

Title	Functional analysis of cold shock proteins from an extreme thermophile, <i>Thermus thermophilus</i> HB8
Author(s)	妻鹿, 良亮
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2142">https://hdl.handle.net/11094/2142</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	めが 鹿 良 亮
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23949 号
学位授与年月日	平成22年3月23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	Functional analysis of cold shock proteins from an extreme thermophile, Thermus thermophilus HB8 (高度好熱菌由来cold shock proteinの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 河村 悟 教授 小倉 明彦 教授 谷澤 克行

### 論文内容の要旨

生物は様々な環境の変化で生じるストレスに適應している。このようなストレスに対して、生物はタンパク質の発現レベルを変化させ、適應している。低温環境において発現量の増加するタンパク質として最初に同定されたのが、cold shock protein (CSP) であり、そのホモログは多くの生物種で複数同定されている。しかし、アミノ酸配列が相同でも、すべて低温時に発現量が上昇するわけではない。例えば、栄養枯渇時に発現量が上昇するものや、常時発現レベルの高いCSPもあり、様々なタイプのCSPが含まれている。CSPは2つのRNA binding motifを持ち、mRNAの二次構造形成を阻害するRNA chaperoneとして働くことが知られている。高度好熱菌にはTTHA0175 (ttCSP1) とTTHA0359 (ttCSP2) という2種類のCSPが存在する。この数はこれまでに詳細に研究されている大腸菌や枯草菌と比べると少なく、複雑な機能相関がないと考えられるため、CSPの細胞内機能の解析に適していると考えられる。

DNA マイクロアレイにより mRNA の発現量を解析したところ、ttCSP1 は恒常的に発現しているのに対し、ttCSP2 は低温によって発現量が上昇し、低温ストレス応答に直接関与していることが示された(図)。このことはttCSP1 が通常の生育条件下でも細胞内で重要な役割を果たすが、ttCSP2 は低温条件でのみ、その機能を発現することを示唆した。低温条件でttCSP2 の発現が上昇するメカニズムを解明するため、ttcsp2 mRNA の転写開始点を決定し、mRNA の5'-非翻訳領域の二次構造を予測したところ、70°C と45°C で二次構造形成のパターンがttcsp2 mRNA 特異的に異なることがわかった。さらに、高度好熱菌のendoribonuclease (TTHA0252) 破壊株のマイクロアレイデータからttcsp2 mRNA の存在量を調べたところ、野生株に比べて多いことがわかった。このことから、ttcsp2 mRNA は細胞の温度変化を感知するセンサーとして働くと同時に、70°C ではTTHA0252によって分解制御されている可能性が示唆された。つまり、普段はTTHA0252によって厳密に制御されているが、低温環境下ではその制御を逃れて発現し、機能すると考えられる。次に、ttcsp1、ttcsp2それぞれ単独の破壊株 ( $\Delta ttcsp1$ ,  $\Delta ttcsp2$ ) と二重破壊株 ( $\Delta ttcsp1/2$ ) を作製し、その生育を70°C と45°C で調べた。その結果、70°C では、全ての株が同様の生育曲線を描き、45°C では、 $\Delta ttcsp1$ ,  $\Delta ttcsp2$  と野生株がほとんど変わらない生育を示したのに対して、 $\Delta ttcsp1/2$  では他の3つの株と比較して大きく生育が悪くなることが明らかになった。このことは、低温環境での生育にはttCSP1 とttCSP2 の両方が必要であり、どちらか一方を破壊してもその機能を補うことができることが示唆された。さらに、精製したttCSP1 とttCSP2 を用いてDNA (RNA) 結合能について調べたところ、ttCSP1, ttCSP2 とともに single-stranded DNA (ssDNA) や ssRNA に対して強い親和性を示した。

ゆえに、ttCSP1 とttCSP2 が機能する条件は異なっており、ttCSP1 は常時発現してRNA chaperoneとして機能しているが、ttCSP2 は細胞が低温に置かれたときのみ、自らのmRNAを低温センサーとして低温を感知し、安定な状態になることでmRNA量を向上させ、翻訳されるタンパク質の量を調節していると考えられる。低温環境下では、mRNAの二次構造形成の頻度が上昇することから、ttCSP2は増加したmRNAの二次構造の解離を促進し、ttCSP1の補助的な役割を担っていると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

生物の低温適應機構の手掛かりを得るために、低温適應への関与が示唆されている高度好熱菌のttCSP1およびttCSP2蛋白質を研究対象として、遺伝子発現解析や蛋白質機能の解析を行った。DNA マイクロアレイを利用して、細胞内の全mRNAの発現量を調べたところ、ttCSP1は恒常的に高発現していたが、ttCSP2は低温変化で発現が上昇していた。ttCSP2のmRNAの転写開始点を決定して、5'-非翻訳領域の二次構造を予測するとともに、遺伝子破壊株の全mRNA発現量を調べた。さらに、ttCSP1やttCSP2と合成オリゴヌクレオチドとの親和性を解析したところ、いずれのttCSPもピリミジン含量の多い配列に対して高い親和性を示した。これらの結果から、CSPはRNAシャペロンとして働くことによってmRNAの機能を調節していることが示唆された。これらの成果は、生物の低温適應の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。