A17D/pET-11a A17D/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
16	r-HU-V27	TTC TTC TTG AGC CCG GTG	V27-mutant	
17	f-HU-V27A	GGA <u>CGC GAA</u> GGC TAT GGT GG	V27A/pET-11a V27A/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
18	f-HU-V27I	GGA <u>CGT GAA</u> GGC TAT GGT GG	V27I/pET-11a V27I/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
19	f-HU-V27W	GGA <u>CTG GAA</u> GGC TAT GGT GG	V27W/pET-11a V27W/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
20	f-HU-V27D	GGA <u>CGG TAA</u> GGC TAT GGT GG	V27D/pET-11a V27D/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
21	r-HU-E57	CCC GTG AGC TGG ACC TT	E57-mutant	
22	f-HU-E57A	CTT CGG TAC CTT <u>TGC GGT</u> G	E57A/pET-11a E57A/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
23	f-HU-E57I	CTT CGG TAC CTT <u>TAT AGT</u> GCG C	E57I/pET-11a E57I/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
24	f-HU-E57V	CTT CGG TAC CTT <u>TGT GGT</u> GC	E57V/pET-11a E57V/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
25	f-HU-E57W	CTT CGG TAC CTT <u>TTG GGT</u> GC	E57W/pET-11a E57W/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
26	r-HU-D92	TTG CCG GGC TTG AAG GC	D92-mutant	
27	f-HU-D92A	GGC CCT TAA <u>GGC TAA</u> GGT CAA	D92A/pET-11a D92A/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
28	f-HU-D92I	GGC CCT TAA <u>GAT TAA</u> GGT CAA GA	D92I/pET-11a D92I/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
29	f-HU-D92V	GGC CCT TAA <u>GGT TAA</u> GGT CAA G	D92V/pET-11a D92V/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
30	f-HU-D92W	GGC CCT TAA <u>GTG GAA</u> GGT CAA G	D92W/pET-11a D92W/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
31	r-forT80HU	GGC GGG GAT CTT GAT CTT CT	T80-mutant	
32	F-T80AHU	<u>GCC</u> CAG TAT CCC GCC TTC AAG	T80A/pET-11a T80A/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
33	F-T80SHU	<u>AGC</u> CAG TAT CCC GCC TTC AAG	T80S/pET-11a T80S/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。
34	F-T80DHU	<u>GAC</u> CAG TAT CCC GCC TTC AAG	T80D/pET-11a T80D/pHG305	変異導入部位を 下線で示した。

Table 3. Sequences of oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
27 mer oligoF	5' - ATG ACA ACT AAA GCA ACA CCC AAA ACA -3'
27 mer oligoR	5' - TGT TTT GGG TGT TGC TTT AGT TGT CAT -3'
27 bp dsDNA	27 mer oligoF と 27 mer oligoR をアニーリングした。
37 mer oligoF	5' - CGT AAG CTA CAC CTA CTC TTT GTA AGA ATT AAG CTT C -3'
37 mer oligoR	5' - GAA GCT TAA TTC TTA CAA AGA GTA GGT GTA GCC TAC G -3'
37 bp dsDNA	37 mer oligoF と 37 mer oligoR をアニーリングした。
60 mer oligoF	5' - CCG CTA CCA GTG ATC ACC AAT GGA TTG CTA- -GGA CAT CTT TGC CCA CCT GCA GGT TCA CCC -3'
60 mer oligoR	5' - GGG TGA ACC TGC AGG TGG GCA AAG ATG TCC- -TAG CAA TCC ATT GGT GAT CAC TGG TAG CGG -3'
60 bp dsDNA	60 mer oligoF と 60 mer oligoR をアニーリングした。
30 mer oligoC	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC -3'
C(28-30)Par	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA <u>CTG</u> -3'
C(25-30)Par	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG <u>GCT CTG</u> -3'
C(13-18)Par	5' - GGC CCC AGT GCT <u>CGT TAC</u> ATA CCG CGA GAC -3'
C(01-06)Par	5' - <u>CCG GGG</u> AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC -3'
C(30)Del	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GA -3'
C(28-30)Del	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA -3'
C(25-30)Del	5' - GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG -3'
C(01-06)Del	5' - AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC -3'
30 mer oligoD	5' - GTC TCG CGG TAT CAT TGC AGC ACT GGG GCC -3'
30 bp dsDNA	30 mer oligoF と 30 mer oligoR をアニーリングした。
30 mer polyA	5' - AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA -3'
30 mer polyT	5' - TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'

プラスミド DNA、並びに、ribosomal RNA (rRNA) を用いた際は、反応緩衝液中で濃度の異なる HU 精製標品と混合し、37°C で 1 時間反応させた後、0.7% agarose gel を用いて 50 microg/mL EtBr を含む TBE buffer 中で電気泳動を行い、分離した。泳動後のゲルは UV イルミネーター (Bio-rad) を用いて検出した。

7-4. *T. thermophilus* HB8 の培養

T. thermophilus HB8 の液体培養は、TT 培地 (0.8% polypeptone, 0.4% yeast extract, 0.2% NaCl, 0.4 mM MgCl₂, 0.4 mM CaCl₂, pH 7.2) を用いて 70°C において 200 rpm で振盪することにより行った。増殖曲線を計測する時は、70°C において 20 hour の培養を行った後、10 倍に希釈して培養を行い、続いて、30 分後に細胞数を数えてから、 2.5×10^6 /mL になるように希釈して、本培養を行った。

7-5. *T. thermophilus* HB8 の形質転換、及び、ゲノム遺伝子の組換え

T. thermophilus HB8 の形質転換に使用したプラスミドを構築する際に用いたプライマーは **Table 2** にまとめた。

T. thermophilus HB8 の形質転換、及び、ゲノム遺伝子の組換えは文献上の方法を元にして行った(Hashimoto et al., 2001)。対数増殖期 中期まで培養した *T. thermophilus* HB8 培養液 500 microL に形質転換用のプラスミド溶液を 20 microL 加え、70°C で 1 時間培養した後、500 microg/mL Kanamycine を含む TT-ager 培地 (0.8% polypeptone, 0.4% yeast extract, 0.2% NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 1.5% gellan gum, pH 7.2) に塗布した。相同組換えによるゲノム DNA への変異の導入は、PCR によって確認し、必要があれば サンガーシーケンス法により再確認した。

TtHU ノックアウト用プラスミド deltaTtHU/pGEM-HTK、及び、TtSpoVS ノックアウト用プラスミド deltaTtSpoVS/pGEM-HTK は RIKEN BioResource Center から入手した。TtRecJ ノックアウト用プラスミド deltaTtRecJ/pGEM-HTK は、若松泰介氏より譲渡された(Wakamatsu et al., 2010)。簡単には、deltaTtHU/pGEM-HTK は、pGEM-T easy vector を元に、TtHU の上流配列 (TtHU 遺伝子上流 500 bp と TtHU の ORF の N 末端側 21 bp)、及び、下流配列 (TtHU の ORF の C 末端 21 bp と TtHU 遺伝子下流 497 bp) の間に thermostable kanamycin-resistance gene (HTK) が組み込まれており(Hoseki et al., 1999)、相同組換えで TtHU 遺伝子を HTK に交換することができる。

TtHB8 ゲノム上の TtHU 遺伝子を C 末端 6x His タグ TtHU に組み替えるためのプラスミド TtHU-C6His/pHG305 はプラスミド pHG305 を元に構築した(Ooga et al., 2009)。プラスミド pHG305 は、プラスミド pUC18 のマルチクローニングサイトの BamHI 切断部位と KpnI 切断部位の間に *T. thermophilus* HB8 で機能するプロモーターと耐熱性ハイグロマイシン B 耐性遺伝子からなる配列 (約 1,000

bp) が組み込まれている。プラスミド C6His/pHG305 は、プラスミド pHG305 の KpnI 切断部位に、オリゴ DNA No. 1 と オリゴ DNA No. 2 をアニーリングさせてできた断片を繋げることで構築した。続いて、プライマーとしてオリゴ DNA No. 3 と オリゴ DNA No. 4 を用いて PCR によって TtHU 遺伝子の下流 497 bp を増幅した断片を BamHI、並びに、HindIII で切断し、同じく BamHI、並びに、HindIII で切断した C6His/pHG305 に繋げた。これを、EcoRI、並びに、HindIII で切断し、プライマーとしてオリゴ DNA No. 5 と オリゴ DNA No. 6 を用いて PCR によって TtHU 遺伝子上流 500 bp と TtHU の ORF から終止コドンを除いた 291 bp とを合わせて増幅した断片を EcoRI、並びに、HindIII で切断した断片とを繋げることで TtHU-C6His/pHG305 を構築した。この時プラスミドの構造は、TtHU 遺伝子上流配列 (500 bp) – 終止コドンを除いた TtHU ORF (291 bp) – 6x His 配列 (-RSHHHHHH) – 終止コドン – プロモーター (74 bp) – 耐熱性ハイグロマイシン B 耐性遺伝子 (909 bp) – TtHU 遺伝子下流配列 (497 bp)、となっている。このプラスミドで TtHB8 を形質転換すると、相同組換えでゲノム上の TtHU 遺伝子の C 末端に 6x His tag を付与するとともに、耐熱性ハイグロマイシン B 耐性遺伝子が組み替えられるようになっている。

TtHB8 ゲノム上の TtHU 遺伝子を TtHU 変異体に組み替えるためのプラスミド TtHU/pHG305 は、プラスミド TtHU-C6His/pHG305 と プラスミド TtHU/pET-11a を元に作成した。プラスミド TtHU-C6His/pHG305 から C 末端 6x His tag TtHU 配列を除いた配列を、オリゴ DNA No. 7 と オリゴ DNA No. 8 とを用いた PCR で増幅し、その産物を BamHI で切断した断片と、プラスミド TtHU/pET-11a の TtHU 配列を オリゴ DNA No. 9 と オリゴ DNA No. 10 とを用いた PCR で増幅し、その産物を BglII で切断した断片とをつなぐことで構築した。続いて、TtHU/pHG305 とプライマーとして、A17V 変異のためには オリゴ DNA No. 11 と オリゴ DNA No. 13、あるいは、V27A 変異のためにはオリゴ DNA No. 16 と オリゴ DNA No. 17、をそれぞれ用いて、インバース PCR 法を行い、変異の入ったプラスミドを構築した。

7-6. Pull down assay

TtHB8_{TtHU-CHis} 株、及び、野生型 TtHB8 を培養し、対数増殖期 後期において集菌した。菌体は緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.8) に懸濁した後、終濃度 1 mg/mL の Lysozyme を加えて 37°C で 1 時間の反応を行った。菌溶液に Benzonase Nuclease (Merck Millipore) を加え、氷上で超音波破碎を行った後、菌破碎液に 48,000 g で 60 分間の遠心を行った。菌溶液上清に終濃度 10 mM の Imidazole を加えた後、Ni-NTA buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 7.8) で平衡化された Ni-NTA agarose (Invitrogen) カラムにロードし

た。続いて、非特異的吸着物質を Ni-NTA buffer で洗い流した後、30 mM から 500 mM Imidazole を含む緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7.8) を用いて、カラムに吸着しているタンパク質、ならびに、その相互作用タンパク質を溶出した。溶出されたタンパク質は、SDS-PAGE で分離した後、MALDI-TOF MS を用いてペプチドマス フィンガープリント法を行い、同定した。

7-7. Native PAGE assay

9.5 microM の TTHA0252 と濃度の異なる TtHU を緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7.5) 中で 37°C で 1 時間反応させた。反応液は、10% polyacrylamide gel を用いて、TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) 中で電気泳動を行い分離した。泳動後のゲルは CBB 染色を行い、タンパク質を検出した。

7-8. Far-Western blotting assay

アナライトとなる各タンパク質精製標品 100 pmol を nitrocellulose membrane (Whatman) にスポットした。メンブレンは、TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) を用いて洗浄した後、1% gellatin を含む TBE buffer 中で 20 分間振盪した。続いて、20 microM TtHU、1% gellatin を含む TBE buffer 中で 1 時間振盪した後、TBE buffer で洗浄した。さらに、メンブレンを rabbit anti-HU antibody、1% gellatin を含む TBE buffer 中で 1 時間振盪した後、洗浄し、イミュンブロット AP 発色キット (Biorad) を用いて検出を行った。

7-9. RNase protection assay

終濃度 50 nanog/microL の rRNA は、反応緩衝液 (50 mM HEPES, 100 mM KCl; pH 7.8) 中で、濃度の異なる TtHU 精製標品と混合し、2 mM Zinc chloride と 5 microM の TTHA0252、もしくは、10 mM phosphate と 5 microM の TtPNPase を加え、37°C で 1 時間の反応を行った。反応液は、denaturation buffer (10% SDS, 30% glycerol, 0.02% BPB, 250 mM Tris-HCl, pH 6.8) と混ぜた後、0.7% agarose gel を用いて、50 microg/mL EtBr を含む TBE buffer 中で電気泳動を行い分離した。

7-10. TtHU のモデル構造の構築

TtHU のモデル構造は Robetta (<http://robetta.bakerlab.org/>) を用いて構築した。その際、参照構造として、IHf-DNA 複合体の X 線結晶構造を利用した (PDB ID: 2HT0)。続いて、得られたモデル構造を参照構造に重ね合わせ、TtHU-DNA 複合体のモデル構造を構築した。

7-11. Circular dichroism (CD) spectra の測定

CD スペクトルの測定は、JASCO-720W を用いて行った。光路長 0.1 cm のキュベットを使用し、25°C において、200 nm から 300 nm のスペクトルを測定した。測定は、緩衝液 (20 mM Phosphate, 100 mM KCl, pH 7.2) 中で 10 microM TtHU を用いて行った。実測値 $[\theta]_{\text{obs}}$ に対して、平均残基モル橢円率 $[\theta]$ は以下の計算式を用いて求めた。

$$[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} / ([\text{cell length}] * [\text{molar concentration}] * [\text{number of residue}])$$

pH 安定性は、TtHU をそれぞれの pH の緩衝液と混合し、24 時間後に CD スペクトルを測定することで行った。

熱変性曲線の測定は、溶液の温度を 1°C/min で変化させ、222 nm における CD の値 $[\theta]_{222}$ を計測することで行った。測定値から天然状態の割合 (%Fold) を求める際は以下の計算式を用いた。

$$\% \text{Fold} = ([\theta]_{\text{D}} - [\theta]_{\text{N}}) / ([\theta]_{\text{D}} - [\theta]_{222}) * 100$$

ここで、 $[\theta]_{\text{N}}$ は完全天然状態の CD の値を示し、低温における $[\theta]_{222}$ から直線近似線を計算することで求めた。同様に、 $[\theta]_{\text{D}}$ は完全変性状態の CD の値を示し、高温における $[\theta]_{222}$ から直線近似線を計算することで求めた (Fig. 4C, 4D)。%Fold = 50% の時の温度を T_m とした。

タンパク質の二次構造の状態は 222 nm における平均残基モル橢円率 ($[\theta]_{222}$) から決定した。Alpha-helix の割合 $f_{(\text{helix})}$ は 次の計算式を利用した (Chen and Yang, 1971)。

$$[\theta]_{222} = -30,300 f_{(\text{helix})} - 2,340$$

滴定実験は、300 microL の TtHU 溶液、もしくは、バッファーのみの溶液に、40 microM のオリゴ DNA、もしくは、600 microM/bp の calf thymus DNA を滴定することで行った。滴定によって体積が増加し TtHU、および、DNA の濃度が減少するため、測定後に希釈による測定値の減少を計算し補正した。

7-12. NMR 用 TtHU の精製

TtHU を *E. coli* Rosetta2 (DE3) でレコンビナントに発現させ、精製した。LB 培地 (0.5% yeast extract, 1.0% polypeptone, 0.5% NaCl, 50 microg/mL Ampicillin; pH 7.2) で 37°C において前培養を行った後、 ^{15}N からなる NH_4Cl 、ならば

