



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Roles of Cold Shock Protein 1 from <i>Thermus thermophilus</i> HB8                  |
| Author(s)    | Miyazaki, Toshiko   |
| Citation     | 大阪大学, 2012, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/26858">https://hdl.handle.net/11094/26858</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | 宮 崎 敏 子   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 25218 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 24 年 3 月 22 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科生物科学専攻   |
| 学 位 論 文 名     | Roles of Cold Shock Protein 1 from <i>Thermus thermophilus</i> HB8<br>(高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8 由來 cold shock protein 1 の<br>機能解析) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 倉光 成紀<br>(副査)<br>教 授 米崎 哲朗 教 授 金澤 浩 准教授 増井 良治   |

## 論文内容の要旨

生物は様々な環境の変化に対応して、細胞内での蛋白質の発現レベルを変化させ、ストレスに適応して生きている。環境適応に関係する因子は様々な生物種で多数見つかっているが、今回私が注目した Cold shock protein (Csp) もその 1 つである。Csp は低温ストレス時にその発現量が増加する蛋白質(図 1 下線)として大腸菌で最初に同定されたが、現在では、低温環境下で発現誘導されない Csp が複数見つかっている(図 1 二重下線)。栄養枯渇時に発現量が上昇するものや、常時発現しているものなど様々なタイプの蛋白質が Csp family には含まれる。低温誘導型 Csp は RNA シャペロンとして翻訳開始の制御や transcription anti-terminatore として転写終結の制御に関わっていることが報告されている。しかし、低温誘導されず常時発現している Csp の機能については、まだ明らかになっていない。

極限環境下で生育する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 は、進化の過程で基本的生命現象に必要な、わずか 2,200 種類の蛋白質しか持っておらず、それらの蛋白質群は、立体構造解析や分子機能解析に適していることが経験的に知られている。その高度好熱菌には、TTHA0175 (ttCsp1) と TTGA0359 (ttCsp2) のわずか 2 種類の Csp しか存在しない。ttCsp2 は低温によって発現が誘導され、ストレス応答に直

| organism                          | No. of csp genes  |
|-----------------------------------|-------------------|
| <i>Methanosaeta concilii</i>      | 2 U/U             |
| <i>Halobacterium</i> sp.          | 2 D/D?            |
| <i>Aquifex aeolicus</i>           | 1 C               |
| <i>Thermotoga maritima</i>        | 2 U/U             |
| <i>Thermus thermophilus</i>       | 2 L/L             |
| <i>Dinococcus radiodurans</i>     | 2 U               |
| <i>Lactococcus lactis</i>         | 5 A/B/C/D/E       |
| <i>Bacillus subtilis</i>          | 3 B/C/D           |
| <i>Bacillus cereus</i>            | 6 A/A/A/A/A/U     |
| <i>Clostridium perfringens</i>    | 1 L               |
| <i>Rickettsia prowazekii</i>      | 1 A               |
| <i>Neisseria meningitidis</i>     | 1 U               |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i>  | 5 A/B/C/D/E       |
| <i>Xylella fastidiosa</i>         | 2 B/U             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | 2 B/D             |
| <i>Haemophilus influenzae</i>     | 1 D               |
| <i>Vibrio vulnificus</i>          | 5 A/B/U/E/G       |
| <i>Escherichia coli</i>           | 9 A/B/C/D/E/F/G/L |
| <i>Salmonella typhimurium</i>     | 6 A/B/C/D/E/H     |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 2 A/B             |

図 1) 各種生物種の Csp : U は名称未定、  
下線が低温誘導性、二重下線は低温非誘導性、  
無下線は誘導性不明

接觸していることが示されているのに対し、ttCsp1は低

温でも発現量が増加しない。また、ttCsp1は定常的に発現していることから、通常の生育条件下でも細胞内で重要な役割を果たしていると考えられる。これらの事から、ttCsp1を解析する事により、これまであまり良く知られていない低温非誘導性のCsp family蛋白質の機能が明らかになる事を期待した。

手法としては、*ttcsp1*欠損株を作製し、mRNA量と蛋白質量の変化を調べて、野生株の結果と比較した。mRNA量の変化の解析にはDNAマイクロアレイ(GeneChip)を用い、タンパク質発現量の解析には二次元電気泳動(2D-PAGE)を用いた。またttCsp1の立体構造をX線結晶解析の分子置換法を利用して決定するとともに、ttCsp1とオリゴヌクレオチドとの親和性も調べた。

スクレオチド結合実験の結果、ttCsp1は一本鎖DNAにも一本鎖RNAにも結合する事が分かり、塩基部分を認識して単鎖オリゴヌクレオチドに結合している事が示唆された。

また、二次元電気泳動の結果から、ttCsp1は翻訳制御や翻訳後修飾に関わっていることが明らかになった。特に、至適生育温度である70°Cの条件下では、ttCsp1遺伝子欠損により多数の必須タンパク質の発現が、野生株に比べて増加した。逆に、発現が抑制されるタンパク質も存在した。ttCsp1欠損によって発現抑制されるタンパク質の多くは、驚いたことに、転写調節因子であった。

