

Title	Functional analysis of RNase HI involved in rnlAB toxin-antitoxin in Escherichia coli
Author(s)	仲, 健太
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/54027
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (仲 健 太)

論文題名

Functional analysis of RNase HI involved in *rnIAB* toxin-antitoxin in *Escherichia coli*
(大腸菌*rnIAB*トキシナーンチトキシン系に関与するRNase HIの機能解析)

論文内容の要旨

近年、さまざまな細菌でToxin-Antitoxin(TA)と呼ばれる遺伝子モジュールが数多く同定されてきた。トキシンの多くはRNase活性を有しているが、通常はアンチトキシンが結合することでその活性は抑制されている。一方、アミノ酸飢餓や高温などストレス条件下ではTAの遺伝子発現は抑制される。その結果、トキシンの比に比べて著しくプロテアーゼによる分解を受けやすいアンチトキシンの量は優先的に減少するため、トキシンが遊離し、活性化される。活性化したトキシンは細胞内のRNAを分解することで蛋白質の合成を抑制する。その結果、TAはストレス条件下での細胞の増殖を停止することで新しい環境に適応するための生存戦略に貢献すると考えられている。大腸菌のゲノム上にも40近くのTAが存在しているが、私はその中でも以下の2つの点で特徴的な性質を示す*rnIAB*を研究している。

*rnIAB*も他の多くのTAと同様、RnIAトキシンはRNase活性をもつ。大腸菌にT4ファージが感染した場合、大腸菌の遺伝子発現は即座に停止する。その結果、LonおよびClpXPプロテアーゼによる分解を受けやすいRnIBアンチトキシンは速やかに消失するため、RnIAが遊離する。しかし、T4ファージが感染直後に合成するDmdがRnIBに代わってRnIAに結合することで、RnIAの活性は抑制されたまま保たれる。一方、*dmd*変異ファージが感染した場合、RnIAの活性化を抑制出来ないためRnIAは菌内のRNAを分解することによって、T4ファージの蛋白質発現を阻害する結果、ファージ増殖は抑制される。すなわち*rnIAB*は抗ファージ作用を示す。

一般的にTAは他の因子との相互作用を含まず、トキシナーンチトキシンの2因子のみで成り立つ独立した系であることが報告されているものの、RnIAの活性化には大腸菌のDNA複製に寄与するRNase HIが必要であることが示唆された。そこで本研究では*rnIAB*におけるRNase HIの機能解明を目的とした。

これまでの解析からRNase HI変異株における*dmd*変異ファージの増殖が認められている。このことはRNase Hの欠失がRnIA活性の消失をもたらしたことを示唆している。そこで、*dmd*変異ファージ感染菌のRnIA活性について解析を行ったところ、確かにRNase HI変異株ではRnIAによるRNase活性が消失していた。また、精製した蛋白質を用いてRnIAの持つRNase活性に与えるRNase HIの効果を調べたところ、RNase HI添加に伴うRnIA切断活性の上昇が見られた。このことからRNase HIはRnIAのRNase活性を直接促進することが明らかとなった。さらに、細胞抽出液を用いたpull-down実験によりRNase HIとRnIAは特異的に結合することが明らかとなった。一方、精製蛋白質を用いた場合は両者の結合は検出できなかった。これらの結果からRNase HIは未知の因子を介してRnIAと相互作用することでその活性を促進することが示唆された。

Weiら(2013)によって解かれたRnIAの結晶構造によると、RnIAは3つのドメイン(NTD、NRD、DBD)から構成される。DBDにはDmdが結合し、さらにRNase活性に必要であることが明らかとなった。しかし、RNase HI、RnIBが相互作用するドメインは明らかにされていない。そこでこれらの結合ドメインの同定を試みたところ、RNase HIはNRDに結合した。一方、興味深いことにRnIBはNRDとDBDの二つのドメインに結合した。次にRnIB活性に必要なドメインの同定を行ったところNRDが必要であることが明らかとなった。