に、 ^{13}C からなる glucose を含む M9 培地 (0.6% Na_2HPO_4 , 0.3% NaH_2PO_4 , 0.05% NaCl , 0.1% NH_4Cl , 0.2% glucose, 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 33 microM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 microg/mL Ampicillin; pH 7.2) に 1,000 倍希釈して、 37°C で培養を行った。 1×10^8 /mL まで増えた段階で、IPTG を終濃度 50 microg/mL になるように加えた後、6 時間後に集菌した。精製方法は、レコンビナントな TtHU の精製と同様に行った。

7-13. NMR spectroscopy

NMR スペクトルは、TCI 型クライオプローブの備わった Bruker Avance III 600 MHz spectrometer を用いて、303K において測定した。測定に用いたサンプルは、緩衝液 (20 mM phosphate, 200 mM NaCl , pH 7.4) において、主鎖の帰属の際は、1 mM TtHU を用いた。滴定実験の際は、0.1 mM TtHU を含む溶液を用いた。 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ でラベルした TtHU における、主鎖の ^1HN 、 $^{13}\text{C}_{\alpha}$ 、 $^{13}\text{C}'$ 、 ^{15}N 、並びに、側鎖 $^{13}\text{C}_{\beta}$ のアサインメントは、CBCA(CO)NNH, CBCANNH, HNCO, 及び HN(CA)CO の測定により行った。解析は CcpNmr Analysisを用いて行った(Vranken et al., 2005)。

7-14. *T.thermophilus* HB8 からの TtHU の精製

E. coli からレコンビナントな TtHU を精製した場合と同様に行ったが、超音波破碎液の 70°C 熱処理を行わなかった点が異なる。リン酸化 TtHU の探索の際は、sonication buffer に phosphatase 阻害剤として、1 mM Sodium Fluoride, 1 mM Sodium Molybdate, 4 mM Sodium Tartrate, 0.5 mM Sodium Orthovanadate, 1 mM Sodium Pyrophosphate, 1 mM beta-Glycerophosphate, 2 mM Imidazole を加えて、精製した。

7-15. *In vitro* kination assay with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

終濃度 20 microM の TtHU は、緩衝液 (20 mM phosphate, 100 mM KCl , 5 mM magnesium chloride, 5 mM manganese chloride, 1 mM DTT, pH 7.2) 中で、終濃度 1 mM の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、並びに、各種 kinase と混合し、 70°C で 20 分間反応させた後、反応液は、SDS-PAGE で分離した。ゲルは、イメージングプレートにコンタクトし、BAS2500 image analyzer (Fuji Film) を用いて検出した。

7-16. *In vitro* kination assay by mass spectrum

50 microg の TtHU 精製標品は、緩衝液 (20 mM phosphate, 100 mM KCl , 5 mM magnesium chloride, 5 mM manganese chloride, 1 mM DTT, pH 7.2) 中で、終濃度 1 mM の ATP、並びに、各種 kinase と混合し、 70°C で 15 分間反応させた。反応溶液は、50 mM NH_4HCO_3 存在下で、0.1 microg の Trypsin と反応させた後、

チタニアカラム、並びに、Phos-tag カラムを用いて、リン酸化ペプチドの濃縮を行った。得られたペプチド溶液は、nanoLC で分離しつつ、エレクトロスプレーイオン化法を行いながら、Q-TOF MS (Bruker Daltonics) を用いて、質量を測定した。

7-17. チタニアカラムを用いたリン酸化ペプチドの精製

リン酸化ペプチドの精製は文献上の方法を改変して行った(Takahata et al., 2012)。C8 Empore Disk でチップの先をふさぎ、約 1 mg の Titansphere TiO beads を詰めて TiO カラムとした。TiO カラムを 100 mg/mL lactic acid を含む TA buffer (0.1% trifluoroacetic acid, 80% acetonitrile) で平衡化した後、5 microg の peptide を含む TA buffer を TiO カラムに通すことで、ペプチドを吸着させた。さらに、TA buffer で非特異的ペプチドを洗い流した後、1% ammonium hydroxide でリン酸化ペプチドを溶出した。その後、C18 カラムを用いて脱塩処理を行った。

7-18. Phos-tag agarose を用いたリン酸化ペプチドの精製

C8 Empore Disk でチップの先をふさぎ、約 5 microL の Phos-tag agarose を詰めて Phos-tag カラムとした。Phos-tag カラムを 10 mM Zinc acetate を含む PT buffer (40% acetonitrile, 10 mM MES, 100mM NaCl, 5 mM Na₂C₂O₄, pH 6.0) で平衡化した後、PT buffer で平衡化した。続いて、5 microg の peptide を PT buffer に溶かし、Phos-tag カラムに通すことでペプチドを吸着させた。さらに、PT buffer で非特異的ペプチドを洗い流した後、5% ammonium hydroxide, 40% acetonitrile でリン酸化ペプチドを溶出した。その後、C18 カラムを用いて脱塩処理を行った。

7-19. TtSpoVS の精製

TtSpoVS を *E. coli* BL21 (DE3) でレコンビナントに発現させ、精製した。大腸菌の形質転換に際して用いた TtHU 発現用プラスミド TtSpoVS/pET-11a は RIKEN BioResource center から入手した。まず、TtSpoVS を大量発現させた大腸菌を sonication buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA) に懸濁し、超音波破碎を行った。続いて、大腸菌破碎液を 70°C で 10 分間の熱処理し、22,500 g で 60 分間の遠心することで SpoVS の粗精製液を得た。ここに、終濃度 1.5 M になるように ammonium sulfate を溶解し、その溶液を Toyopearl phenyl-650M に load した。非吸着画分に終濃度 2.7 M ammonium sulfate を加え、30 分後に 22,500 g で 20 分間遠心した。沈殿を緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.8) に溶解し、Toyopearl SP-650M に load した。NaCl 濃度に関して 0 M から 1.0 M の線形濃度勾配をかけた緩衝液で溶出し、SDS-PAGE で TtSpoVS を含む画分を選択した。それらを、Vivaspin 20-5K (MWCO 5,000 Da) を用いて限外濾過濃縮した後、HiLoad

16/60 Superdex 75 で分離した。再び、SDS-PAGE で TtHU を含む画分を選択し、それらを Vivaspin 20-5K (MWCO 5,000 Da) で濃縮し、最終精製標品とした。

8. 結果

8.1. TtHU の DNA 結合能、並びに、RNA 結合能の解析

TtHU のポリヌクレオチド結合能を調べるため、TtHU をレコンビナントに大量発現精製し、プラスミド DNA、ssDNA、dsDNA、rRNA を用いて EMSA を行った。RNA に対する結合能を DNA に対する結合能と比較するため、rRNA と プラスミド pUC119 を基質として用いた実験を行った結果、両方で似通った傾向の TtHU 濃度依存的なバンドのシフトが見られたことから、TtHU は DNA だけでなく、同程度の強さで RNA にも結合することが示された (**Fig. 1A、1B**)。60 bp dsDNA を基質として用いた実験では、TtHU の濃度依存的に三段階以上のバンドのシフトが見られた (**Fig. 1C**)。このことから、一分子の TtHU の結合に必要な DNA の長さは 20 bp 以下であることが示唆された。ssDNA に対する結合能を dsDNA に対する結合能と比較するため、27 mer oligoF、27 bp dsDNA、37 mer oligoF、37 mer dsDNA を用いた実験を行った結果、ssDNA を用いた場合でもバンドのシフトは見られたが、dsDNA を用いた場合のほうがより低い TtHU 濃度でもシフトが見られた (**Fig. 10**)。このことから、TtHU は ssDNA にも結合するが、その結合は dsDNA に対するものより弱いことが示された。これらの結果から、TtHU も dsDNA だけでなく、ssDNA や RNA にも比較的強い結合を持つことが示されたこと。そこで、それら、多様なヌクレオチド結合能をより詳しく調べるために実験を行った。

8.2. TtHU の RNA 結合能の解析

TtHU の多様なヌクレオチド結合能を調べるに当たって、TtHU の相互作用タンパク質から、TtHU が関与する生体内経路を解明するために実験を行った。まず、プラスミド TtHU-C6His/pHG305 を用いて TtHB8 を形質転換し、His-tag TtHU を発現する TtHB8_{TtHU-C6His} 株を構築した。そして、TtHB8_{TtHU-C6His} 株から Ni-NTA カラムを用いて TtHU を精製し、相互作用タンパク質を共精製することで pull down assay を行った。結果として、複数の DNA 結合タンパク質、並びに、RNA 結合タンパク質が TtHU の相互作用タンパク質の候補として同定された (**Table 4**)。ここでは、TtHU の RNA 結合能の解析を目的としたこと、HU の DNA 結合能が DNA 代謝酵素の酵素活性を阻害することが示されていたこと(Esser et al., 1999; Kamashev and Rouviere-Yaniv, 2000; Mukherjee et al., 2008)、から、特に RNA 分解酵素 TTHA0252 に注目した。TTHA0252 は mRNA を分解するとされる RNase である(Ishikawa et al., 2006)。TtHU と TTHA0252 との相互作用を検証するために、それぞれの精製標品を用いて、Native-PAGE を行った。結果として、TtHU の濃度依存的に TTHA0252 のバンドはシフトした (**Fig. 2A**)。

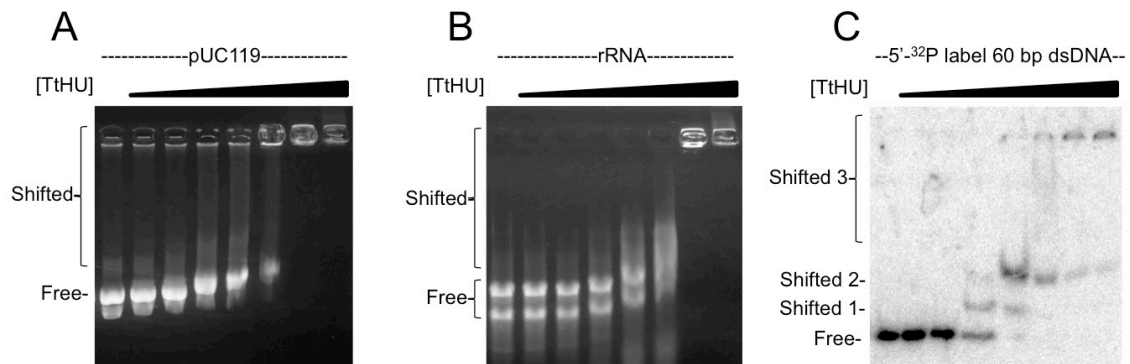


Fig. 1 TtHU の各種ヌクレオチドに対する結合能。(A) TtHU は pUC119 と結合し、pUC119 のバンドは TtHU の濃度依存的にシフトした。ここでは、0.1 microg/microL の pUC119 と 0–90 microM の TtHU を用いて EMSA を行い、EtBr で DNA を検出した。(B) TtHU は rRNA と結合し、rRNA のバンドは TtHU の濃度依存的にシフトした。ここでは、0.1 microg/microL の rRNA と 0–90 microM の TtHU を用いて EMSA を行い、EtBr で DNA を検出した。(C) TtHU は 60 bp dsDNA と結合し、60 bp dsDNA のバンドは TtHU の濃度依存的に段階的にシフトした。ここでは、10 nM の 5' 末端を ^{32}P でラベルした 60 bp dsDNA と、0–4 microM の TtHU を用いて EMSA を行い、オートラジオグラフィーで DNA を検出した。

Table 4. Proteins associated with TtHU, identified in pull down assay.

	number	annotation
DNA-binding proteins	TTHA1483	hypothetical protein
	TTHA1559	arginine repressor/activator
	TTHA1774	pili retraction protein PilT
	TTHA1812	RpoC; DNA-directed RNA polymerase beta' chain
	TTHB073	transcriptional regulator
RNA-binding proteins	TTHA1685	50S ribosomal protein L16
	TTHA0251	tuf; elongation factor EF-Tu
	TTHA0252	metallo-beta-lactamase superfamily protein
	TTHA1498	fusA; elongation factor G
Others	TTHA1484	hsp 20 family small heat shock protein
	TTHA0827	outer membrane protein, OmpH-like
	TTHA0829	acetoin dehydrogenase
	TTHB055	precorrin-4 C11-methyltransferase
	TTHA1628	iron ABC transporter,
	TTHA1330	branched-chain amino acid ABC transporter
	TTHA1839	SufB protein membrane protein
	TTHA1272	V-type ATP synthase subunit B
	TTHA0271	chaperonin GroEL

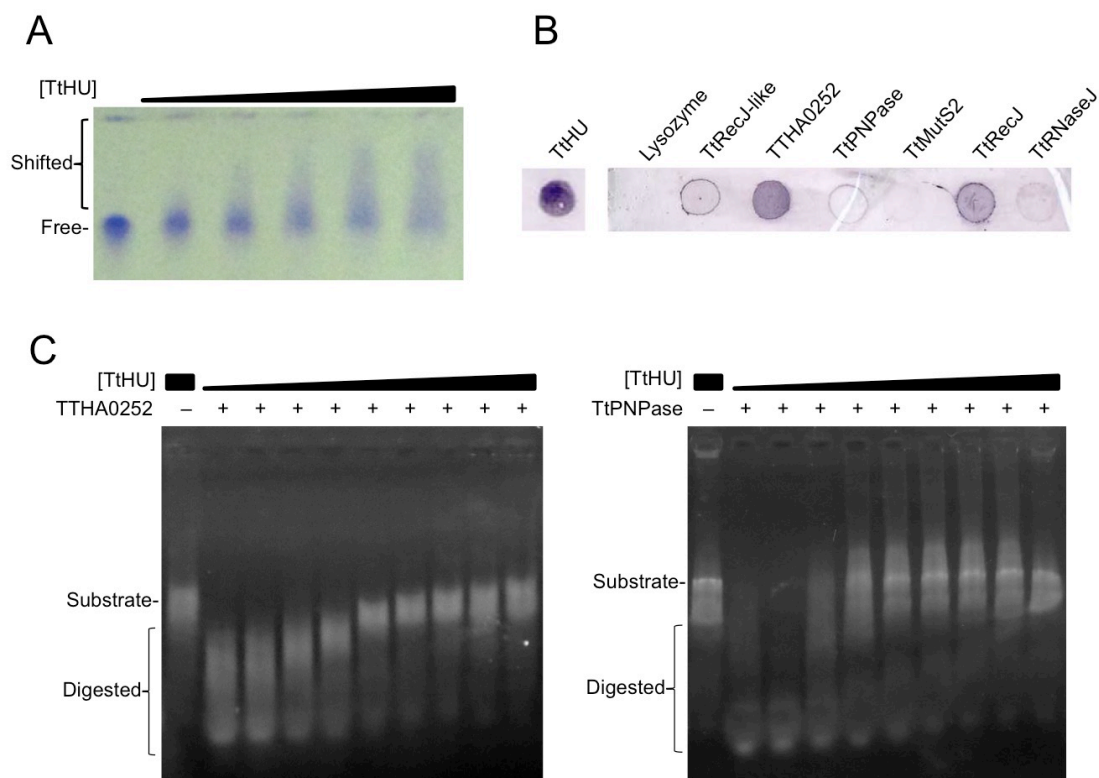


Fig. 2 TtHU とヌクレオチド結合タンパク質との相互作用。(A) TtHU は TTHA0252 と結合し、TTHA0252 のバンドは TtHU の濃度依存的にシフトした。ここでは、9.5 microM の TTHA0252 と 0-920 microM の TtHU を用いて native-PAGE を行い、CBB 染色で TTHA0252 を検出した。(B) TtHU は TTHA0252 を含むいくつかの特異的なタンパク質に結合した。ここでは、100 pmol の各タンパク質 を用いて Far western blotting assay を行い、rabbit anti-HU antibody と AP 発色キットを用いて検出した。(C) TTHA0252、並びに、TtPNPase の RNase 活性は TtHU によって濃度依存的に阻害された。ここでは、5 nanog/microL の rRNA と 0-90 microM の TtHU を混合し、5 microM の各 RNase 存在下で反応させた。

