

Title	Transcriptional regulatory mechanism of stress-responsive genes in <i>Thermus thermophilus</i> HB8
Author(s)	Agari, Yoshihiro
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1612
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【74】

氏名	あが 上 利 佳 弘
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24678 号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Transcriptional regulatory mechanism of stress-responsive genes in <i>Thermus thermophilus</i> HB8 (<i>Thermus thermophilus</i> HB8株におけるストレス応答遺伝子群の転写調節機構)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 河村 悟 教授 谷澤 克行 教授 小倉 明彦

論文内容の要旨

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8株をモデル生物として用い、生存に不利な環境での転写調節を明らかにする目的で、定常期とウイルス感染時に注目し、それぞれにおける転写調節を検討した。(1) *T. thermophilus* HB8株のCRP/FNRファミリー転写因子の1つ、SdrPの発現量が定常期に増加することを見いだした。遺伝子発現解析の結果から、SdrPは対数増殖期においても種々のストレスによって発現が誘導され、特に酸化ストレスによる誘導が顕著であることが分かった。*sdrP*遺伝子破壊株(Δ *sdrP*株)は、野生株に比べ、特に合成培地中での増殖が遅く、また酸化剤(diamide)に対する感受性が増した。 Δ *sdrP*株を用いた比較発現解析と、大規模な遺伝子発現パターン解析の結果に基づき、SdrPによって直接制御されている22種類の標的遺伝子を *in vitro* で同定した。これらの遺伝子産物の大部分は蛋白質およびDNAの修復・代謝、酸化還元調節などに関係するものであった。これらの結果から、SdrPの主要な機能は、酸化ストレス応答であることがわかり、HB8株は定常期にこのようなストレスに曝されていることを示唆した。

CRP/FNRファミリーの転写因子の多くは、低分子補欠因子の結合や、分子内の鉄硫黄クラスターの酸化・還元などに起因する構造変化を介して標的遺伝子の転写を調節している。同様に、他の細菌由来の、酸化ストレスに応答する転写因子の多くは、分子内S-S結合や補欠因子の酸化・還元などによって

転写を調節する。しかし、興味深いことに、SdrPのX線結晶構造から、本蛋白質の補欠因子結合ポケットは、分子内のアミノ酸側鎖によってふさがれており、アポ体であるにもかかわらずDNA結合型のフォールドを維持していることが分かった。さらに、本蛋白質による *in vitro* での転写促進は、補欠因子を必要としなかった。これらの結果、および、SdrPがシステイン残基を持たないこと、標的遺伝子とSdrPの発現量の変動パターンが高い相関を示すことから、SdrPによる転写調節が、構造変化を伴わず、本蛋白質の発現量によって制御されていることを示した。

(2) 本菌株のウイルス感染時においては、細菌特有の免疫システムが働くと考え、感染時のClustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated(Cas)システムの転写調節について研究した。本システムは、真正細菌の40%、古細菌の90%に見いだされている特徴的なDNA領域であり、パリンドーム様配列が、一定の間隔(スペーサー)を空けて繰り返すCRISPRと、CRISPR近傍に存在する *cas* 遺伝子群から成る。ウイルスのDNA配列の一部がスペーサー配列と一致する場合、細菌はそのウイルスに対して耐性を示す。従って、本システムは、真核生物におけるRNAiに類似した、細菌特有の免疫システムであると考えられている。

ゲノム解析により、本菌株には12カ所のCRISPRと29種類の *cas* 遺伝子群が見つかった。興味深いことに、本菌株のcAMP受容体蛋白質(CRP)によって転写調節されている22種類の遺伝子のうち、20種類がCRISPRに隣接しており、2つの *cas* オペロンがこれに含まれる。野生株および *crp* 遺伝子破壊株(Δ *crp* 株)について ϕ YS40ファージ感染前後のゲノムワイドな発現解析を行った結果、CRPにより転写調節されている2つの *cas* オペロンの発現が、野生株ではファージ感染後に著しく増加したが、 Δ *crp* 株ではその増加が抑制された。また、野生株における *crp* 遺伝子の発現量は、ファージ感染前後で一定であった。このことは、cAMPがファージ感染を伝えるシグナル分子として働き、CRPに伝達された結果、CRPの制御下にある2つの *cas* オペロンの発現が促進されたことを示唆するものである。また、他のいくつかの *cas* 遺伝子と全てのCRISPRは、野生株/ Δ *crp* 株と同様に、ファージ感染後に著しく発現量が増加したことから、CRISPRシステムの転写調節に関与している未同定の転写因子の存在が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

ストレス応答において転写調節が果たす役割を解析した。モデル生物として利用したのは、生物進化の起源に近いと考えられている高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 で、その構成タンパク質が安定なため、立体構造解析や分子機能解析に適していることが知られている。研究対象とした転写因子は、多くの遺伝子の発現調節に関与するグローバル転写因子の cAMP receptor protein (CRP) ファミリーに属する転写因子 (SdrP と CRP) である。それら転写因子について、酸化ストレスやウイルス感染に対するストレス応答を、DNA マイクロアレイによる mRNA 解析法、立体構造解析法、分子機能解析法などを利用して解析した。その結果、SdrP が酸化ストレスに関与し、CRP はファージ感染のストレスに関与することが明らかになった。これらの成果は、生物のストレス応答に大きな手掛かりを与える結果であり、博士(理学)の学位に値すると認める。