次にRnIBによるRnIA活性抑制へのRNase HIが果たす役割に注目した。野生株にRnIAを過剰発現した場合には内在性のRnIBによって大腸菌は正常に増殖できる。一方、RNase HI欠失株では増殖阻害を示した。このとき、RNase活性の上昇が認められた。したがってRNase HI欠失株ではRnIBの機能が消失していることがわかった。次に、それぞれの株でRnIAの発現量、*rnIB* mRNA転写量を調べたところ顕著な違いは見られなかった。このことからRnIBの機能消失は蛋白質発現以降の問題であると考えられる。上述したようにRnIBの抑制効果にはNRDが必要であり、RNase HIはNRDに結合する。これらの結果からRnIBとRnIA間の結合にRNase HIが関与することが示唆された。そこで、この可能性を調べた結果、確かにRnIBとNRD間の結合にRNase HIが必要であることが明らかとなった。以上の結果からRNase HIはRnIA活性を促進すると共にRnIAとRnIB間の結合にも必要であることが明らかとなった。RnIBとDBDの結合についてはRNase HIの関与は認められなかったが、この結合はRnIBの過剰発現のときにのみ見られる可能性を考慮して、RnIA-RnIB-RNase HI間の相互作用モデルを提唱した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (仲 健 太)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	米崎 哲朗
	副 査	教授	升方 久夫
	副 査	教授	柿本 辰男
	副 査	特任教授	金澤 浩

論文審査の結果の要旨

近年、さまざまな細菌種から Toxin-Antitoxin (TA) と呼ばれる遺伝子モジュールが多種類同定されてきた。トキシンの多くは RNase 活性を有しているが、通常はアンチトキシンが結合することによりトキシン活性は抑制されている。ストレス条件下では TA 遺伝子の転写は抑制されるため、トキシンの比に比べて著しくプロテアーゼによる分解を受けやすいアンチトキシンの量は優先的に減少する。その結果、遊離したトキシンが活性を発揮するようになる。RNase 活性を有するトキシンは mRNA を分解することで蛋白質の合成を抑制し、細胞の増殖を停止させる。このような増殖停止状態はストレスが除去されるまで継続することから、TA はストレス環境に適応またはそれを乗り越えるための生存戦略と考えられている。一般的に TA は他の因子との相互作用を含まず、トキシンーアンチトキシンの 2 因子のみで成り立つ独立した系であることが報告されているが、大腸菌が有する RnlA トキシンの活性には DNA 複製に寄与する RNase HI が必要であることが示唆されていた。申請者はこの可能性を詳しく検証するとともに、RnlAB トキシンーアンチトキシン系における RNase HI の機能解明を目的とした。

in vitro および *in vivo* 解析の結果、RNase HI は RnlA の有する RNase 活性を促進することが明らかとなった。さらに、RNase HI は RnlA がもつ 3 つのドメイン (NTD、NRD、DBD) のうち、RNase 活性に必須ではない NRD に結合した。アンチトキシンである RnlB も NRD に結合したが、この結合は RNase HI によって促進された。これに呼応して、RnlB による RnlA 活性抑制には RNase HI が必要であることが明らかとなった。一方、RnlB を過剰発現させた場合には RnlB は NRD に加えて RNase 活性部位を含む DBD にも結合することができるようになり、RNase HI の非存在下でも RnlA 活性を抑制できるようになった。これらのことから、通常細胞内にみられるようなトキシンーアンチトキシン濃度では、RNase HI は RnlB が NRD に結合するのを助けること、NRD に結合した RnlB は結合先を DBD に変えることにより、RnlA の活性を抑制するという RnlA-RnlB-RNase HI 間の相互作用モデルを提唱した。以上のことから、RNase HI は RnlAB トキシンーアンチトキシン系に必須な第三因子であることを証明することができた。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。