続いて、Far-western blot assay を用いて、TtHU と TTHA0252 との相互作用を検証した。ここでは、Pull down assay では検出できなかった RNA 代謝酵素との相互作用の可能性の検証も行うため、TTHA0252 だけでなく、同じく RNA 分解酵素である TtPNPase、TtRNaseJ、TtRecJ-like、及び、ssDNA 分解酵素である TtRecJ、dsDNA 結合タンパク質である TtMutS2、及び、ネガティブコントロールとして Lysozyme を用いて実験を行った。結果として、TTHA0252 以外のタンパク質でも相互作用が検出された (**Fig. 2B**)。相互作用するタンパク質に TtHU がどのような影響を与えるのかを調べるために、TtHU 存在下での酵素活性測定を行った。ここでは、精製と活性測定が容易であった TTHA0252 と TtPNPase の RNase 活性に対する TtHU の影響を調べた。結果として、TTHA0252、並びに、TtPNPase による rRNA の分解は、TtHU の濃度依存的に阻害された (**Fig. 2C**)。これらの結果から、TtHU は複数の RNA 結合タンパク質と相互作用し、RNase 活性を阻害することが示された。

8-3. TtHU の構造学的解析

これまでにいくつかの HU-dsDNA 複合体の X 線結晶構造が決定されており、そこでは、フレキシブルな DNA-binding arm の部分が dsDNA の副溝 (minor groove) にちょうどはまり込む形になっていた(Lynch et al., 2003; Swinger and Rice, 2007, 2004; Swinger et al., 2003)(**Fig. 7D**)。この時、一本鎖 DNA や RNA では同様の構造は取れないと考えられるため、HU と ssDNA の結合様式は、dsDNA に対するものとは異なると考えられる。

まず、様々な条件下での TtHU の構造変化を、簡便に二次構造の状態を調べることができる CD スペクトルによって解析した(Chen and Yang, 1971)。TtHU 単独での CD スペクトルを測定し、222 nm における平均残基モル橢円率 $[\theta]_{222}$ から TtHU の alpha-helix の割合を計算すると、38% となり、TtHU のモデル構造から計算した値 41% とほぼ一致した (**Fig. 3A**)(Chen and Yang, 1971)。得られた CD スペクトル結果は、文献上の *B. stearothermophilus* 由来 HU の CD、ならびに、*E. coli* 由来 HU の CD とほぼ同等であった(Dijk et al., 1983)。続いて、CD の値を指標として、TtHU の熱変性曲線、並びに、pH に対する安定性を測定した。結果として、TtHU の熱変性中点 (T_m) は 78°C であることが示され、pH 1 から pH 11 まですべて安定して二次構造を保つことが示された(**Fig. 3B、3C、3D、3E**)。また、熱変性に関して可逆であることも示された(**Fig. 3A**)。

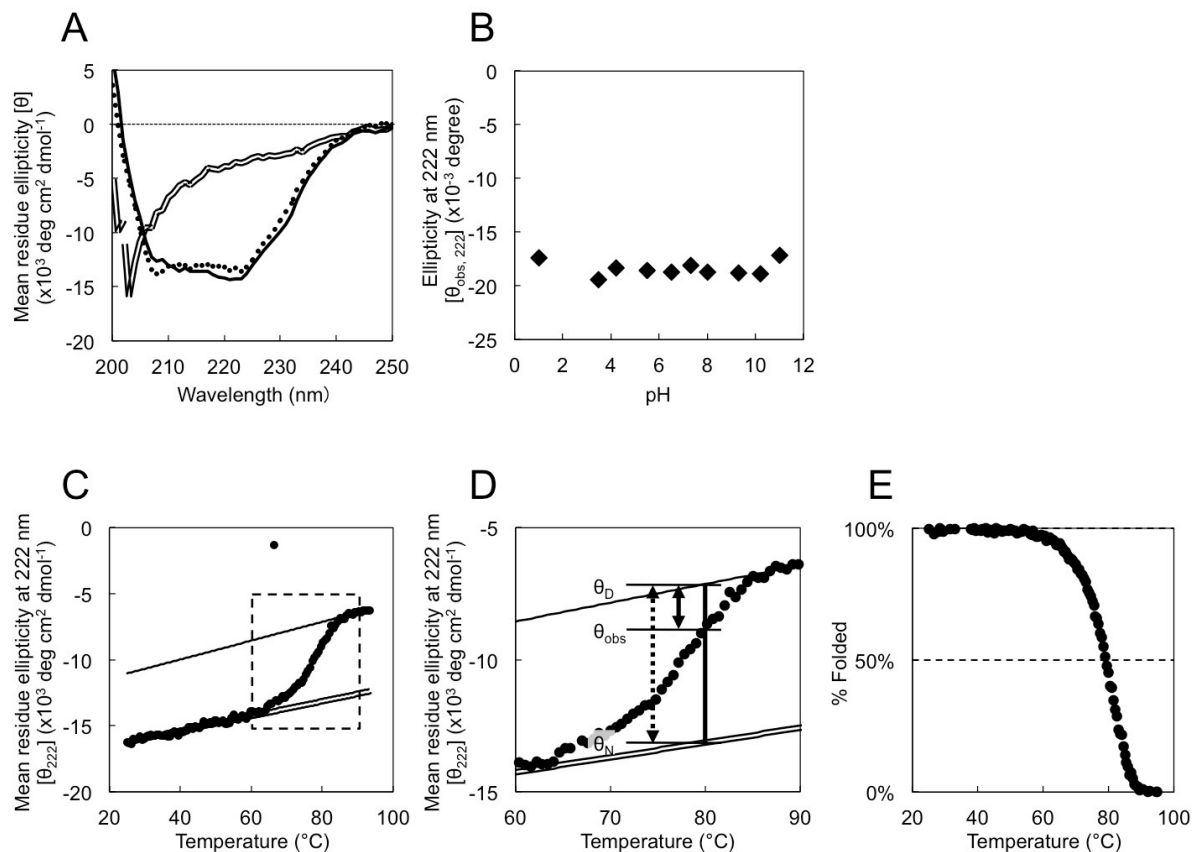
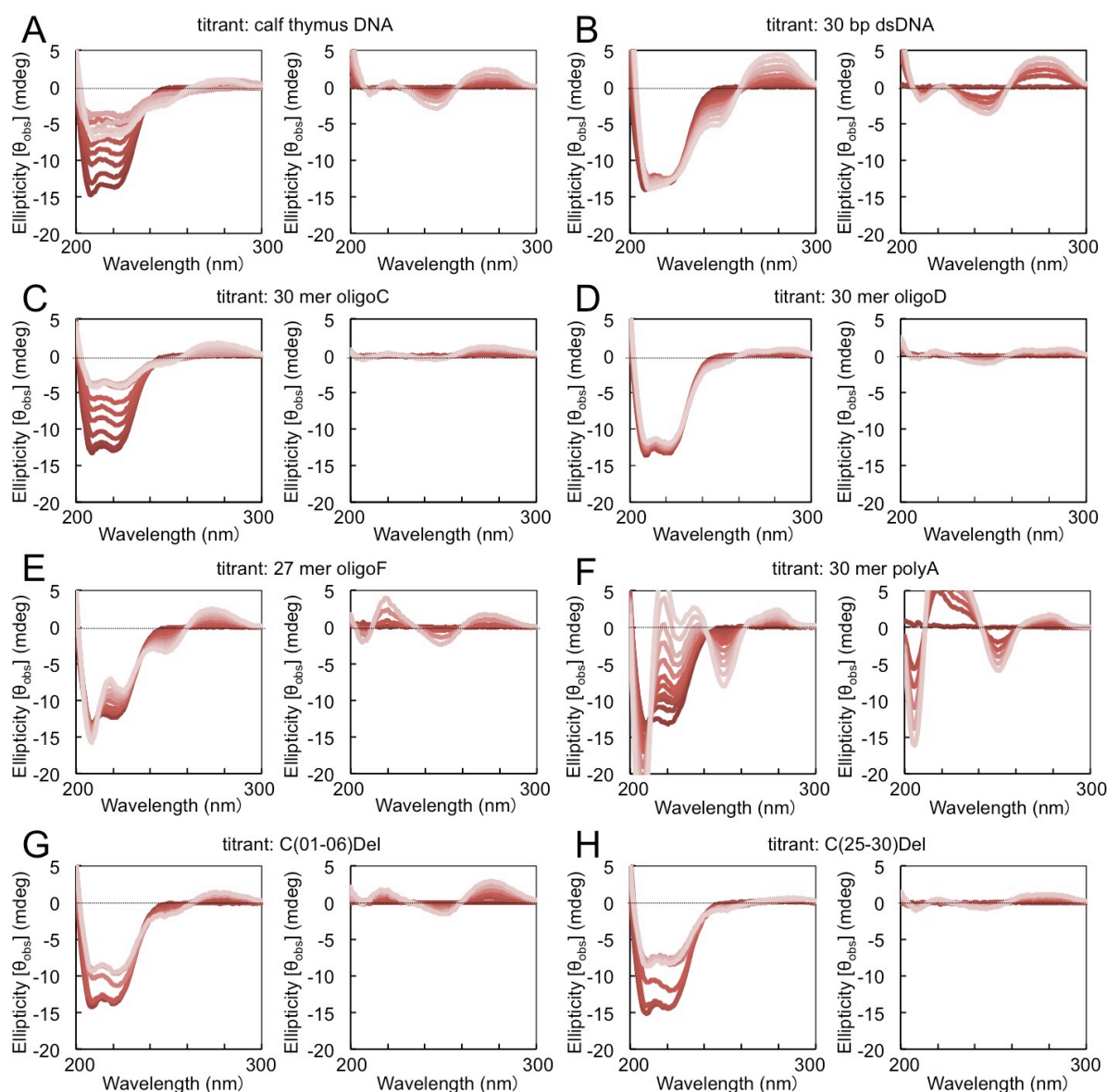


Fig. 3 TtHU の円偏光二色性 (CD) スペクトルと熱変性の計測。(A) TtHU は熱変性からリフォールディングした。ここでは、20°C におけるスペクトル (—)、95°C におけるスペクトル (---)、95°C で処理した後に冷ましたスペクトル (●●●) を示した。(B) TtHU は幅広い pH 環境で二次構造を維持した。ここでは、各 pH 環境での TtHU の 222 nm における CD の測定値を示した。(C) 温度を 25°C から 98°C まで変化させた時の TtHU の CD を示した。ここでは、222 nm における平均残基モル楕円率 $[\theta_{222}]$ (●)、完全天然状態の CD の値 $[\theta_{\text{N}}]$ として 25°C–50°C の $[\theta_{222}]$ から求めた直線近似線 (=)、完全変性状態の CD の値 $[\theta_{\text{D}}]$ として 85°C–95°C の $[\theta_{222}]$ から求めた直線近似線 (—) を示した。(D) TtHU の天然状態の割合 (%Fold) を求めるスキームを示すために、(C) における点線部位を拡大した。詳細は“方法”に記した。(E) TtHU の T_{m} は 78°C であることが示された。ここでは、天然状態の割合 (% Folded) を温度に対して示した。(C)、(D) から $\% \text{Fold} = ([\theta_{\text{D}}] - [\theta_{\text{N}}]) / ([\theta_{\text{D}}] - [\theta_{222}]) \times 100$ として %Fold を線画した。

続いて、DNA の結合による TtHU の構造変化を観察するために、calf thymus DNA を滴定しつつ、CD スペクトルを測定した (**Fig. 4A**)。結果として、DNA の滴定に伴い、alpha-helix 二次構造を示す 222 nm 周辺の θ_{obs} における負の極大が 1/3 まで減少した。これを詳細に解析するために、様々なオリゴ DNA を用いて同様の実験を行った結果、30 mer oligoC では、同様の現象が観察されたが、これに相補的な 30 mer oligoD、および、それらをアニーリングさせた 30 bp dsDNA では変化が観察されなかった (**Fig. 4B、4C、4D**)。さらに、30 mer polyA、30 mer polyT を含む他の配列を用いても実験を行ったが、TtHU の二次構造の減少は観察されなかった (**Fig. 4E、4F**)。これらの実験から、DNA の滴定による TtHU の二次構造の減少は配列特異的な一本鎖 DNA によっておきることが示された (**Fig. 4**)。今回二次構造の減少が示された 30 mer oligoC の配列に関して、より詳細に配列特異性を調べるために、配列の一部を削ったものや相同配列と組み替えた配列で同様の実験を行った (**Fig. 4G、4H、4I**)。配列の一部を相同配列で置換したものと削ったものとを比較すると、配列を置換したもののほうがより TtHU の二次構造の構造は変化しなかった。また、5' 側と 3' 側とで比較すると、5' 側がより TtHU の二次構造の減少に影響があることが示された。

今回変化が観察された配列は 大腸菌用プラスミドの一部から偶然に発見されたものであった。そこで、Calf thymus DNA (2.8×10^9 bp) と TtHB8 genomic DNA (1.8×10^6 bp) に対してこの配列の検索を試みたが、それぞれ、特に顕著な一致傾向は見られなかった。



Name	Sequence	$\theta_{\text{after}}/\theta_{\text{before}}$
C(01-06)Par	<u>CCG GGG</u> AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC	97%
C(13-18)Par	GGC CCC AGT GCT <u>CGT TAC</u> ATA CCG CGA GAC	94%
C(25-30)Par	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG <u>GCT CTG</u>	87%
C(28-30)Par	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA <u>CTG</u>	48%
C(01-06)Del	AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC	79%
C(25-30)Del	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG	59%
C(28-30)Del	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA	28%
C(30)Del	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GA	30%
oligoC	GGC CCC AGT GCT GCA ATG ATA CCG CGA GAC	33%

Fig. 4 様々な DNA との相互作用による TtHU の二次構造の変化を示す CD スペクトル。10 microM の TtHU (left)、あるいは、buffer (Right) に対して、それぞれのグラフ上に記した DNA を滴定した。各スペクトルは、赤色を滴定前として、滴定の経過に従ってスペクトルの線の色が薄くなるように示した。Calf thymus DNA (A) と 30 mer oligoC (C) を滴定した際には TtHU の二次構造の減少を示すスペクトルが観測された。他の DNA では同様の二次構造の変化は観察されなかった。その例として、30 bp dsDNA (B)、30 mer oligoD (D)、27 mer oligoF (E)、30 mer poly A (F) を滴定した際のスペクトルを記載した。30 mer oligoC の改変配列を滴定した際には、改変の仕方によって異なる二次構造の変化が観察された。その例として、C(01-06)Del (G) と C(25-30)Del (H) を滴定した際のスペクトルを記載し、その他の配列に関しては、滴定前の CD 値 (θ_{before}) に対する滴定後の CD 値 (θ_{after}) の比をまとめた (I)。ここでは、DNA による CD の変化は差し引いて計算した。

