The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A Novel Endoribonuclease of Escherichia coli that Induces Gene Silencing in Bacteriophage T4
Author(s)	大塚, 裕一
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45135
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【19】

氏　　名	大塚裕一（おおつかゆういち）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　１８２１７　号
学位授与年月日	平成 15 年 12 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	A Novel Endoribonuclease of *Escherichia coli* that Induces Gene Silencing in Bacteriophage T4 **（T4 ファージ遺伝子サイレンシングを誘導する大腸菌新規エンドリボヌクレアーゼ）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　品川日出夫 （副査） 教　授　金澤　浩　　教　授　升方　久夫　　助教授　米崎　哲朗

論　文　内　容　の　要　旨

近年、遺伝子発現調節における mRNA 分解制御の重要性は広く認識されるようになってきた。しかし、分解活性を担う実体やその活性を調節する仕組みについてはまだ不明な点が多い。我々の研究室では T4 ファージが感染した大腸菌において、mRNA 分解制御が異常となる現象を発見した。T4 ファージの *dmd* 遺伝子が変異すると、感染後期においてほとんど全ての mRNA が分解され、遺伝子発現不能（遺伝子サイレンシング）そして増殖不能となる。従ってこの分解活性は T4 ファージの Dmd 蛋白質により制御されていることが示唆される。そこで私は、この mRNA 分解活性を担う実体の同定とその制御機構の解明を研究目的とした。

遺伝学的解析により、この活性が大腸菌にコードされた新規エンドリボヌクレアーゼにより引き起こされることが示唆された。そこで原因となるエンドリボヌクレアーゼを同定するため、切断活性を抑制する大腸菌変異株を５種類単離した。そのうちの２つは、機能未知である *yfjN* 遺伝子に変異があり、さらにこの遺伝子の破壊株では切断活性が完全に抑制されることから、*yfjN* 遺伝子は切断活性に重要な役割を果たすと考えられた。そこで組換え YfjN 蛋白質を発現、精製して *in vitro* において切断活性を調べたところ、YfjN 蛋白質はエンドヌクレアーゼ活性を有していることが明らかになった。この結果は、YfjN 蛋白質が T4 ファージの遺伝子 *dmd* 変異による mRNA 切断活性を担うエンドヌクレアーゼである可能性を強く示唆する。またその他の変異株の解析から、転写抑制遺伝子 *iscR* の発現が切断活性を抑制することも明らかになった。

次に活性の制御機構を明らかにするため、大腸菌細胞抽出液を用いた *in vitro* RNA 分解系を構築し、切断活性を調べた。その結果、効率の良い切断活性には少なくとも二種類の因子が関与することが明らかになり、さらに YfjN エンドヌクレアーゼは分子量約 900 kDa の大きな複合体を形成していることが示唆された。また切断活性は T4 Dmd 蛋白質により阻害されることも明らかになった。

最後に YfjN エンドヌクレアーゼの大腸菌内での役割を調べたところ、YfjN エンドヌクレアーゼが大腸菌内の mRNA や rRNA の代謝に役割を果たしていることが示唆された。

以上の成果は、今後遺伝子発現調節における mRNA 分解制御機構の解明に大いに貢献すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、遺伝子発現調節における mRNA 分解制御の重要性は広く認識されるようになってきた。しかし、分解活性を担う実体やその活性を調節する仕組みについてはまだ不明な点が多い。我々の研究室では T4 ファージが感染した大腸菌において、mRNA 分解制御が異常となる現象を発見した。T4 ファージの *dmd* 遺伝子が変異すると、感染後期においてほとんど全ての mRNA が分解され、遺伝子発現不能（遺伝子サイレンシング）そして増殖不能となる。従ってこの分解活性は T4 ファージの Dmd 蛋白質により制御されていることが示唆される。そこで私は、この mRNA 分解活性を担う実体の同定とその制御機構の解明を研究目的とした。

遺伝学的解析により、この活性が大腸菌にコードされた新規エンドリボヌクレアーゼにより引き起こされることが示唆された。そこで原因となるエンドリボヌクレアーゼを同定するため、切断活性を抑制する大腸菌変異株を５種類単離した。そのうちの２つは、機能未知である *yfjN* 遺伝子に変異があり、さらにこの遺伝子の破壊株では切断活性が完全に抑制されることから、*yfjN* 遺伝子は切断活性に重要な役割を果たすと考えられた。そこで組換え YfjN 蛋白質を発現、精製して *in vitro* において切断活性を調べたところ、YfjN 蛋白質はエンドヌクレアーゼ活性を有していることが明らかになった。この結果は、YfjN 蛋白質が T4 ファージの遺伝子 *dmd* 変異による mRNA 切断活性を担うエンドヌクレアーゼである可能性を強く示唆する。またその他の変異株の解析から、転写抑制遺伝子 *iscR* の発現が切断活性を抑制することも明らかになった。

次に活性の制御機構を明らかにするため、大腸菌細胞抽出液を用いた *in vitro* RNA 分解系を構築し、切断活性を調べた。その結果、効率の良い切断活性には少なくとも二種類の因子が関与することが明らかになり、さらに YfjN エンドヌクレアーゼは分子量約 900 kDa の大きな複合体を形成していることが示唆された。また切断活性は T4 Dmd 蛋白質により阻害されることも明らかになった。

最後に YfjN エンドヌクレアーゼの大腸菌内での役割を調べたところ、YfjN エンドヌクレアーゼが大腸菌内の mRNA や rRNA の代謝に役割を果たしていることが示唆された。

以上の成果は、今後遺伝子発現調節における mRNA 分解制御機構の解明に大いに貢献するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値があるものと認める。