Osaka University Knowledge Archive

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

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【92】

氏　　名	妻　鹿　良　亮（めが　りょう　すけ）
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応している。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、適応している。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 (Δ*ttcsp1*, Δ*ttcsp2*) と二重破壊株 (Δ*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、Δ*ttcsp1*, Δ*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、Δ*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

生物の低温適応機構の手掛かりを得るために、低温適応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、生物の低温適応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。