次に、CD スペクトルによる実験で最も顕著に二次構造の減少が示された 30 mer oligoC を用いて、その構造変化をより詳細に解析するために NMR スペクトル実験を行った。まず、 ^{13}C - ^{15}N ラベルした TtHU を大量発現、精製した。これを用いて、TtHU 単独での NMR スペクトルを測定し、シグナルの帰属を行った。結果として、構造決定には至らなかったが、proline と N 末端 methionine を除いた 92 アミノ酸残基に対して 84 残基の帰属に成功した (**Fig. 5A**)。続いて、30 mer oligoC を滴定しながらの NMR スペクトルの測定を行った。結果として、DNA の滴定に伴い NMR のシグナルは弱まり、最終的に全体的なシグナルは消失した。次に、それぞれのアミノ酸残基に対する DNA の影響の程度を調べるため、低い DNA 濃度でシグナルの減少が見られた残基と、高い DNA 濃度でシグナルの減少が見られた残基を区別し、TtHU のモデル構造上にマッピングすることで、立体構造上で 30 mer oligoC の影響を強く受けた部分と弱く影響を受けた部分、最後に影響をうけた部分を示した (**Fig. 5B、5C**)。まず、主に DNA の影響を受けたのは saddle の部分であり、これは、これまでに決定されている HU-DNA 複合体の X 線結晶構造と一致するものであった。次に、これまでの X 線構造から予想された DNA-binding arm の部分への影響は少なかった。さらに、X 線結晶構造からは予想されなかった body の側面へも影響があることが示された。これらの結果は、CD よって示された二次構造の変化は、TtHU と ssDNA が dsDNA の場合とは異なる結合を作り、その結果として起きた反応であることが示唆された。

これらの結果から、TtHU は配列特異的な ssDNA との相互作用によって極めて強い影響を受けること、および、その影響は、X 線構造で dsDNA との相互作用が示されていた部分とは異なる部位によるものである可能性が示唆された。

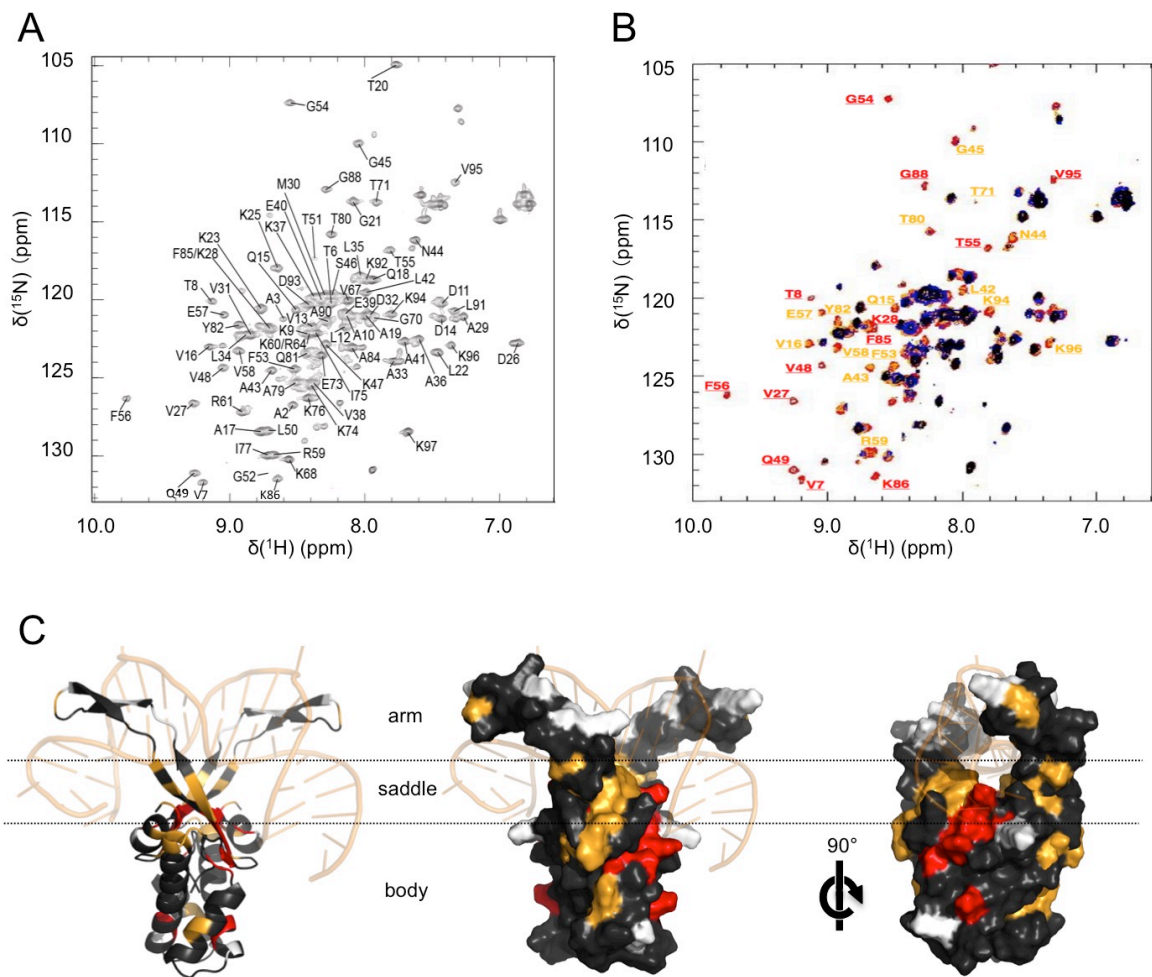


Fig. 5 ssDNA との相互作用による TtHU の 構造変化を示す NMR スペクトル。(A) TtHU 単独 の ^1H - ^{15}N -HSQC スペクトルのシグナル帰属を示した。(B) TtHU の ^1H - ^{15}N -HSQC スペクトルにおいて、ssDNA の滴定で低DNA濃度から変化したシグナル(赤)、続いて変化したシグナル(黄)、を示した。(C) ssDNA の影響を強く受けた部分(赤)、弱く受けた部分(黄)、帰属できなかった部分(白)を TtHU のモデル構造に示した。それぞれ、左は cartoon 表示、右は surface 表示を示した。

8-4. TtHU の細胞生物学的な機能解析

TtHU の細胞生物学的な解析を行うために、TtHU ノックアウト株の構築を試みた。まず、TtHU ノックアウト用プラスミド Δ TtHU/pGEM-HTK、ならびに、ポジティブコントロールとして、すでにノックアウト株の構築が示されている TtRecJ ノックアウト用プラスミド Δ TtRecJ/pGEM-HTK を用いて、TtHB8 の形質転換を行った。TtRecJ においては、一度目の施行で薬剤耐性株が得られ、PCR によって遺伝子組換えの確認ができたことから TtHB8 Δ TtRecJ 株の構築が確認できた。しかし、TtHU においては、複数回施行を繰り返したにもかかわらず、薬剤耐性株が得られなかった。そこで、TtHB8 濃度、ならびに、ノックアウト用プラスミド濃度を上げ、さらに、組換え株セレクション用の薬剤濃度を下げて、同様の実験を行った。結果として、薬剤耐性株は得られたが、PCR で確認すると、組み込まれた薬剤耐性遺伝子だけでなく、TtHU 遺伝子の増幅も見られた。これは、培養を継続しても変わらなかった。これらの結果から、TtHU のノックアウト株は致死であると判断された。

そこで、熱感受性 TtHU を構築し、これをゲノム上の TtHU と組み替えることで、Temperature-inducible TtHU ノックダウン株の構築を試みた。モデル構造を元に、ダイマー形成、および、DNA 結合には関係しない残基から、機能には影響を与えずに安定性を下げると予想される部位を決定した (Fig. 6A)。TtHU の A17 に対して valine (A17V)、isoleucine (A17I)、tryptophan (A17W)、aspartic acid (A17D)、V27 に対して alanine (V27A)、isoleucine (V27I)、tryptophan (V27W)、aspartic acid (V27D)、E57 に対して alanine (E57A)、valine (E57V)、isoleucine (E57I)、tryptophan (E57W)、D92 に対して alanine (D92A)、valine (D92V)、isoleucine (D92I)、tryptophan (D92W)、にそれぞれ置換した TtHU 変異体発現用プラスミドを構築し、それぞれレコンビナントに発現、精製した。続いて、222 nm における CD の値を二次構造の指標として、各 TtHU 変異体、並びに、野生型 TtHU の温度依存的な二次構造の変化を測定した (Fig. 6B)。結果として、親水部 E57、並びに、D92 における変異体に関しては、熱安定性に変化は見られなかったが、疎水コア部 A17、並びに、V27 変異体では、顕著な安定性の低下が見られた。変性中点が、野生型 TtHU では 78°C であったのに対して、特に TtHU-A17V では 54°C、TtHU-V27A では 60°C、TtHU-A17V・V27A では 61°C まで減少した。そこで、それらの熱感受性 TtHU でゲノム上の TtHU を組み替えるプラスミドを構築し、Heat-inducible に TtHU をノックアウトできる株の構築を試みた。TtHB8 の培養温度として、60°C 未満では、増殖速度が極めて遅く実験が困難であったので、A17V 変異体ではなく V27A 変異体を用いて TtHB8_{TtHU-V27A} 株を構築した。しかしながら、70°C、80°C において増殖曲線を観察したが、顕著な差は見られなかった (Fig. 6C)。そこで、TtHB8_{TtHU-A17V} 株 も構築したが、プレート培養で比較したところ、やはり、熱感受性は見られなかった。

これらの結果から、熱感受性 TtHU を用いて Heat-inducible TtHU ノックダウン TtHB8 株を構築することは困難であることが示された。

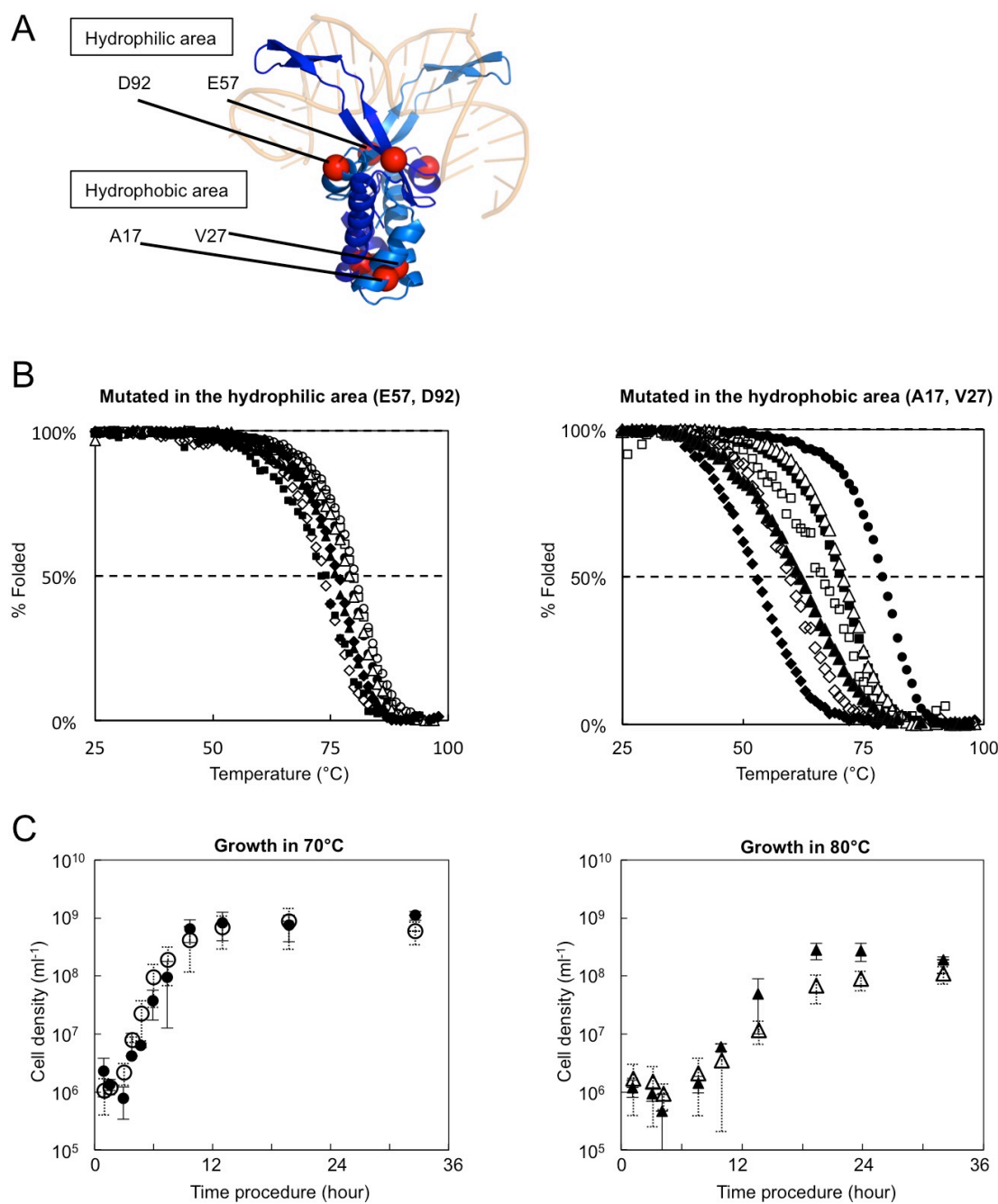


Fig. 6 熱感受性 TtHU、および、熱感受性 TtHU 発現株の構築。(A) 熱感受性 TtHU の構築に際して、変異を導入した残基疎水性部分の A17, V27、および、親水性部分の E57, D92 を示した。(B) TtHU の安定性は、疎水部分における変異によって大きく低下した。ここでは、TtHU 変異体の温度依存的な CD 変化を 222 nm において測定し、天然状態 (% Folded) の割合を計算しプロットした。計算方法は、本文 “方法-Circular dichroism (CD) spectra の測定”、および、Fig. 3C, 3D, 3E を参照とする。左は親水部分の残基 E57, D92 の変異をまとめた。(wild (●), E57V(□), E57I (△), E57W (○), D92A (▲), D92V (■), D92I (◆), D92W (◇)) 右は、疎水部分の残基 A17, V27 の変異をまとめた。(wild (●), A17W (△), A17I (■), A17V (◆), V27A (◇), V27W(□), A17VV27A (▲)) (C) TtHB8_{TtHU-V27A} 株 (○, △)、並びに、野生型 TtHB8 株 (●, ▲) の増殖曲線を 70°C、並びに、80°C で計測した。

8-5. TtHU の翻訳後修飾の探索

HU は DNA 結合タンパク質として多様な機能を持つだけでなく、本研究から、ssDNA、RNA 結合タンパク質としても機能を持つことが示された。これらの機能は調節される必要があると考えられたので、その内在性因子として翻訳後修飾の探索を行った。近年、原核生物の翻訳後修飾プロテオミクス解析が行われ、HU の翻訳後修飾も複数発見されている (Burnside et al., 2010; Gupta et al., 2014; Jin and Pancholi, 2006; Kim et al., 2013; Kosono et al., 2015; Lee et al., 2013; Liao et al., 2014; Macek et al., 2007; Okanishi et al., 2014, 2013; Soares et al., 2013; Udo et al., 2000; Weinert et al., 2013; Wu et al., 2013; Xie et al., 2015; Zhang et al., 2013)。これまで、TtHB8 では、アセチル化プロテオミクス解析、プロピオニル化プロテオミクス解析、リン酸化プロテオミクス解析が行われ、TtHU に関しては、アセチル化とプロピオニル化は発見されているが、リン酸化は発見されていなかった (Okanishi et al., 2014, 2013; Takahata et al., 2012)。しかしながら、他の生物種では HU のリン酸化が見つかっていること、および、*T. thermophilus* HB8 で行われたリン酸化プロテオミクス解析で使用されたチタニアカラムによるリン酸化ペプチドの濃縮は、HU のような塩基性タンパク質の吸着では劣ることを考えると、TtHU がリン酸化されている可能性は捨てきれない。

