

Title	超好熱性アーキアに由来する新規のヒストン様タンパク質の機能解析
Sub Title	Functional analysis of a novel histone-like protein from hyperthermophilic Archaea.
Author	金井, 昭夫(Kanai, Akio)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	真核生物のヒストン分子は、8量体より構成されるヒストンコア構造を介して、ゲノムDNAの格納や遺伝子の発現制御に重要な働きをなしている。一方で、原核生物であるアーキア (古細菌)にも原始的なヒストン分子が2量体を形成し、DNAを折りたたんでいることが報告されている。私たちは100℃で生育可能な超好熱性のアーキア<i>Pyrococcus furiosus</i>の培地を煮沸することで、mRNAとタンパク質の両レベルで機能未知タンパク質PF0624が誘導されることを確認し、それがアーキアのヒストンフォールドを有したタンパク質であることを見出した (ヒストンの2量体に相応する大きさと構造を有す)。そこで、<i>P. furiosus</i>のヒストン単量体をコードするPF1831遺伝子と新規ヒストンフォールドタンパク質であるPF0624の遺伝子大腸菌の発現ベクターに組み込み、Tag配列を介さない形で (すなわち、生体内と同じアミノ酸配列を用いて) 組換え体を産生、SDSポリアクリルアミド電気泳動上ほぼ均一になるまで精製した。精製したPF1831やPF0624タンパク質を用いて、ゲルシフト法にてそのDNA結合能を検証したところ、PF1831タンパク質では、明確なバンドのシフトが確認できた。一方で、PF0624タンパク質は直接にDNAに結合しなかったが、PF1831を介したクロマチン形成を特に高温下で促進することが示唆された。これは、熱ショック下で、PF0624タンパク質が超好熱性のアーキアのクロマチンを保護する役割を持つことを意味している。 Eukaryotic histone molecules play crucial roles in the packaging of genomic DNA and the regulation of gene expression through the histone core structure, which is composed of an octamer. On the other hand, primitive histone molecules have been reported in archaea, forming dimers and folding DNA. By boiling the medium of the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus furiosus</i>, which can grow at 100°C, we confirmed the induction of the functionally uncharacterized protein PF0624 at both mRNA and protein levels, and identified it as a protein possessing a histone fold in archaea (having a size and structure corresponding to that of a histone dimer). Subsequently, we incorporated the genes encoding the histone monomer of <i>P. furiosus</i>, PF1831, and the gene of the novel histone fold protein PF0624 into an <i>Escherichia coli</i> expression vector, and produced recombinants without a tag sequence (i.e., using the same amino acid sequence as in vivo). These recombinants were purified until they were almost homogeneous on SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Using the purified PF1831 and PF0624 proteins, we verified their DNA binding abilities via gel shift assay. While the PF1831 protein showed clear band shifts, the PF0624 protein did not directly bind to DNA, but rather, it was suggested to facilitate chromatin formation through PF1831, especially under high-temperature conditions. This implies that under heat shock, the PF0624 protein plays a role in protecting the chromatin of hyperthermophilic archaea.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000010-20230040

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2023年度 学事振興資金（個人研究） 研究成果実績報告書

研究代表者	所属	大学院政策・メディア研究科	職名	教授	補助額	500千円 (特B)
	氏名	金井 昭夫	氏名(英語)	Akio Kanai		
研究課題（日本語） 超好熱性アーキアに由来する新規のヒストン様タンパク質の機能解析						
研究課題（英訳） Functional analysis of a novel histone-like protein from hyperthermophilic Archaea.						
1. 研究成果実績の概要 真核生物のヒストン分子は、8量体より構成されるヒストンコア構造を介して、ゲノム DNA の格納や遺伝子の発現制御に重要な働きをなしている。一方で、原核生物であるアーキア(古細菌)にも原始的なヒストン分子が 2 量体を形成し、DNA を折りたたんでいることが報告されている。私たちは 100 °C で生育可能な超好熱性のアーキア <i>Pyrococcus furiosus</i> の培地を煮沸することで、mRNA とタンパク質の両レベルで機能未知タンパク質 PF0624 が誘導されることを確認し、それがアーキアのヒストンフォールドを有したタンパク質であることを見出した(ヒストンの 2 量体に相応する大きさで構造を有す)。そこで、 <i>P. furiosus</i> のヒストン単量体をコードする PF1831 遺伝子と新規ヒストンフォールドタンパク質である PF0624 の遺伝子を大腸菌の発現ベクターに組み込み、Tag 配列を介さない形で(すなわち、生体内と同じアミノ酸配列を用いて)組換え体を産生、SDS ポリアクリルアミド電気泳動上ほぼ均一になるまで精製した。精製した PF1831 や PF0624 タンパク質を用いて、ゲルシフト法にてその DNA 結合能を検証したところ、PF1831 タンパク質では、明確なバンドのシフトが確認できた。一方で、PF0624 タンパク質は直接に DNA に結合しなかったが、PF1831 を介したクロマチン形成を特に高温下で促進することが示唆された。これは、熱ショック下で、PF0624 タンパク質が超好熱性のアーキアのクロマチンを保護する役割を持つことを意味している。						
2. 研究成果実績の概要（英訳） Eukaryotic histone molecules play crucial roles in the packaging of genomic DNA and the regulation of gene expression through the histone core structure, which is composed of an octamer. On the other hand, primitive histone molecules have been reported in archaea, forming dimers and folding DNA. By boiling the medium of the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus furiosus</i> , which can grow at 100°C, we confirmed the induction of the functionally uncharacterized protein PF0624 at both mRNA and protein levels, and identified it as a protein possessing a histone fold in archaea (having a size and structure corresponding to that of a histone dimer). Subsequently, we incorporated the genes encoding the histone monomer of <i>P. furiosus</i> , PF1831, and the gene of the novel histone fold protein PF0624 into an <i>Escherichia coli</i> expression vector, and produced recombinants without a tag sequence (i.e., using the same amino acid sequence as in vivo). These recombinants were purified until they were almost homogeneous on SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Using the purified PF1831 and PF0624 proteins, we verified their DNA binding abilities via gel shift assay. While the PF1831 protein showed clear band shifts, the PF0624 protein did not directly bind to DNA, but rather, it was suggested to facilitate chromatin formation through PF1831, especially under high-temperature conditions. This implies that under heat shock, the PF0624 protein plays a role in protecting the chromatin of hyperthermophilic archaea.						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
Akio Kanai, Haruko Okabe, Masahiro C. Miura, Asako Sato, Shungo Adachi	Elucidating Genetic Information Control in the Hyperthermophilic Archaeon <i>Pyrococcus furiosus</i> under Severe Heat Shock Conditions	ASM Microbe 2024	June 13-17, 2024, Atlanta, USA			