



| | |
|--------------|--|
| Title | Thermus thermophilus HB8 のヌクレオトイド構成タンパク質 HU は独特なヌクレオチド結合能を持つだけでなく、翻訳後修飾によって新規な多様性を示す |
| Author(s) | 西田, 優也 |
| Citation | 大阪大学, 2016, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/56101 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

〔題名〕

高度好熱菌における核様体構成タンパク質 HU の
多様な核酸結合能と機能(A variety of nucleotide-binding activities and functions of
the nucleoid-associated protein HU in an extreme thermophile)

学位申請者 西田 優也

原核生物のゲノム DNA は複数のヌクレオイド構成タンパク質群 (nucleoid-associated proteins (NAPs)) と共にヌクレオイドと呼ばれる凝集構造を作っている。NAPs は、それぞれが様々な構造と機能を持ち、互いに協調して働くことで、DNA の複製や分配、転写や修復等、DNA の関与するあらゆる現象が適切に働くとされる。原核生物の DNA にとって NAPs は重要な役割を果たすが、NAPs の種類が多いことや、生物種によって保存性が異なることを原因として、解明が進んでいない部分も多い。多様な NAPs の中でも DNA 結合タンパク質 HU は、全ての原核生物に保存されること、細胞内での発現量が他の NAPs より多いこと、ヌクレオイド全体に遍在していることなどから、最も主要な NAPs とされ、様々な生物種において研究が進められてきた。HU は配列非特異的に DNA に結合することで屈曲や負のスーパーコイルを引き起こし、ヌクレオイドの凝集構造の主軸となることが示されている。HU は、DNA の複製や分配、修復、転写にも深く関与することが示されており、種々の原核生物において HU の変異体は顕著な表現型を示す。これまでに、HU に関する様々な研究が行われてきたが、その機能多様性のため、不明な点も多い。本研究では、タンパク質が安定で、生化学的、構造学的解析が容易で、遺伝子数が少なく簡便に遺伝学的解析が可能な *Thermus thermophilus* HB8 由来の HU (TtHU) を用いて、HU の多彩なヌクレオチド結合能の解明と、HUを含めた NAPs の多様性に注目して実験を行った。

まず、TtHU が関わる生体内システムを探索するために相互作用解析を行った。結果として、複数の RNA 分解酵素との相互作用が示された。そこで、それらの RNA 分解酵素の RNase 活性に対する TtHU の影響を調べたところ、TtHU の濃度依存的に RNase 活性がネガティブに調節された。ここから、TtHU の新規機能として RNA の保護が示唆された。次に、構造学的に TtHU のヌクレオチド結合能を解析するため、円偏光二色性 (CD) スペクトルを用いて、一本鎖 DNA、あるいは、二本鎖 DNA との結合に伴う TtHU の二次構造の変化を測定した。結果として、Calf thymus DNA、および、配列特異的な一本鎖 DNA によって、二次構造が大きく減少することを示す現象が観測された。そこで、より詳細にこの現象を解析するために、特異的な一本鎖 DNA 存在下での TtHU の構造変化を NMR によって測定した。結果として、X線結晶構造解析の HU-dsDNA 複合体から考えられる DNA 結合機構とは異なる結合機構が示された。続いて、HU の多様な機能を調節する機構として、翻訳後修飾に注目した。リン酸化修飾の探索を行った結果、*T. thermophilus* HB8 由来の特定のリン酸化酵素によるリン酸化を発見した。また、その修飾が細胞内での TtHU の機能調節に働くことが示唆された。最後に、DNA の機能の複雑さに対して *T. thermophilus* HB8 が持つ NAPs の種類の少なさを補い、TtHU の機能を補佐する因子として、新規 NAPs の探索を行ったところ、アーキアの NAPs の機能ホモログと考えられる新規の NAPs を発見した。また、このNAPs も翻訳後修飾によって機能が調節されていることが推察された。