そこで、まず、細胞内の TtHU のリン酸化の探索を行った。脱リン酸化酵素阻害剤存在下で TtHB8 菌体から TtHU を精製し、チタニアカラム、および、Phos-tag agarose カラムを用いてリン酸化ペプチドの濃縮精製を行った。これを用いて、質量分析によりリン酸化の検出を試みたが、過去のリン酸化プロテオミクス解析と同様に TtHU のリン酸化は検出できなかった。続いて、TtHB8 のゲノムにおいて、配列相同性から脱リン酸化酵素を探索すると、TTHA0187、TTHA1180、TTHA1595、TTHA1853 の 4 つが見つかった。そこで、これら 4 つの脱リン酸化酵素に関して、それぞれの破壊株を構築し、TtHU のリン酸化の検出感度の上昇を試みたが、やはり TtHU のリン酸化の発見には至らなかった。

より検出感度の高い *in vitro* kination による TtHU のリン酸化修飾の探索を行った。*T. thermophilus* HB8 のゲノムにおいて、配列相同性からタンパク質リン酸化酵素を探索すると、TTHA0138、TTHA0843、TTHA1284、TTHA1370、TTHA1594 の 5 つが見つかった。そこで、これら 5 つのリン酸化酵素候補を精製し TtHU に対するリン酸化修飾能を調べた。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて、SDS-PAGE の結果をオートラジオグラフィーで検出した実験の結果、TTHA0138、TTHA1594 によって、TtHU のリン酸化が検出された (**FIG. 7A**)。TTHA1594 の方がより強いリン酸化能を示した。また、TTHA1594 による TtHU のリン酸化量を調べるために、生成物を Phos-tag acrylamide PAGE で分離した結果、CBB 染色でもリン酸化 TtHU が確認できた (**Fig. 7B**)。続いて、TtHU のリン酸化部位の特定を試みた。ATP 存在下で

TtHA1594 と反応させた TtHU をトリプシン消化し、Phos-tag カラム、並びに、タニアカラムを用いてリン酸化ペプチドを濃縮精製した。これを用いて、MALDI TOF-MS による MS 測定を行った結果、TtHU の 77-89 番目の残基からなるペプチド IPATQYPAFKPGK をリン酸化した分子量、並びに、TtHU の 75-89 番目の残基からなるペプチド IKIPATQYPAFKPGK をリン酸化した分子量、に相当するシグナルが検出された。また、nanoLC EI Q-TOF MS を用いた MS/MS 測定を行った結果、リン酸ペプチドとして、EKIKIPAT^PQYPAFKPGK (TtHU の 73-89 番からなるペプチドの^Pがリン酸化)、IKIPAT^PQYPAFKPGK (TtHU の 75-89 番からなるペプチド^Pがリン酸化)、IPAT^PQYPAFKPGK (TtHU の 77-89 番からなるペプチド^Pがリン酸化) が同定された (**Fig. 7C**)。リン酸化部位 T80 を TtHU のモデル構造で見ると、DNA binding arm の付け根の部分に存在した (**Fig. 7E**)。

次に、TtHU の T80 のリン酸化の役割を *in vivo* で解析するために、TtHU の T80 を alanine、aspartic acid、serine、に置換した TtHU-T80A、TtHU-T80D、TtHU-T80S、で、ゲノム上の TtHU 遺伝子を組み替えるプラスミド TtHU-T80A/pHG305、TtHU-T80D/pHG305、TtHU-T80S/pHG305 を構築し、これらを用いて TtHB8 を形質転換することで、TtHB8_{TtHU-T80A} 株、TtHB8_{TtHU-T80D} 株、TtHB8_{TtHU-T80S} 株を構築した。増殖曲線を測定したところ、対数増殖期における増殖速度に差は見られなかったが、誘導期から対数期に移行する時間が、野生型株は培養開始 3 時間後であるのに対して、TtHB8_{TtHU-T80A} 株、TtHB8_{TtHU-T80D} 株では培養開始 6 時間後、となり、変異株では、誘導期 (lag phase) の延長が観察された (**Fig. 7F**)。

TtHU の T80 のリン酸化は DNA-binding arm の付け根にあったことから、DNA 結合能に変化を与える可能性が考えられた。これを検証するため、TtHU-T80A、TtHU-T80D、TtHU-T80S、の発現プラスミドを構築し、レコンビナントに大量発現精製した。ssDNA と dsDNA に対する結合能を比較するため、27 mer oligoF、27 bp dsDNA、37 mer oligoF、37 mer dsDNA を用いた実験を行った。結果として、野生型 TtHU と T80 変異 TtHU とでは、大きな差は見られなかった (**Fig. 8**)。

これらの結果から、TtHU の DNA 結合部位付近がリン酸化酵素特異的にリン酸化修飾を受けることが示されたが、endogenous なリン酸化は発見されなかった。また、T80 のリン酸化は、DNA 結合能には影響を与えずに、細胞の増殖に影響を与えることが示された。

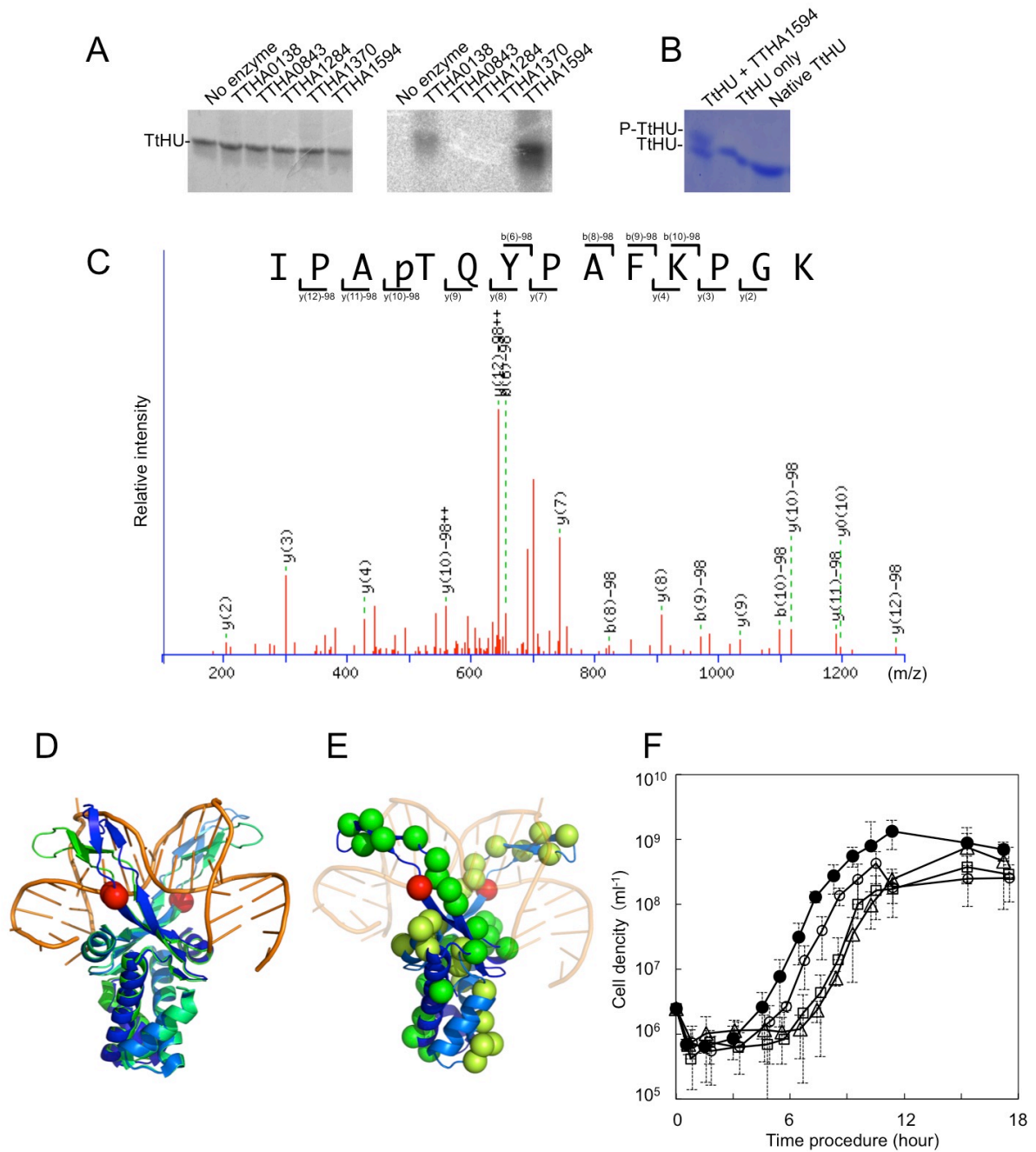


Fig. 7 TtHU の T80 におけるリン酸化修飾。 (A) TtHU は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で TTHA0138 と TTHA1594 によってリン酸化され、オートラジオグラムで検出された。ここでは、CBB 染色 (left) とオートラジオグラム (right) で検出した。 (B) TtHU は TTHA1594 によってリン酸化され、Phos-tag PAGE においてバンドがシフトした。Native の TtHU はほとんどリン酸化されていなかった。ここでは、CBB 染色で検出した。 (C) TTHA1594 による TtHU のリン酸化部位は T80 であった。ここでは、Q-TOF-MS によって MS/MS 解析を行い、リン酸化を検出した時の MS/MS spectrum を示した。 (D) DNA-binding arm の変化を比較するため、HU 単独構造 (PDB ID: 4QJN) (青) と HU-DNA 複合体構造 (PDB ID: 4QJU) (緑) を重ねて示した。TtHU における T80 に相当する残基の Calpha を赤球で示した。 (E) T80 の近傍には Lysine、Arginine が集まっていることを示した。ここでは、HU のモデル構造における T80 を赤球で示し、Lysine 残基、および、Arginine 残基を緑球で示した。 (F) T80 変異型 TtHB8 株は野生型 TtHB8 株と比べて誘導期の延長を示した。ここでは、野生型 (●)、T80A (□)、T80D (△)、T80S (○) を示した。

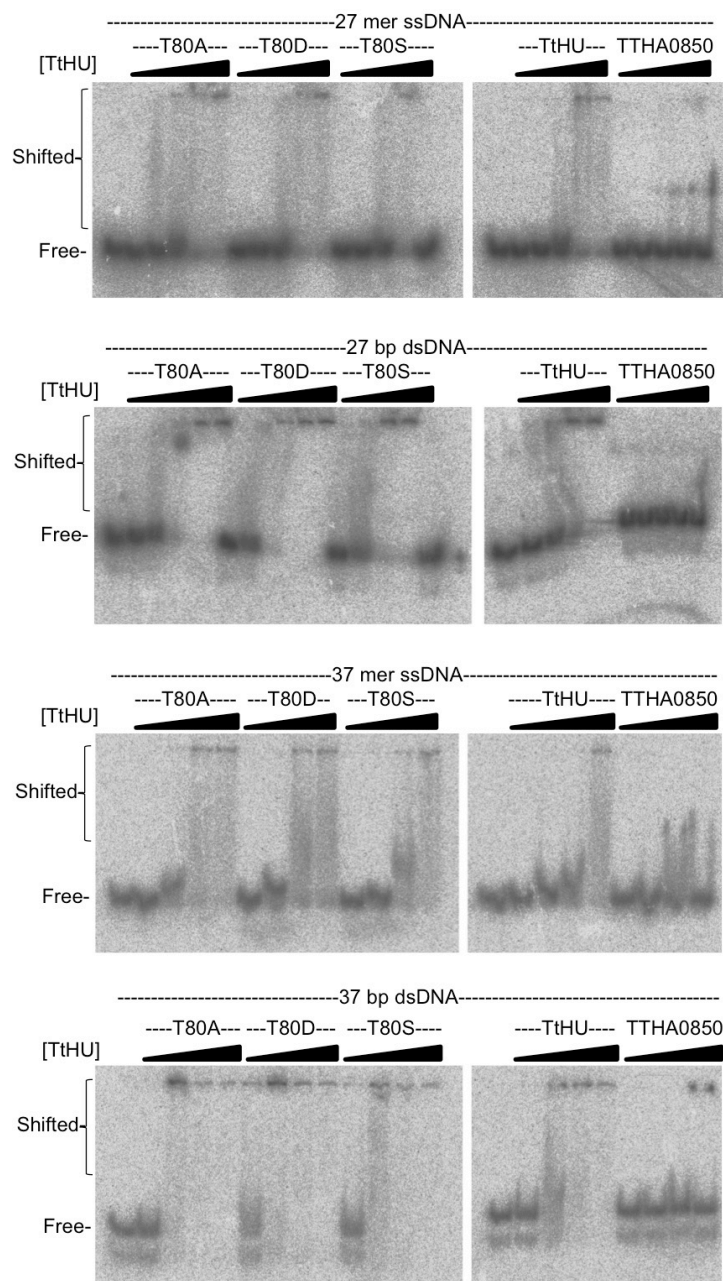


Fig. 8 TtHU 変異体、および、TTHA0850 の各種ヌクレオチドに対する結合能。TtHU は ssDNA と dsDNA におよそ同様に結合した。また、TtHU の T80 変異体は 野生型 TtHU とおよそ同様に結合した。TTHA0850 は、ssDNA と dsDNA の両方に結合能を示した。ここでは、0.1 microM の各 5'-P³² label オリゴ DNA (27 mer ssDNA、27 bp dsDNA、37 mer ssDNA、37 bp dsDNA) と、0–10 microM の各タンパク質を用いて EMSA を行い、オートラジオグラフィーで検出した。

8-6. 新規 NAPs の探索

HU の機能は、内在性因子としての翻訳後修飾による調整だけではなく、他の NAPs との相互作用で調節される可能性が考えられた。しかしながら、TtHB8 においては既知の NPAs の数が少ない。そこで、新規の NAPs が機能している可能性を考えて、その探索を行った。まず、これまでに見つかっている主要な NAPs は細胞内の濃度が高く、*pI* が比較的高いことに注目した。TtHB8 におけるプロテオミクス解析(Kim et al., 2012)を元に、そのような性質の機能未知タンパク質を探索すると TTHA0850 が新規 NAPs の候補として見つかった。TTHA0850 は、配列相同性から *B. subtilis* の BSU16980: stage V sporulation protein S (BsuSpoVS) としてアノテーションされていた(Resnekov et al., 1995) (**Fig. 9A**)。しかしながら、TtHB8 を含めて sporulation (孢子) を形成しない生物種にも保存されていることから孢子形成だけではなく、より一般的な機能も持つと考えられた。これまでに、BsuSpoVS を用いた構造予測が行われ(Rigden and Galperin, 2008)、*Sulfolobus solfataricus* の Alba (Peeters et al., 2015) (SsoAlba) の構造 (PDB ID: 1H0X (Wardleworth, 2002)) との関連が示されていたが、詳細は調べられていなかった。SsoAlba は aecheaea に広く分布する archaeal NAPs の主要なタンパク質であることが知られ、研究が進んでいる (Peeters et al., 2015; Tanaka et al., 2012; Wardleworth, 2002)。そこで、SpoVS が新規の NAPs である可能性を検討するために研究を行った。まず、TTHA0850 の X 線結晶構造が、Alba と類似構造を持つのかどうかを調べた。TTHA0850 の X 線結晶構造 (PDB ID: 2EK0) を元に、構造相同性探索アプリケーションである Dali server (http://www.bioinfo.biocenter.helsinki.fi/dali_server/start) を用いて、構造相同性の高いタンパク質の探索を行った。結果として、残基同一率は 8% と低いが、立体構造の R.M.S.D は 2.6 Å と低いタンパク質として SsoAlba の立体構造 (PDB ID: 1UDV) が示され、BsuSpoVS の構造予測による結果を支持する結果となった (**Fig. 9A**)。実際に立体構造を見比べると、全体的なコンフォメーションが似ているだけでなく、DNA-SsoAlba 複合体の立体構造では、SsoAlba の正に帯電した溝に DNA がはまっていたが、同様の溝が TTHA0850 にもあることがわかった (**Fig. 9B**) (Tanaka et al., 2012)。これらの結果から、TTHA0850 は SsoAlba と同様な DNA 結合タンパク質である可能性が十分に示唆された。そこで、その機能を生化学的に調べるために、TTHA0850 をレコンビナントに大量発現・精製した。続いてプラスミド DNA、ssDNA、dsDNA を用いて EMSA を行ったところ、TTHA0850 は どのヌクレオチドにも結合することが示された(**Fig. 8, 9B**)。その結合は TtHU と比較すると弱いものであったが、安定した結合であることが示された。これは、SsoAlba が dsDNA, ssDNA, RNA に結合することにも一致した(Guo et al., 2003)。

