

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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

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  
 理学研究科生物科学専攻  
 学位論文名 Roles of Cold Shock Protein 1 from *Thermus thermophilus* HB8  
 (高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 cold shock protein 1 の機能解析)  
 論文審査委員 (主査)  
 教授 倉光 成紀  
 (副査)  
 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るが、今回私が注目した Cold shock protein (Csp) もその一つである。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 TTHA0359 (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

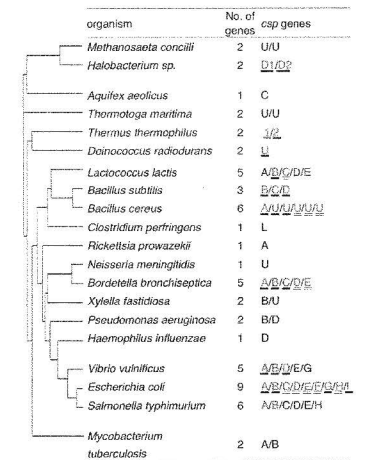


図 1) 様々な生物種の Csp s; U は名称未定、下線が低温誘導性、二重下線は低温非誘導性、無下線は誘導性不明

接関与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) を使い、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。

ヌ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、至適生育条件下の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" の立体構造をとっていることが分かった。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。

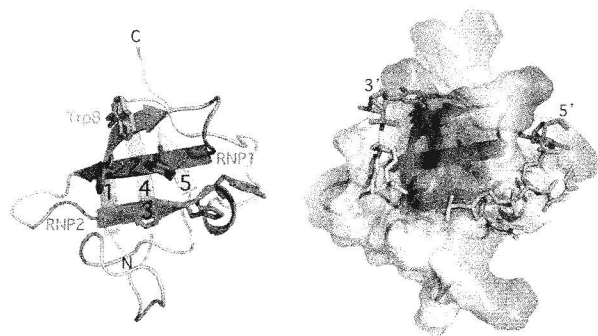


図2) ttCsp1 の構造 (左) と ttCsp1-dT6 複合体モデル (右)

## 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 のポリペプ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して、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る。