これらの結果から、ヌクレオイド構造の主軸として注目されてきた HUが、RNA や ssDNA にとても重要なタンパク質であること、また、原核生物におけるゲノム DNA の調節は、翻訳後修飾による HU の多様性や新規な NAPs など、これまで考えられているより多様な因子が関与し、複雑に調節されている可能性が示唆された。

In prokaryotic cells, the genomic DNA forms an aggregated structure with various nucleoid-associated proteins (NAPs). NAPs have their own structures of variety and hence diverse functions. The functions of genomic

DNA, such as replication, segregation, translation and repair, interrelate with its own structure, which is cooperatively modulated by NAPs.

HU (H protein from *E. coli* U93) is the most conserved and the most abundantly expressed NAP. The binding of HU leads to bent and negative supercoil of dsDNA structure. HU also works as an axis of dsDNA architecture and plays important roles in DNA replication, segregation, repair and transcription. Interestingly, it was reported that HU can also bind RNA or ssDNA. However, structural information is lacked, and functional relevance of their binding still remains elusive.

In this study, I used HU from *Thermus thermophilus* HB8 (TtHU). First, I confirmed that TtHU can bind both RNA and ssDNA. Proteomic approach for the search for binding partners of TtHU identified that HU interacts with RNA-binding proteins including RNase. Biochemical analysis revealed that HU protects RNA from degradation by its binding to RNase. I also found by circular dichroic spectroscopy that ssDNA induced a significant change in the secondary structure of TtHU. Of particular note, this change of secondary structure was sequence specific as complementary ssDNA, dsDNA or oligo dA did not induce such change. NMR structural analysis confirmed that HU with ssDNA formed a unique structure, which is different from the one that was shown with dsDNA earlier.

TtHB8 has only one HU in its genome and fewer number of NAPs compared to other prokaryotes. I found that TtHU was phosphorylated at residue 80 by protein kinases from TtHB8. Strains with mutations at residue 80 showed significant time-lags of growth in culture compared to the wild-type although these mutant HUs did not show any change in binding affinity with ssDNA or dsDNA. These suggest that post-translational modifications of HU produce a functional diversity or fine-tuning that can substitute the function of NAPs in other prokaryotes. I also found a novel NAP in TtHU by structural prediction.

Our data suggest that, in addition to well-known roles of HU with dsDNA, TtHU also interacts with RNA and ssDNA and receives post-translational modifications to exert diverse functions. Particularly, TtHU showed a novel structural change when it associates with ssDNA of a specific sequence. Further analyses will provide novel structural insights into the functions of NAPs with nucleotides.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

| | | |
|---------|-----------------|-------|
| | 氏 名 (西 田 優 也) | |
| | (職) 氏 名 | |
| 論文審査担当者 | 主査 教授 | 高島 成二 |
| | 副査 教授 | 難波 啓一 |
| | 副査 教授 | 中川 敦史 |
| | 副査 教授 | 小倉 明彦 |

論文審査の結果の要旨

好熱菌の核酸結合タンパク質HUに注目し、その生化学的解析を行った。まずRNAと結合する意義を解明するため、RNAとHUの直接結合を確認したあとHUの標的タンパク質の検索を行った。結果、新規のRNAaseを結合タンパク質として同定した。HUはこのRNAaseの機能を阻害したことによりHUによる新たな転写制御の存在が示唆された。次に一本鎖DNAとHUの結合動態の解析を円偏光二色性測定により行った。結果、HUは一本鎖DNAと結合することにより、配列特異的にHUの構造変化をきたすことが示された。そこで、この構造変化をNMRを用いて解析したところ、HUの特異的部位の構造変化が観察された。よってHUは一本鎖DNAに結合し、DNA複製時や転写過程において配列特異的な作用を発揮することが示された。

これら2つの結果は、ともにHUの新しい機能を同定したことから動物細胞における核酸結合タンパク質の生理機能解明に資すると評価された。以上より、本論文内容は学位授与にふさわしいと考える。