これらの結果から、TTHA0850 が archaeal NAPs である Alba の機能ホモログであることが示され、幅広いヌクレオチドに結合する新規の NAPs である可能性が示された。

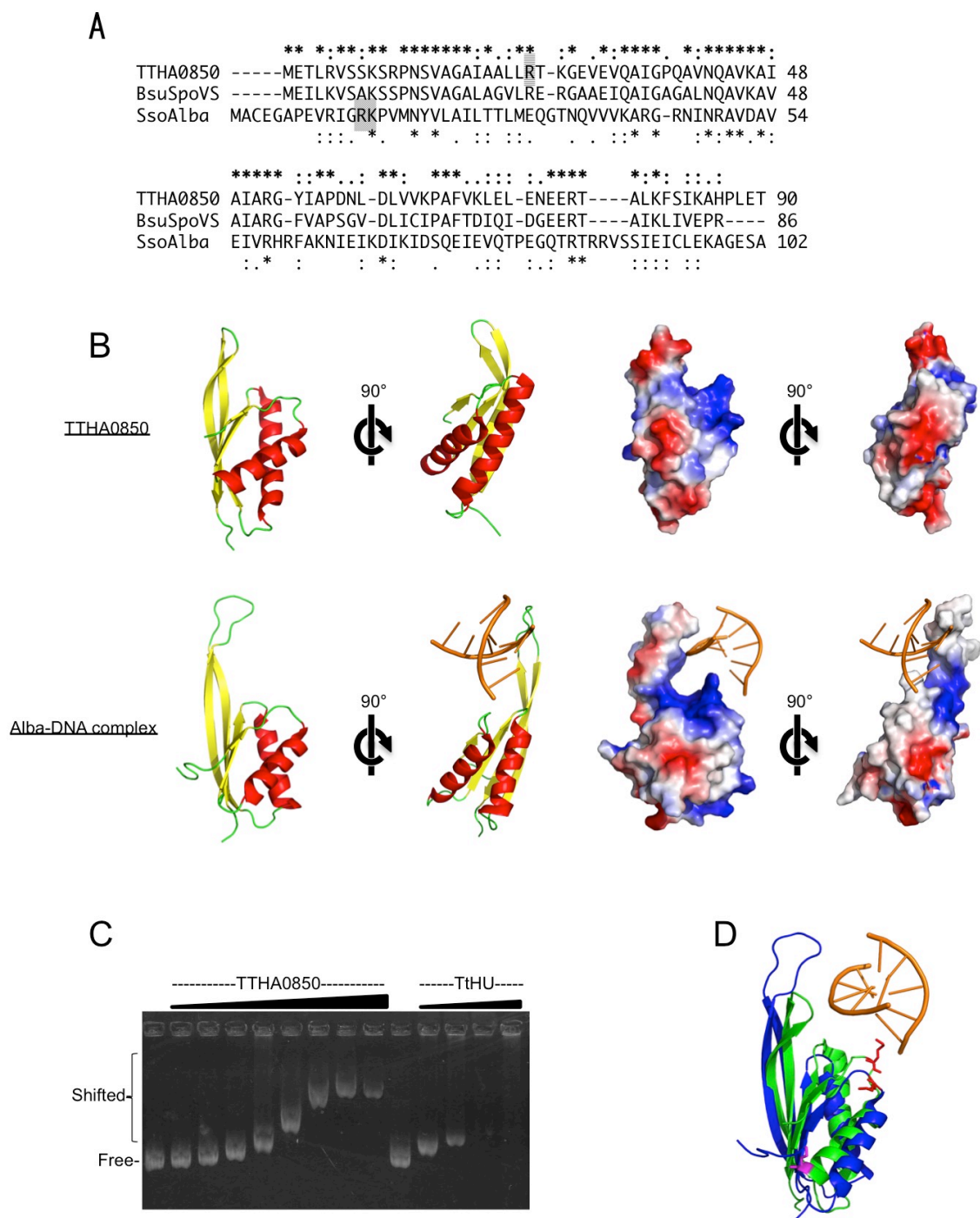


Fig. 9 TTHA0850 と Alba の比較。(A) TTHA0850 と BsuSpoVS の配列同一性は高いが、TTHA0850 と SsoAlba の配列同一性は低かった。ここで、Alba で保存されているアセチル化部位を網掛けで示し、TTHA0850 でアセチル化が発見された部位を横縞で示した。(B) TTHA0850 (PDB ID: 2EK0) の立体構造と Alba-DNA 複合体 (PDB ID: 3U6Y) の立体構造を比較した。右は表面電荷を表し、青は正に帯電した部分、赤は負に帯電した部分を示す。(C) TTHA0850 の DNA 結合能を調べた。ここでは、2.5 ng/microL の pUC119 と 0-40 microM の TTHA0850、または、0-5 microM の TtHU を用いて EMSA を行い、EtBr で DNA を検出した。(D) TTHA0850 (緑) と Alba-DNA 複合体 (青) との立体構を重ね合わせて比較した。Alba における保存されたアセチル化部位を赤色の stick 表示で、TTHA0850 のアセチル化部位はマゼンタの stick 表示で示した。

9. 考察

本研究では、高度好熱菌 *T. thermophilus* HB8 の HU を対象として、HU の機能解明、および、調節機構の解明を目指して研究を行った(Zierer and Choli, 1990; Zierer et al., 1986)。 *T. thermophilus* HB8 のタンパク質は熱に安定で扱いやすく、精製を容易に行うことができるため、生化学的解析に適している(Morita et al., 2010)。また、遺伝子操作系も確立しているため、細胞生理学的な解析も簡易に行うことが可能である(Hashimoto et al., 2001)。さらに、DNA(Yokoyama et al., 2000)、RNA(Agari et al., 2010)、タンパク質(Kim et al., 2012; Okanishi et al., 2014, 2013)、代謝物(Kondo et al., 2008; Ooga et al., 2009)、のそれぞれを対象としたオミックス的解析も行われていることから、それらのデータを利用した研究も行うことができる。加えて、*T. thermophilus* HB8 は、遺伝子数は 2,000 程度と少ないため、遺伝学的な解析も容易に行える。特に今回の研究では、NAPs に関しても 3 種類しかもたないことから、より顕著に HU の多機能性が表現されると考えられた (Table 1)。

ここではまず、原核生物におけるゲノム DNA の構造基盤の維持に重要な役割を持つ HU が、dsDNA 以外のヌクレオチドにも結合することに注目し研究を行った。これまでに、HU が配列非特異的に ssDNA に結合すること、RNA にも強く結合することは示されていたが、それらの具体的な生理機能や構造学的解釈は行われていなかったため、それらの解明を目的として実験を行った。

まず RNA 結合能に関して、TtHU は RNA だけでなくいくつかの RNA 分解酵素とも結合し、それらの活性を阻害することが明らかになった (Fig. 2)。HU が DNA 分解酵素や Topoisomerase の酵素活性を阻害することはすでに示されていたので(Esser et al., 1999; Kamashev and Rouviere-Yaniv, 2000; Mukherjee et al., 2008)、TtHU の RNA 結合能が RNA 分解活性を阻害すること自体は容易に予測された。しかしながら、基質と酵素、両者に結合する状態は、逆に、反応を促進する状態への待機を暗示する。不必要な mRNA を分解することは、速やかな生理機能の適応に不可欠な要素であり(Ohyama et al., 2014)、TtHU が翻訳後修飾等の調節を受けて、RNA 分解活性を促進する可能性も考えられた。

次に、ssDNA との結合に関して、CD を用いた実験から TtHU の二次構造は配列特異的な ssDNA によって減少させられることが示された。222 nm における CD の負の極大は、主に alpha-helix 構造によって生じるとされ(Chen and Yang, 1971; Holzwarth and Doty, 1965)、また、HU では alpha-helix コアが body 部分を形成している。これらの結果から、TtHU は、ssDNA の配列特異的に影響を受け、body 部分の二次構造を大きく変化させる可能性が示唆された。222 nm における負

の極大の減少は、TtHU の二次構造の減少だけでなく、DNA における新たな構造の形成による正の CD の発生も考えられる。しかしながら、今回の結果を説明するほどの正の極大を生じる構造変化はこれまでに発見されていない(Ivanov et al., 1996; Nejedlý et al., 2005)。calf thymus DNA によって CD の負の極大の減少がみられた点については、局所的に生じた ssDNA によると考えられた。

ssDNA による TtHU の構造変化に関して、NMR スペクトルを用いて実験を行った結果、ssDNA の影響に対する感度がマッピングできた。dsDNA-HU 複合体の X 線構造解析では、HU のフレキシブルな arm と saddle 部分が DNA との結合に重要な役割を果たすことが示されていたが、今回の結果では、arm の部分への影響は薄いようであった。これは、HU の arm が dsDNA の副溝にはまるのに対して、ssDNA にはそもそも溝が存在しないことと符合する。また、今回の結果では、モデル構造上では DNA から離れている body の側面にも ssDNA の影響が観測された。HU は全体的にアルギニンとリジンに覆われているので、arm では制御されない一本鎖 DNA が結合したことが推察された。CD の結果と NMR の結果とを足し合わせて考えると、ssDNA と TtHU の特殊な結合の結果、最終的に alpha-helix コアが構造変化を起こすことが示唆された。

これらの結果から、HU による ssDNA 結合能に関して、はじめて構造学的な知見が得られた。この現象が生理的にどのような意味を持つかを解明するためにはさらなる研究が必要であるが、HU の DNA 結合能を調節するという点で、一本鎖 DNA、あるいは RNA をシグナルとして、HU の立体構造を変化させ、機能的多様性を獲得するという作業仮説、を今後検証していく価値があると思われる。

TtHU の機能を細胞生物学的に解析するために TtHU ノックアウト株の作成を試みたが、致死であると判断された。これは、TtHB8 の NAPs が少なく、*D. radiodurans* において HU ノックアウト株が致死であったことと一致する(Bartels et al., 2001; Liu et al., 2008; Nguyen et al., 2009; Toueille et al., 2012)。しかしながら、熱感受性 TtHU を組み込んだ Heat-inducible な TtHU ノックダウン株は 80°C でも野生型と同様の表現型を示した。この原因としては、生体内の TtHU の安定性は著しく上昇させられる可能性、および、TtHU の alpha-helix コアの部分の二次構造は TtHU の機能に重要でない可能性が考えられる。これらの結果から、より効率良くノックダウン株を構築するには、anti-sense RNA による mRNA の抑制や、温度感受性プラスミドなど、タンパク質より前の段階で行うことが望ましいことが示唆された。

HU の多機能性を調節する因子としてまず、翻訳後修飾に注目し、ここでは、特に TtHU のリン酸化修飾の探索を行った。結果として、TtHU の T80 が酵素特異

的にリン酸化され、生体内でも何がしかの機能を調節している可能性が示唆された (**Fig. 7C、7F**)。

T80 リン酸化ミミック、および、脱リン酸化ミミックでは、増殖曲線において、同様な誘導期 (lag phase) の延長が観察された。また、endogenous な TtHU からはリン酸化が検出されなかった (**Fig. 8B**)。これらの結果から、T80 のリン酸化は厳密な制御を受けており、その微細なリン酸化制御が TtHB8 が誘導期から対数増殖期に移行する際のシグナルとして働くことが示唆された。大腸菌においては、増殖期特異的な NAPs の変異によって今回と同様に誘導期の延長が見られることが報告されている (Dillon and Dorman, 2010; Nafissi et al., 2012; Nair and Finkel, 2004)。TtHB8 はそれらの NAPs を持っていないが、TtHU が翻訳後修飾によって、他の NAPs の役割と切り替わることが考えられた。

DNA 結合能を調べた実験では、野生型 TtHU と変異型 TtHU とで差が出なかった (**Fig. 8**)。これまでに報告されている立体構造において T80 に相当する部位を検討すると、DNA 結合に伴い折れ曲がるヒンジの部分であることがわかった (**Fig. 7D**)。また、HU 単独で決定された種々の X 線結晶構造解析の結果では B-factor が T80 より先の部分で高くなっており、NMR によって決定された構造でも T80 より先の部分では NME の負の落ち込みが見られた (Vis et al., 1995)。さらに、TtHU のモデル構造を見ると、T80 の隣の beta-sheet に Lysine、Arginine が連なっていたことから、T80 のリン酸化はそれらの残基に影響を与えることが推察された (**Fig. 7E**)。これらのことから、T80 が TtHU の DNA-binding arm の要になっている可能性は十分に考えられ、T80 のリン酸化は TtHU の DNA 結合能ではなく、DNA の構造を変化させる役割が示唆された。

既知の NAPs の数が少ない種でも、複雑な DNA の機能が問題なく調節されているのは、新規の NAPs が機能しているからであると仮定して、新規の NAPs の探索を行った。結果として、archaeal NAPs である Alba の機能ホモログであると考えられる TTHA0850 を発見した (**Fig. 9**)。Alba は機能的には HU と似通っていることが種々の実験によって示されている (Peeters et al., 2015; Tanaka et al., 2012)。

HU における翻訳後修飾は多数発見されているが、その機能的な役割に関してはあまり研究が進んでいないが、Alba のヌクレオチド結合能は K16, K17 のアセチル化によって阻害されることが知られる (Marsh et al., 2005; Peeters et al., 2015)。TTHA0850 と Alba の立体構造を比較すると、TTHA0850 の K9 が Alba の K16 と近い場所にあった (**Fig. 9D**)。また、TtHB8 におけるアセチル化プロテオミクス解析において、TTHA0850 は K26 のアセチル化が報告されていた (Okanishi et al., 2013)。ここから、TTHA0850 も翻訳後修飾によって機能を調整される NAPs である可能性が推察される。

本研究では、まず、二本鎖 DNA 結合タンパク質である HU が持つ一本鎖ヌクレオチド結合能の詳細を調べるために研究を行い、RNA 結合能として TtHU が RNA の保護に働くこと、および、配列特異的な ssDNA とは既知の機構と異なる構造で結合することが示された。特に、これまでの HU の研究では、すでに決定されている dsDNA-HU 複合体の結晶構造を元に考察されてきたので、今回の ssDNA に対する構造学的知見は大きな意義を持つ。次に、多機能な HU の機能調節機構として、新規に T80 におけるリン酸化修飾を発見した。この修飾は、DNA 結合能自体に影響は与えないが、他の NAPs の機能との類似性に寄与することが示唆された。ここから、過去のプロテオーム解析で発見されている他の翻訳後修飾も、TtHU に集約されている機能の使い分けに関与している可能性が推察された。さらに、TtHB8 の NAPs の少なさを補い、HU を助ける要素として新規の NAPs 候補を発見した。加えて、TTHA0850 は HU と同様に多様な機能が集約されている可能性も示された。これらの結果は、原核生物における DNA の関わる様々な現象は、これまで考えられている以上に複雑な要素によって調整されている可能性を示唆する。

10. 参考文献

- Agari, Y., Sakamoto, K., Tamakoshi, M., Oshima, T., Kuramitsu, S., Shinkai, A., 2010. Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J. Mol. Biol.* 395, 270–81. doi:10.1016/j.jmb.2009.10.057
- Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A., 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181, 6361–70.
- Azam, T.A., Ishihama, A., 1999. Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli*: SEQUENCE RECOGNITION SPECIFICITY AND DNA BINDING AFFINITY. *J. Biol. Chem.* 274, 33105–33113. doi:10.1074/jbc.274.46.33105
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., Rouviere-Yaniv, J., 2001. The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. *Mol. Microbiol.* 39, 1069–1079. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02305.x
- Balandina, A., Kamashev, D., Rouviere-Yaniv, J., 2002. The bacterial histone-like protein HU specifically recognizes similar structures in all nucleic acids. DNA, RNA, and their hybrids. *J. Biol. Chem.* 277, 27622–8. doi:10.1074/jbc.M201978200
- Bartels, F., Fernández, S., Holtel, A., Timmis, K.N., de Lorenzo, V., 2001. The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J. Biol. Chem.* 276, 16641–8. doi:10.1074/jbc.M011295200
- Berger, M., Farcas, A., Geertz, M., Zhelyazkova, P., Brix, K., Travers, A., Muskhelishvili, G., 2010. Coordination of genomic structure and transcription by the main bacterial nucleoid-associated protein HU. *EMBO Rep.* 11, 59–64. doi:10.1038/embor.2009.232
- Bhowmick, T., Ghosh, S., Dixit, K., Ganesan, V., Ramagopal, U.A., Dey, D., Sarma, S.P., Ramakumar, S., Nagaraja, V., 2014. Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors. *Nat. Commun.* 5, 4124. doi:10.1038/ncomms5124
- Bianchi, M.E., 1994. Prokaryotic HU and eukaryotic HMG1: a kinked relationship. *Mol. Microbiol.* 14, 1–5. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb01261.x
- Boubrik, F., Rouviere-Yaniv, J., 1995. Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3958–62.

