

Title	Identification and characterization of regulatory proteins of RNase LS in Escherichia coli
Author(s)	古賀, 光徳
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58621
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	古賀光徳
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 24259 号
学位授与年月日	平成22年12月15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	Identification and characterization of regulatory proteins of RNase LS in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌RNase LSの活性制御因子の同定と解析)
論文審査委員	(主査) 教授 米崎 哲朗 (副査) 教授 金澤 浩 教授 升方 久夫

論文内容の要旨

[導入]

大腸菌 RNase LS は、T4 ファージの増殖を抑制する機能を持った RNase として発見された。T4 ファージ Dmd は RNase LS 活性を抑制しており、*dmd* 変異体ファージが野生型大腸菌に感染すると、RNase LS は T4 の mRNA を激しく分解し、その増殖を抑制する。本研究では、RNase LS 活性に関わる 2 つの大腸菌タンパク質を新たに発見し、その解析を行った。

[RnlB は RNase LS 活性を抑制する]

大腸菌 RNase LS の必須遺伝子である *rnlA* のすぐ下流には機能未知遺伝子 *yjfO* が存在している。本研究により *rnlA* と *yjfO* は toxin-antitoxin の関係にあることが分かったため、*yjfO* を *rnlB* と命名した。

toxin-antitoxin (TA) system とは、細胞の増殖を阻害する安定な toxin と、その毒性を中和する不安定な antitoxin から構成されるオペロンである。RnlB 非存在下での RnlA の発現は、過剰な RNase 活性により全ての mRNA を不安定化させることによって細胞増殖を阻害し、RnlB を発現させることにより無毒化されることが分かった。

他の TA と同様に、RnlB も RnlA と比べて非常に不安定なタンパク質であり、ファージ感染後の RnlA、RnlB の存在量を調べたところ、RnlA は安定に存在しているのに対し、RnlB は速やかに分解されることが分かった。このことから、ファージ感染後に RnlB が分解されることにより、toxin の活性化が起こると考えられる。今回の結果は、TA system の抗ファージ能を示す初めての例となった。

[RNase HI も RNase LS 活性に必要である]

toxin である RnlA は強い RNase 活性を持つと予想されるが、精製した RnlA にはそのような活性は見られなかった。このことから、RNase LS 活性を発揮するためには、他の因子が必要であると考えられる。

rnlA のホモロジーサーチを行うと、遠縁のグラム陽性菌門のバクテリアからホモログが発見された。これらはすべて N 末端側に RNase HI ドメインを持っており、C 末端側が RnlA ホモログのドメインであった。このことから、大腸菌 RNase HI (遺伝子名 *rnhA*) も RNase LS 活性に関与するのではないかと考え解析を行った。

rnhA 変異体では *rnlA* 変異体と同様に T4 *dmd* 変異体が増殖し、その細胞抽出液には RNase LS 活性は見られなかったが、精製した RnhA を加えることにより活性が回復した。*rnlAB rnhA* 二重変異体では、精製した RnlA、RnhA タンパク質を単独で加えても RNase LS 活性は回復しなかったが、両方加える事により活性が回復した。以上のことから、RNase LS 活性には RnlA と RnhA が両方必要であることが明らかとなった。

RNase HI が DNA/RNA ハイブリッドの消化以外の RNase の機能を持っている事は知られていないため、大腸菌 RNase HI の新たな機能として RNase LS 活性に必要であることが分かった。

論文審査の結果の要旨

申請者は大腸菌 RNase LS の活性に関与する 2 つの蛋白質およびそれらの構造遺伝子の作用について解析した。1 つめの遺伝子については、RNase LS 活性に必須遺伝子である *rnlA* の下流に隣接する *rnlB* が RNase LS に対する抑制効果をもつこと、 $\Delta rnlAB$ 細胞において RnlA の発現は毒性を示すこと、RnlA と RnlB は複合体を形成すること、RnlB はプロテアーゼである ClpXP と Lon の作用を受けやすいために RnlA と比べて著しく不安定であることを明らかにした。以上のことから、*rnlA-rnlB* は新規の toxin-antitoxin 系を構成することを結論した。T4 ファージは宿主の遺伝子発現を停止させる機構を有するため、感染後に不安定な RnlB は速やかに消失することを確認した。このことは T4 ファージ感染が RnlA の活性化を誘導することを強く示唆しており、過去に確認された事実—T4 感染後の RNase LS 活性上昇—を説明し得る分子機構を提唱するものである。また、これまでに発見されている多数の toxin-antitoxin 系についても、T4 ファージ感染による toxin 活性化を予測させるものである。2 つめの遺伝子については、RNase H をコードする *rnhA* の変異により RNase LS 活性が消失すること、 $\Delta rnhA$ 細胞抽出液に RNase H を添加すると RNase LS 活性が回復すること、RnlA と RNase H は複合体を形成すること、から RNase H は RNase LS の必須成分であることを明らかにした。さらに、RnlA と RNase H のみでは十分な RNase LS 活性は検出できず、細胞抽出液の S30 分画を加えたときのみ十分な活性を検出できたことから、RNase LS 活性には第 3 の因子が必要であることを示した。以上の知見は、実体や活性調節機構が不明であった RNase LS を理解する上で極めて重要な発見であり、また原核生物の toxin-antitoxin 系が抗ファージ作用をもった重要な仕組みであることを明らかにした。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。