

氏名	井筒香織
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2379号
学位授与の日付	平成13年5月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物化学専攻
学位論文題目	大腸菌の対数期から定常期への変換機構の解析：リボソーム関連因子(SRAとRMF)の発現調節機構
論文調査委員	(主査) 教授 上村 匡 教授 井口 八郎 教授 七田 芳則

論文内容の要旨

大腸菌では、増殖が対数期から定常期へ移行するにつれて、100種類以上の定常期特異的遺伝子の発現が誘導され、様々な形態的、生理的变化が生じる。タンパク質合成装置であるリボソームは、対数増殖期には翻訳活性を持つ70Sリボソームが細胞内を占めるが、定常期に入ると二量体化し、翻訳機能を持たない100Sリボソームの割合が増す。100Sリボソームの形成に必須のRibosome Modulation Factor (RMF)は、定常期に発現が誘導され、55アミノ酸残基からなる塩基性タンパク質である。一方、SRA (Stationary phase induced Ribosome Associated protein)もまた、定常期に特異的に発現が増加し、リボソームの30Sサブユニットに結合する45アミノ酸残基からなる塩基性タンパク質である。本研究は、*rmf* (RMF) および *sra* (SRA) 遺伝子の定常期特異的発現制御機構と、その生理的機能の解析を行った。

SRAの定常期特異的な発現誘導は *sra* 遺伝子の転写レベルでの誘導によることを明らかにした。定常期特異的な遺伝子の多くは、定常期特異的シグマ因子である σ^S によって転写されるが、種々のグローバルレギュレーターも関与していることから、 σ^S を含むこれらの転写因子 (σ^S , cAMP, FIS, H-NS, IHF, OmpR, ppGpp) の欠損変異株における *sra*, *rmf* 遺伝子の転写レベルを調べた。*sra* 遺伝子の発現は、 σ^S に部分的に依存しており、単一プロモーターが σ^S と他の σ 因子、おそらく σ^{70} の両者で読まれる可能性が示唆された。また、*sra* 遺伝子は他の転写因子 cAMP と CRP による正の制御を受けている可能性が示唆された。*sra* 遺伝子欠損株の定常期における生存率や増殖速度は野生株と変わらず、その生理的機能は残された課題である。

一方、RMFの定常期特異的発現もまた、転写レベルでの誘導によるが、その転写は σ^S に依存していなかった。転写因子のなかでは、ppGpp欠損株において、*rmf* 遺伝子の転写レベルは野生株の約1/10に低下しており、ppGppによる正の制御を受けていることが示唆された。そこで、細胞内のアミノ酸欠乏状態での細胞内のppGppの蓄積、ppGppの過剰発現系ベクター、また、細胞内のppGppレベルの異なる一連の変異株を用いて、細胞内のppGppレベルと *rmf* 遺伝子の転写レベルの相関性を調べたところ、*rmf*の転写レベルは細胞内のppGpp量に相関して増加した。これらの結果から、*rmf* 遺伝子の転写調節はppGppによって正の制御を受けていることがわかった。

ppGppは、アミノ酸の欠乏により細胞内に蓄積され、rRNAやtRNAの合成停止により翻訳活性を低下させることが知られている。今回明らかにしたppGppによる *rmf* 遺伝子の転写誘導はRMF増加による100S形成によるリボソームの不活化はppGppによる新しい翻訳停止機構であると考えられる。ppGppは多くの遺伝子の正または負、両方の転写調節に関与し、細胞機能の広範囲の変換に関与することが知られているが、詳細なメカニズムは未知であり、今後の課題である。

対数期では、*rmf*の転写が誘導されても、RMFがその転写レベルを反映して発現されず、100Sリボソームも形成されないことが観察された。このことは、対数期ではRMFの翻訳段階または安定性において、定常期とは異なるなんらかの制御機構が存在する可能性が示唆された。このことは対数期一定常期変換における発現調節機構の解明のひとつの手がかりになると考えられ、残された課題である。

論文審査の結果の要旨

生物は種々の環境変化にさらされるとそれぞれのストレスに対応した応答機構が働く。これは生命の維持に必須である。我々の研究室では大腸菌をモデル生物として、熱や栄養枯渇、薬剤等に対する応答機構の解明に取り組んできた。大腸菌を同一培地で長期間培養を続けると、栄養枯渇に伴い対数増殖期から定常期に移行する。定常期には DNA 複製、転写、翻訳、細胞分裂機能等の低下、染色体の凝集、形態変化等が観察され、対数期には発現していない蛋白質が100種類以上、発現が誘導されることが知られている。しかし、この発現調節機構の詳細はわかっていない。申請者は対数増殖期から定常期への移行の発現調節機構を解明するために、大腸菌定常期特異的に発現されるリボソーム関連因子 RMF (ribosome modulation factor), SRA (stationary phase induced ribosome associated protein) の遺伝子の発現調節機構を調べた。これらの蛋白質は1990頃に共同研究者によって同定され、遺伝子がクローニングされ、各々 *rmf*, *rpsV* として命名された。後者の遺伝子の解析は長らく中断されていたが、申請者がはじめてその欠損変異株を分離し、その機能を調べ、その遺伝子の転写開始点、転写調節機構を明らかにした。主論文の参考論文の1は共著者が多いが大部分は1990頃の蛋白質の同定とその遺伝子のクローニングに係わったメンバーであり、主論文から明らかなようにこの論文における申請者の功績は大きい。当初名付けられた *rpsV* 遺伝子の名はリボソームのサブユニットの定義にそぐわないことから、*sra* 遺伝子と改名した。参考論文2は *rmf* 遺伝子の転写調節機構を詳細に解析したものであるが、申請者が主に行った成果である。大腸菌には転写調節に関わるグローバルレギュレーターが多数存在する。その中の SigmaS, OmpR, FIS, IHF, H-NS, cAMP, と ppGpp の各々の欠損変異株を用いて、*rmf* と *sra* 遺伝子の転写レベルを対数期と定常期で調べ、*rmf* 遺伝子の定常期での発現誘導は主に転写レベルで行われ、シグマ S に依存しないことを再確認し、この転写は ppGpp, ヒストン様タンパク質の H-NS によって正の調節を受けている事を申請者ははじめて明かにした。また *sra* 遺伝子の転写は部分的にシグマ S に依存し cAMP によって正の制御を受けていることを始めて明かにした。またいずれの遺伝子も対数期での転写抑制には用いたこれらの制御因子が関与していないこともわかった。大腸菌細胞内の ppGpp は培地のアミノ酸飢餓状態で蓄積され、rRNA, tRNA の合成が抑制され、翻訳活性を低下することが知られているが、ppGpp による定常期での *rmf* 遺伝子の転写促進は、RMF は翻訳活性のある 70S リボソームを二量体化し翻訳活性のない 100S 状態にする働きがあることから、翻訳活性の低下をもたらす。この ppGpp による RMF を介した新たな翻訳抑制機構の存在は申請者の研究ではじめて明らかになった。

よって、申請者の学位論文は理学博士の学位論文として価値があるものと認められる。なお、主論文および主論文の参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、申請者の高い学識と研究能力を十分評価することが出来、合格と認めた。