- Browning, D.F., Grainger, D.C., Busby, S.J., 2010. Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 773–80. doi:10.1016/j.mib.2010.09.013
- Burnside, K., Lembo, A., de Los Reyes, M., Iliuk, A., Binhtran, N.-T., Connelly, J.E., Lin, W.-J., Schmidt, B.Z., Richardson, A.R., Fang, F.C., Tao, W.A., Rajagopal, L., 2010. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One* 5, e11071. doi:10.1371/journal.pone.0011071
- Chen, Y.-H., Yang, J.T., 1971. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1285–1291. doi:10.1016/S0006-291X(71)80225-5
- Collier, C., Machón, C., Briggs, G.S., Smits, W.K., Soutanas, P., 2012. Untwisting of the DNA helix stimulates the endonuclease activity of *Bacillus subtilis* Nth at AP sites. *Nucleic Acids Res.* 40, 739–50. doi:10.1093/nar/gkr785
- Devaraj, A., Justice, S.S., Bakaletz, L.O., Goodman, S.D., 2015. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol. Microbiol.* 96, 1119–35. doi:10.1111/mmi.12994
- Dijk, J., White, W., Wilson, K.K.S., Appelt, K., White, S., Wilson, K.K.S., Appelt, K., 1983. On the DNA binding protein II from *Bacillus stearothermophilus*. I. Purification, studies in solution, and crystallization. *J. Biol. Chem.* 258, 4003–4006.
- Dillon, S.C., Dorman, C.J., 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 185–95. doi:10.1038/nrmicro2261
- Dixon, N.E., Kornberg, A., 1984. Protein HU in the enzymatic replication of the chromosomal origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 424–8.
- Donczew, R., Zakrzewska-Czerwińska, J., Zawilak-Pawlik, A., 2014. Beyond DnaA: the role of DNA topology and DNA methylation in bacterial replication initiation. *J. Mol. Biol.* 426, 2269–82. doi:10.1016/j.jmb.2014.04.009
- Dorman, C.J., Deighan, P., 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 179–184. doi:10.1016/S0959-437X(03)00025-X
- Dri, A.M., Rouviere-Yaniv, J., Moreau, P.L., 1991. Inhibition of cell division in hupA hupB mutant bacteria lacking HU protein. *J. Bacteriol.* 173, 2852–63.

- Drlica, K., Rouviere-Yaniv, J., 1987. Histonelike proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* 51, 301–19.
- Esser, D., Rudolph, R., Jaenicke, R., Böhm, G., 1999. The HU protein from *Thermotoga maritima*: recombinant expression, purification and physicochemical characterization of an extremely hyperthermophilic DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.* 291, 1135–46. doi:10.1006/jmbi.1999.3022
- Flashner, Y., Gralla, J.D., 1988. DNA dynamic flexibility and protein recognition: Differential stimulation by bacterial histone-like protein HU. *Cell* 54, 713–721. doi:10.1016/S0092-8674(88)80016-3
- Geider, K., Hoffmann-Berling, H., 1981. Proteins controlling the helical structure of DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 233–60. doi:10.1146/annurev.bi.50.070181.001313
- Ghosh, S., Grove, A., 2006. The *Deinococcus radiodurans*-encoded HU protein has two DNA-binding domains. *Biochemistry* 45, 1723–33. doi:10.1021/bi0514010
- Ghosh, S., Grove, A., 2004. Histone-like Protein HU from *Deinococcus radiodurans* Binds Preferentially to Four-way DNA Junctions. *J. Mol. Biol.* 337, 561–571.
- Grove, A., 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* 13, 1–12. doi:v13/1 [pii]
- Guo, R., Xue, H., Huang, L., 2003. Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo. *Mol. Microbiol.* 50, 1605–1615. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03793.x
- Gupta, M., Sajid, A., Sharma, K., Ghosh, S., Arora, G., Singh, R., Nagaraja, V., Tandon, V., Singh, Y., 2014. HupB, a nucleoid associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by Serine/Threonine Protein Kinases in vivo. *J. Bacteriol.* JB.01625–14–. doi:10.1128/JB.01625-14
- Hashimoto, Y., Yano, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., 2001. Disruption of *Thermus thermophilus* genes by homologous recombination using a thermostable kanamycin-resistant marker. *FEBS Lett.* 506, 231–234. doi:10.1016/S0014-5793(01)02926-X
- Holck, A., Kleppe, K., 1985. Affinity of protein HU for different nucleic acids. *FEBS Lett.* 185, 121–124. doi:10.1016/0014-5793(85)80753-5
- Holzwarth, G., Doty, P., 1965. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides 1. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 218–228. doi:10.1021/ja01080a015
- Hoseki, J., Yano, T., Koyama, Y., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., 1999. Directed Evolution of Thermostable Kanamycin-Resistance Gene: A Convenient Selection

- Marker for *Thermus thermophilus*. *J. Biochem.* 126, 951–956.
doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022539
- Huisman, O., Faelen, M., Girard, D., Jaffé, A., Toussaint, A., Rouvière-Yaniv, J., 1989. Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J. Bacteriol.* 171, 3704–12.
- Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R., 2006. Crystal structure of TTHA0252 from *Thermus thermophilus* HB8, a RNA degradation protein of the metallo-beta-lactamase superfamily. *J. Biochem.* 140, 535–42.
doi:10.1093/jb/mvj183
- Ivanov, V.I., Minchenkova, L.E., Burckhardt, G., Birch-Hirschfeld, E., Fritzsche, H., Zimmer, C., 1996. The detection of B-form/A-form junction in a deoxyribonucleotide duplex. *Biophys. J.* 71, 3344–9.
doi:10.1016/S0006-3495(96)79527-9
- Jeon, J.-H., Adamcik, J., Dietler, G., Metzler, R., 2010. Supercoiling induces denaturation bubbles in circular DNA. *Phys. Rev. Lett.* 105, 208101.
doi:10.1103/PhysRevLett.105.208101
- Jin, H., Pancholi, V., 2006. Identification and Biochemical Characterization of a Eukaryotic-type Serine/Threonine Kinase and its Cognate Phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: Their Biological Functions and Substrate Identification. *J. Mol. Biol.* 357, 1351–1372.
- Kamashev, D., Balandina, A., Mazur, A.K., Arimondo, P.B., Rouviere-Yaniv, J., 2008. HU binds and folds single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* 36, 1026–36.
doi:10.1093/nar/gkm667
- Kamashev, D., Oberto, J., Serebryakova, M., Gorbachev, A., Zhukova, Y., Levitskii, S., Mazur, A.K., Govorun, V., 2011. *Mycoplasma gallisepticum* produces a histone-like protein that recognizes base mismatches in DNA. *Biochemistry* 50, 8692–702. doi:10.1021/bi2009097
- Kamashev, D., Rouviere-Yaniv, J., 2000. The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *EMBO J.* 19, 6527–35. doi:10.1093/emboj/19.23.6527
- Kim, D., Yu, B.J., Kim, J.A., Lee, Y.-J., Choi, S.-G., Kang, S., Pan, J.-G., 2013. The acetylproteome of Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. *Proteomics* 13, 1726–36. doi:10.1002/pmic.201200001
- Kim, J., Yoshimura, S.H., Hizume, K., Ohniwa, R.L., Ishihama, A., Takeyasu, K., 2004. Fundamental structural units of the *Escherichia coli* nucleoid revealed by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 32, 1982–92. doi:10.1093/nar/gkh512

- Kim, J.S., Boysen, R.I., Schröder, W., Erdmann, A., Gessner, R. V, Schroder, W., Erdmann, V.A., 1996. Identification, purification and partial sequence of four *Thermus thermophilus* 5S rRNA binding proteins. *Endocytobiosis Cell Res.* 11, 177–194.
- Kim, K., Okanishi, H., Masui, R., Harada, A., Ueyama, N., Kuramitsu, S., 2012. Whole-cell proteome reference maps of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Proteomics* 12, 3063–8. doi:10.1002/pmic.201100375
- Kondo, N., Nishikubo, T., Wakamatsu, T., Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R., 2008. Insights into different dependence of dNTP triphosphohydrolase on metal ion species from intracellular ion concentrations in *Thermus thermophilus*. *Extremophiles* 12, 217–23. doi:10.1007/s00792-007-0118-6
- Kosono, S., Tamura, M., Suzuki, S., Kawamura, Y., Yoshida, A., Nishiyama, M., Yoshida, M., 2015. Changes in the Acetylome and Succinylome of *Bacillus subtilis* in Response to Carbon Source. *PLoS One* 10, e0131169. doi:10.1371/journal.pone.0131169
- Krylov, A.S., 2001. Massive parallel analysis of the binding specificity of histone-like protein HU to single- and double-stranded DNA with generic oligodeoxyribonucleotide microchips. *Nucleic Acids Res.* 29, 2654–2660. doi:10.1093/nar/29.12.2654
- Kundukad, B., Cong, P., van der Maarel, J.R.C., Doyle, P.S., 2013. Time-dependent bending rigidity and helical twist of DNA by rearrangement of bound HU protein. *Nucleic Acids Res.* 41, 8280–8. doi:10.1093/nar/gkt593
- Le Meur, R., Culard, F., Nadan, V., Goffinont, S., Coste, F., Guerin, M., Loth, K., Landon, C., Castaing, B., 2015. The nucleoid-associated protein HU enhances 8-oxoguanine base excision by the formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Biochem. J.* 471, 13–23. doi:10.1042/BJ20150387
- Lee, D.-W., Kim, D., Lee, Y.-J., Kim, J.-A., Choi, J.Y., Kang, S., Pan, J.-G., 2013. Proteomic analysis of acetylation in thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Proteomics* 13, 2278–82. doi:10.1002/pmic.201200072
- Lewis, D.E.A., Geanakopulos, M., Adhya, S., 1999. Role of HU and DNA supercoiling in transcription repression: specialized nucleoprotein repression complex at gal promoters in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31, 451–461. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01186.x
- Liao, G., Xie, L., Li, X., Cheng, Z., Xie, J., 2014. Unexpected extensive lysine acetylation in the trump-card antibiotic producer *Streptomyces roseosporus*

- revealed by proteome-wide profiling. *J. Proteomics* 106, 260–9.
doi:10.1016/j.jprot.2014.04.017
- Liu, D., Yumoto, H., Murakami, K., Hirota, K., Ono, T., Nagamune, H., Kayama, S., Matsuo, T., Miyake, Y., 2008. The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. *Mol. Microbiol.* 68, 1268–82. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06232.x
- Luijsterburg, M.S., Noom, M.C., Wuite, G.J.L., Dame, R.T., 2006. The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.* 156, 262–72.
doi:10.1016/j.jsb.2006.05.006
- Lynch, T.W., Read, E.K., Mattis, A.N., Gardner, J.F., Rice, P.A., 2003. Integration Host Factor: Putting a Twist on Protein–DNA Recognition. *J. Mol. Biol.* 330, 493–502. doi:10.1016/S0022-2836(03)00529-1
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J. V., Gnäd, F., Kumar, C., Jensen, P.R., Mann, M., 2007. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 697–707.
doi:10.1074/mcp.M600464-MCP200
- Macvanin, M., Edgar, R., Cui, F., Trostel, A., Zhurkin, V., Adhya, S., 2012. Noncoding RNAs binding to the nucleoid protein HU in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194, 6046–55. doi:10.1128/JB.00961-12
- Marsh, V.L., Peak-Chew, S.Y., Bell, S.D., 2005. Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, Alba. *J. Biol. Chem.* 280, 21122–8.
doi:10.1074/jbc.M501280200
- Maurer, S., Fritz, J., Muskhelishvili, G., 2009. A systematic in vitro study of nucleoprotein complexes formed by bacterial nucleoid-associated proteins revealing novel types of DNA organization. *J. Mol. Biol.* 387, 1261–76.
doi:10.1016/j.jmb.2009.02.050
- Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H., Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R., Kuramitsu, S., 2010. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: a comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J. Nucleic Acids* 2010, 179594. doi:10.4061/2010/179594
- Mukherjee, A., Sokunbi, A.O., Grove, A., 2008. DNA protection by histone-like protein HU from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. *Nucleic Acids Res.* 36, 3956–3968. doi:10.1093/nar/gkn348

- Nafissi, M., Chau, J., Xu, J., Johnson, R.C., 2012. Robust translation of the nucleoid protein Fis requires a remote upstream AU element and is enhanced by RNA Secondary Structure. *J. Bacteriol.* 194, 2458–2469. doi:10.1128/JB.00053-12
- Nair, S., Finkel, S.E., 2004. Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase. *J Bacteriol* 186, 4192–8. doi:10.1128/JB.186.13.4192
- Nakamura, K., Yahagi, S. -i., Yamazaki, T., Yamane, K., 1999. Bacillus subtilis Histone-like Protein, HBSu, Is an Integral Component of a SRP-like Particle That Can Bind theAlu Domain of Small Cytoplasmic RNA. *J. Biol. Chem.* 274, 13569–13576. doi:10.1074/jbc.274.19.13569
- Nejedlý, K., Chládková, J., Vorlíckov, M., Hrabcová, I., Kypr, J., 2005. Mapping the B-A conformational transition along plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 33, e5. doi:10.1093/nar/gni008
- Nguyen, H.H., de la Tour, C.B., Toueille, M., Vannier, F., Sommer, S., Servant, P., 2009. The essential histone-like protein HU plays a major role in Deinococcus radiodurans nucleoid compaction. *Mol. Microbiol.* 73, 240–52. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06766.x
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., Rouviere-Yaniv, J., 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* 4, e4367. doi:10.1371/journal.pone.0004367
- Ohyama, H., Sakai, T., Agari, Y., Fukui, K., Nakagawa, N., Shinkai, A., Masui, R., Kuramitsu, S., 2014. The role of ribonucleases in regulating global mRNA levels in the model organism Thermus thermophilus HB8. *BMC Genomics* 15, 386. doi:10.1186/1471-2164-15-386
- Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., Kuramitsu, S., 2014. Lysine Propionylation Is a Prevalent Post-translational Modification in Thermus thermophilus. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 2382–2398. doi:10.1074/mcp.M113.035659
- Okanishi, H., Kim, K., Masui, R., Kuramitsu, S., 2013. Acetylome with structural mapping reveals the significance of lysine acetylation in Thermus thermophilus. *J. Proteome Res.* 12, 3952–68. doi:10.1021/pr400245k
- Ooga, T., Ohashi, Y., Kuramitsu, S., Koyama, Y., Tomita, M., Soga, T., Masui, R., 2009. Degradation of ppGpp by nudix pyrophosphatase modulates the transition of growth phase in the bacterium Thermus thermophilus. *J. Biol. Chem.* 284, 15549–56. doi:10.1074/jbc.M900582200