不思議なことに、これだけのタンパク質量の変化が観察されているにもかかわらず、至適生育条件下的マイクロアレイ解析ではttCsp1欠損による転写産物(mRNA)の変化が検出されなかった。このことから、ttCsp1はmRNA量の制御とは直接関係しない翻訳制御に関与する可能性が示唆された。一般に、バクテリアでは転写量と翻訳量は相関関係にあると考えられている。転写と独立した翻訳機構が存在し、その制御に低温非誘導性Cspが関与する可能性が示された事は非常に興味深い。

分子置換法によるX線結晶構造解析の結果、低温非誘導型Cspとしては初めて、立体構造を決定した。その結果、ttCsp1の全体構造は、これまでに構造決定されている低温誘導型Cspと非常に良く似ており、DNA/RNA認識部位に典型的な”OB-fold”的立体構造をとっている事が分かった。低温時の誘導性に関わらず、Csp familyに属する蛋白質はRNP1、RNP2という2つのribonucleoprotein domainを持ち、アミノ酸配列の相同性も、非常に高い(>50%)。全体構造から低温非誘導性Cspの特徴を見いだす事が難しかったため、低温誘導の有無が既に分かっているCspについて、分子モデルを作製し、ttCsp1との間で分子表面電荷を比較した。その結果、低温非誘導型Cspの中にはRNPモチーフの近傍に正に帯電した領域を持つものが存在する事が分かった。ttCsp1も分子表面に正電荷を持つグループに属する。

さらに、様々なオリゴヌクレオチドとの親和性を調べた結果から、ttCsp1は二次構造を有し、U塩基含有率の高いオリゴヌクレオチドに、高い親和性を示す事が明らかになった。

*in vivo*における結果とttCsp1のオリゴヌクレオチド結合特性、分子表面電荷から、ttCsp1の作用メカニズムモデルを提唱する。

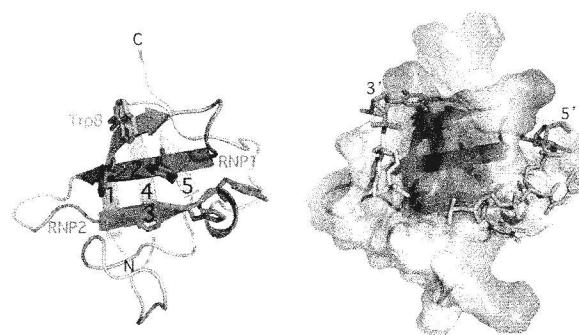


図2 ttCsp1の構造(左)と ttCsp1-dT6複合体モデル(右)

## 主論文

Tanaka, T., Mega, R., Kim, K., Shinkai, A., Masui, R., Kuramitsu, S., and Nakagawa, N. *FEBS J.*, in press.

A non-cold-inducible cold shock protein homolog mainly contributes to translational control under optimal growth conditions.

## 副論文

Miyazaki, T., Bressan, D. A., Shinohara, M., Haber, J. E., and Shinohara, A. (2004)

*In vivo* assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair.  
*EMBO J.* **23**, 939-949

Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2004)

A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific RecA homolog Dmc1. *Cell* **119**, 927-940

Tsukamoto, M., Yamashita, K., Miyazaki, T., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2003)

The N-terminal DNA-binding domain of Rad52 promotes RAD51-independent recombination in *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Genetics* **165**, 1703-1715

## 論文審査の結果の要旨

低温ストレス時に発現する蛋白質群(Csp family)と類似のアミノ酸配列であるにもかかわらず、低温ストレス下で発現量が変化しない機能未知蛋白質が存在することが知られていたが、これまでに研究されてきた生物種の場合には、多種類のCsp蛋白質が共存するため、個々のCspの機能解析は難しかった。そこで、宮崎さんは低温で誘導されないCspと誘導されるCspを1種類ずつしか持たない高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8を利用して、低温で誘導されないCsp(Csp1)の構造解析を行った。

Cspの立体構造解析は、これまで低温誘導型Cspのみしか成功していないかったが、本研究によって初めて低温非誘導型Csp1の立体構造解析に成功した。その結果、Csp1のポリピペチド主鎖の立体構造は低温誘導型Cspと似かよっていたが、表面電荷の分布に特徴的な違いが見られた。得られた立体構造と、種々のオリゴヌクレオチドとの結合定数をもとに、ポリヌクレオチドとの結合様式を考察した。

次に、転写過程や翻訳過程におけるCsp1の細胞内機能を調べるために、csp1遺伝子欠損株を作製し、mRNA量や蛋白質量の変化を調べて、野生株と比較した。その結果、意外なことに、csp1遺伝子欠損によって蛋白質量に大きな変化が観察されたにもかかわらず、転写産物(mRNA)の変化はわずかであった。これまで、「原核生物の蛋白質量は、mRNAにほぼ比例する」と一般に言われてきたことと異なる結果であった。これらの結果から、ttCsp1はmRNA量の制御とは直接関係しない翻訳制御の存在が明らかになり、その翻訳制御にCsp1の関与が示唆された。

宮崎さんは、機能未知であった低温非誘導型Csp1について、上記のような発見をして博士論文としてまとめた。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認められる。