



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58621">https://hdl.handle.net/11094/58621</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【18】	
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yfjOが存在している。本研究によりrnlAとyfjOはtoxin-antitoxinの関係にあることが分かったため、yfjO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T4dmd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。rnlABrnhA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、ΔrnlAB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、ΔrnhA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のみでは充分なRNase LS活性は検出できず、細胞抽出液のS30分画を加えたときにのみ充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。