- Peeters, E., Driessen, R.P.C., Werner, F., Dame, R.T., 2015. The interplay between nucleoid organization and transcription in archaeal genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 333–41. doi:10.1038/nrmicro3467
- Qian, Z., Macvanin, M., Dimitriadis, E.K., He, X., Zhurkin, V., Adhya, S., 2015. A New Noncoding RNA Arranges Bacterial Chromosome Organization. *MBio* 6, e00998–15–. doi:10.1128/mBio.00998-15
- Resnekov, O., Driks, A., Losick, R., 1995. Identification and characterization of sporulation gene *spoVS* from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 5628–5635.
- Rigden, D.J., Galperin, M.Y., 2008. Sequence analysis of *GerM* and *SpoVS*, uncharacterized bacterial “sporulation” proteins with widespread phylogenetic distribution. *Bioinformatics* 24, 1793–7. doi:10.1093/bioinformatics/btn314
- Rouvière-Yaniv, J., Gros, F., 1975. Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3428–32.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M., Germond, J.-E., 1979. *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. *Cell* 17, 265–274. doi:10.1016/0092-8674(79)90152-1
- Sato, Y.T., Watanabe, S., Kenmotsu, T., Ichikawa, M., Yoshikawa, Y., Teramoto, J., Imanaka, T., Ishihama, A., Yoshikawa, K., 2013. Structural change of DNA induced by nucleoid proteins: growth phase-specific *Fis* and stationary phase-specific *Dps*. *Biophys. J.* 105, 1037–44. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.025
- Soares, N.C., Spät, P., Krug, K., Macek, B., 2013. Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J. Proteome Res.* 12, 2611–21. doi:10.1021/pr3011843
- Stavans, J., Oppenheim, A., 2006. DNA-protein interactions and bacterial chromosome architecture. *Phys. Biol.* 3, R1–10. doi:10.1088/1478-3975/3/4/R01
- Suryanarayana, T., Subramanian, A.R., 1978. Specific association of two homologous DNA-binding proteins to the native 30-S ribosomal subunits of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 520, 342–57.
- Swinger, K.K., Lemberg, K.M., Zhang, Y., Rice, P.A., 2003. Flexible DNA bending in HU-DNA cocrystal structures. *EMBO J.* 22, 3749–60. doi:10.1093/emboj/cdg351
- Swinger, K.K., Rice, P.A., 2007. Structure-based analysis of HU-DNA binding. *J. Mol. Biol.* 365, 1005–16. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.024
- Swinger, K.K., Rice, P.A., 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 28–35. doi:10.1016/j.sbi.2003.12.003

- Takahata, Y., Inoue, M., Kim, K., Iio, Y., Miyamoto, M., Masui, R., Ishihama, Y., Kuramitsu, S., 2012. Close proximity of phosphorylation sites to ligand in the phosphoproteome of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proteomics* 12, 1414–30. doi:10.1002/pmic.201100573
- Tanaka, I., Appelt, K., Dijk, J., White, S.W., Wilson, K.S., 1984. 3-Å resolution structure of a protein with histone-like properties in prokaryotes. *Nature* 310, 376–381. doi:10.1038/310376a0
- Tanaka, T., Padavattan, S., Kumarevel, T., 2012. Crystal structure of archaeal chromatin protein Alba2-double-stranded DNA complex from *Aeropyrum pernix* K1. *J. Biol. Chem.* 287, 10394–402. doi:10.1074/jbc.M112.343210
- Tjokro, N.O., Rocco, C.J., Priyadarshini, R., Davey, M.E., Goodman, S.D., 2014. A biochemical analysis of the interaction of *Porphyromonas gingivalis* HU PG0121 protein with DNA. *PLoS One* 9, e93266. doi:10.1371/journal.pone.0093266
- Touelle, M., Mirabella, B., Guérin, P., Bouthier de la Tour, C., Boisnard, S., Nguyen, H.H., Blanchard, L., Servant, P., de Groot, A., Sommer, S., Armengaud, J., 2012. A comparative proteomic approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J. Proteomics* 75, 2588–600. doi:10.1016/j.jprot.2012.03.002
- Udo, H., Lam, C.K., Mori, S., Inouye, M., Inouye, S., 2000. Identification of a substrate for Pkn2, a protein Ser/Thr kinase from *Myxococcus xanthus* by a novel method for substrate identification. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 557–63.
- Vis, H., Mariani, M., Vorgias, C.E., Wilson, K.S., Kaptein, R., Boelens, R., 1995. Solution structure of the HU protein from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.* 254, 692–703. doi:10.1006/jmbi.1995.0648
- Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., Laue, E.D., 2005. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687–96. doi:10.1002/prot.20449
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T., Imamoto, F., 1988. Construction and characterization of the deletion mutant of hupA and hupB genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 204, 581–591. doi:10.1016/0022-2836(88)90357-9
- Wakamatsu, T., Kitamura, Y., Kotera, Y., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., Masui, R., 2010. Structure of RecJ exonuclease defines its specificity for single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 285, 9762–9. doi:10.1074/jbc.M109.096487
- Wang, G., Maier, R.J., 2015. Bacterial histone-like proteins: roles in stress resistance. *Curr. Genet.* 61, 489–92. doi:10.1007/s00294-015-0478-x

- Wardleworth, B.N., 2002. Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *EMBO J.* 21, 4654–4662. doi:10.1093/emboj/cdf465
- Weinert, B.T., Iesmantavicius, V., Wagner, S.A., Schölz, C., Gummesson, B., Beli, P., Nyström, T., Choudhary, C., 2013. Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*. *Mol. Cell* 51, 265–72. doi:10.1016/j.molcel.2013.06.003
- Whiteford, D.C., Klingelhoets, J.J., Bambenek, M.H., Dahl, J.L., 2011. Deletion of the histone-like protein (Hlp) from *Mycobacterium smegmatis* results in increased sensitivity to UV exposure, freezing and isoniazid. *Microbiology* 157, 327–35. doi:10.1099/mic.0.045518-0
- Wu, X., Vellaichamy, A., Wang, D., Zamdborg, L., Kelleher, N.L., Huber, S.C., Zhao, Y., 2013. Differential lysine acetylation profiles of *Erwinia amylovora* strains revealed by proteomics. *J. Proteomics* 79, 60–71. doi:10.1016/j.jprot.2012.12.001
- Xie, L., Liu, W., Li, Q., Chen, S., Xu, M., Huang, Q., Zeng, J., Zhou, M., Xie, J., 2015. First succinyl-proteome profiling of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* revealed involvement of succinylation in cellular physiology. *J. Proteome Res.* 14, 107–19. doi:10.1021/pr500859a
- Yamazaki, T., Yahagi, S., Nakamura, K., Yamane, K., 1999. Depletion of *Bacillus subtilis* histone-like protein, HBSu, causes defective protein translocation and induces upregulation of small cytoplasmic RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 211–214. doi:S0006291X99906150 [pii]
- Yokoyama, S., Hirota, H., Kigawa, T., Yabuki, T., Shirouzu, M., Terada, T., Ito, Y., Matsuo, Y., Kuroda, Y., Nishimura, Y., Kyogoku, Y., Miki, K., Masui, R., Kuramitsu, S., 2000. Structural genomics projects in Japan. *Nat. Struct. Biol.* 7, 943 – 945.
- Zelwer, C., 1995. HU Protein of *Escherichia coli* Binds Specifically to DNA That Contains Single-strand Breaks or Gaps. *J. Biol. Chem.* 270, 10291–10296. doi:10.1074/jbc.270.17.10291
- Zhang, K., Zheng, S., Yang, J.S., Chen, Y., Cheng, Z., 2013. Comprehensive profiling of protein lysine acetylation in *Escherichia coli*. *J. Proteome Res.* 12, 844–51. doi:10.1021/pr300912q
- Zhang, X., Zhu, Q., Tian, T., Zhao, C., Zang, J., Xue, T., Sun, B., 2015. Identification of RNAIII-binding proteins in *Staphylococcus aureus* using tethered RNAs and streptavidin aptamers based pull-down assay. *BMC Microbiol.* 15, 102. doi:10.1186/s12866-015-0435-3

- Zierer, R., Choli, D., 1990. The primary structure of DNA binding protein II from the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. FEBS Lett. 273, 59–62.
doi:10.1016/0014-5793(90)81050-X
- Zierer, R., Grote, M., Dijk, J., Wilson, K., 1986. A DNA binding protein from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. FEBS Lett. 194, 235–241.
doi:10.1016/0014-5793(86)80091-6

11. 業績

11-1. 原著論文 (査読有り)

Nishida, Y., Shintani, Y., Takashima, S., Kuramitsu, S., and Mikawa, T.
Nucleoid-associated protein HU from *Thermus thermophilus* HB8, has unique
nucleotide-binding activity
投稿準備中

Iino, H., Hikima, T., Nishida, Y., Yamamoto, M., Kuramitsu, S., and Fukui, K. (2015)
Small-angle X-ray scattering analysis reveals the ATP-bound monomeric state of the
ATPase domain from the homodimeric MutL endonuclease, a GHKL
phosphotransferase superfamily protein.
Extremophiles **19**, 643-656

Nishida, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R.
(2010)
Crystal structure of an archaeal cleavage and polyadenylation specificity factor
subunit from *Pyrococcus horikoshii*.
Proteins **78**, 2395-2398

Jeyakanthan, J., Kanaujia, S. P., Nishida, Y., Nakagawa, N., Praveen, S., Shinkai, A.,
Kuramitsu, S., Yokoyama, S., and Sekar, K. (2010)
Free and ATP-bound structures of Ap4A hydrolase from *Aquifex aeolicus* V5.
Acta Cryst. D **66**, 116–124

Fukui, K., Nakagawa, N., Kitamura, Y., Nishida, Y., Masui, R., and Kuramitsu, S.
(2008)
Crystal structure of MutS2 endonuclease domain and the mechanism of homologous
recombination suppression.
J. Biol. Chem. **283**, 33417–33427

11-2. 学会・シンポジウム等における発表

Nishida, Y., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Analysis of nucleoid-associated protein HU in *Thermus thermophilus* HB8」

『The 4th Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 26
大阪大学、2014 年 9 月 26-27 日 (ポスター発表)

Oka A., **Nishida, Y.**, Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Thermal Stability of HU Protein from *Thermus thermophilus* HB8」

『The 4th Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 27
大阪大学、2014 年 9 月 26-27 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Does destabilized mutants of histone-like protein generate a thermosensitive strain?」

『第 36 回 日本分子生物学会 年会』 ポスター番号 3P-0551
兵庫県、2013 年 12 月 3-6 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Nucleoid-associated protein HU may act on RNA」

『The 3rd Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 43
大阪大学、2013 年 9 月 21-22 日 (ポスター発表)

Tochizawa Y., **Nishida Y.**, KIM K., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Insights of functional DNA binding of the bacterial histone-like protein HU in *Thermus thermophilus* HB8」

『The 3rd Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 42
大阪大学、2013 年 9 月 21-22 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Nucleoid-associated histone-like protein HU, may act on RNA」

『The 13th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan』 ポスター番号 1P-089

鳥取県、2013 年 6 月 12-14 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Nucleoid-associated histone-like protein HU may act on RNA」

『The 2nd Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 42
兵庫県 SPring-8、2012 年 9 月 28-29 日 (ポスター発表)

Tochizawa Y., **Nishida Y.**, KIM K., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Identification of various types of post-translational modifications of the bacterial histone-like protein HU in *Thermus thermophilus* HB8」

『The 2nd Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ポスター番号 41,
兵庫県 SPring8, 2012 年 9 月 28-29 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Functional analysis of nucleoid associated protein HU from *Thermus thermophilus* HB8」

『The 1st Annual Meeting for Whole-Organism Science Society』 ,ポスター番号 36
兵庫県 SPring-8、2011 年 8 月 19-20 日 (ポスター発表)

西田 優也、上利佳弘、倉光成紀、大久保将人、岸川昭太郎、中出浩司、栗原千登勢、
廣瀬めぐみ、益崎智子、久次米夕佳里、村田武英、小幡裕一

「高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のバイオリソース- 残された基本的生命現象の発見 へ向けて -」

『第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会』, ポスター
番号 3P-0173

兵庫県、2010 年 12 月 7-10 日 (ポスター発表)

Yuya Nishida, Noriko Nakagawa, Ryoji Masui ,Seiki Kuramitsu

「Functional analysis of nucleoid associated protein HU from *Thermus thermophilus* HB8」

『9th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8』 ,ポスター番号 77

兵庫県 SPring-8、2010 年 8 月 20-22 日 (ポスター発表)

Kenji Fukui, Ryoji Masui, Noriko Nakagawa, Taisuke Wakamatsu, Hitoshi Iino, Rihito Morita, Masao Inoue, Atsuhiko Shimada, Shuhei Nakane, Kyoko Majima, **Yuya Nishida**, Ryuichi Asano, and Seiki Kuramitsu

「DNA repair subsystems of *Thermus thermophilus* HB8」

『9th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8』, ポスター番号 61

兵庫県 SPring-8、2010 年 8 月 20-22 日 (ポスター発表)

Hirohito Ishikawa, Hiromasa Ohyama, **Yuya Nishida**, Noriko Nakagawa, Seiki Kuramitsu and Ryoji Masui

「Structural comparison of β -CASP nucleases: RNase J and CPSF groups」

『9th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8』, ポスター番号 34

兵庫県 SPring-8、2010 年 8 月 20-22 日 (ポスター発表)

Nishida, Y., Ishikawa, H., Nakagawa, N., Kuramitsu, S., and Masui, R.

「Crystal structure of an archaeal cleavage and polyadenylation specificity factor subunit from *Pyrococcus horikoshii*.」

『The 24th Annual Symposium of The Protein Society』, ポスター番号 395
San Diego, California, USA, 2010/08/1-5. (ポスター発表)

石川 大仁、大山 礼雅、**西田 優也**、中川 紀子、倉光 成紀、増井 良治

「 β -CASP ファミリーヌクレアーゼの構造比較と機能相関」

『The 10th Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan』 ポスター番号
2P-045

北海道、2010 年 6 月 16-18 日 (ポスター発表)

西田 優也, 石川大仁, 中川紀子, 倉光成紀, 増井良治

「アーキア特異的配列を持つリボヌクレアーゼの X 線結晶構造解析」

『第 57 回日本生化学会近畿支部例会』, 口頭・ポスター発表番号 A-12

奈良先端科学技術大学院大学, 2010 年 5 月 22 日 (口頭発表・ポスター発表)

Nishida, Y., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S.

「Functional analysis of nucleoid associated protein HU from *Thermus thermophilus* HB8」

『8th Annual Meeting of Structural-Biological Whole Cell Project of *Thermus thermophilus* HB8』, ポスターNo.61,

兵庫県 SPring-8、2008 年 9 月 13 日-15 日 (ポスター発表)

