

氏名	なかのひろあき 中野宏昭
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2363号
学位授与の日付	平成13年3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	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	大腸菌 <i>ssrA</i> 遺伝子によって相補される温度感受性変異株の解析

論文調査委員 (主査)
教授 井口 八郎 教授 上村 匡 教授 永田 和宏

論文内容の要旨

申請者が研究を行った大腸菌の *ssrA* 遺伝子は、10Sa RNA をコードする遺伝子である。大腸菌 10Sa RNA は、細菌細胞内に多量に存在する低分子 RNA の一種であり、363塩基からなっている。この *ssrA* 遺伝子の欠損株 (Δ *ssrA* 株) は 45°C において温度感受性を示す事が報告されている。また、安東らの研究によって、 Δ *ssrA* 株から分離した 42°C における温度感受性変異株 TS101 株は、*prs* 遺伝子の一塩基置換変異であり、その温度感受性を *ssrA* 遺伝子によって相補することが出来る。

申請者は、この *ssrA* 遺伝子による温度感受性相補機構のさらに詳しい研究を行った。まず、*ssrA* 遺伝子による温度感受性相補能が、変異 *prs* 遺伝子に起因する温度感受性に特異的なものかどうかを調べる目的で、*ssrA* 遺伝子によって相補される他の温度感受性変異株の分離を試みた。 Δ *ssrA* 株から分離した約400株の温度感受性変異株のうち、4株はファージあるいはプラスミドによって *ssrA* 遺伝子を導入することで、温度感受性を相補することが出来た。これらの原因遺伝子は、一株は安東らが分離した温度感受性株と同じく *prs* 遺伝子内の変異であったが、他の3株については、*prs* 以外の遺伝子内の変異に起因する温度感受性変異株であった。この結果から、*ssrA* 遺伝子が示す温度感受性相補能は、細胞内で普遍的な機能であると結論した。また、申請者はある特定の遺伝子 (*thyA* 遺伝子) に注目し、その遺伝子内の変異に起因する *ssrA* 依存温度感受性株の分離を試み、これに成功した。この *ssrA* 遺伝子によって相補される温度感受性 *thyA* 株 (*thyA*ts12-20) 株の、ThyA 活性を測定したところ、酵素自身が温度感受性を示し、この事が細胞の温度感受性をもたらしめていると考えられた。*ssrA* 遺伝子が存在しても、この酵素の温度感受性は影響を受けなかったものの、42°C において培養した場合、細胞内の ThyA 活性は顕著に上昇し、野生型株とほぼ同様の活性を保有していた。すなわち *ssrA* 遺伝子は、高温条件で変異 ThyA 遺伝子産物の発現量を上昇させていると考察される。これらの実験結果から、10Sa RNA の機能として提唱されている trans-translation モデルを考慮に入れ、変異によって mRNA 上でストールを起こしているリボソームを trans-translation 機構によって解離させ、高温条件での変異遺伝子の発現量を保証しているという機構を提唱した。

更に、申請者は分離した *ssrA* 遺伝子に依存した温度感受性変異株を用いて、trans-translation 機構の分子遺伝学的解析を行った。すなわち、trans-translation を行えない変異 *ssrA* 遺伝子からの復帰変異の分離や trans-translation を行う際に必須な遺伝子を見出し解析した。

論文審査の結果の要旨

ssrA 遺伝子は、大腸菌内に多量に存在する低分子 RNA である 10Sa RNA をコードしている。10Sa RNA には、trans-translation と呼ばれる特異な機能が知られており、近年特に注目されている分子である。*ssrA* 遺伝子によって相補される温度感受性変異株は既に分離されており、その変異が *prs* 遺伝子内に存在する事は報告されていたが、その相補機構等は不明のままであった。

申請者は、*ssrA* 遺伝子によって相補される温度感受性変異株を複数分離し、それらの変異遺伝子を同定した。その結果、変異遺伝子に共通の特徴などが見いだせなかったことから、*ssrA* 遺伝子による温度感受性の相補機構は *prs* 遺伝子、あるいはその関連遺伝子に関係する特異的な機構ではなく、大腸菌内一般の遺伝子に対して有効な相補機構であると推測した。またこの推測に従って、ある特定の遺伝子 (*thyA* 遺伝子) に起因する温度感受性変異株で、かつ *ssrA* 遺伝子によって相補される変異株の分離を試みてこれに成功し、この推測が妥当であったことを証明した。続いて、申請者はこの *ssrA* 遺伝子によって相補される変異 ThyA の粗精製液中での活性を測定した。その結果、この変異 ThyA タンパク質は酵素自体が温度感受性を示すこと、*ssrA* 遺伝子の存在はこの酵素の温度感受性自体にはほとんど影響を与えないこと、しかしながら *ssrA* 遺伝子が存在すると粗精製液中の活性は顕著に上昇することを発見した。前述の trans-translation モデルとこれらの実験事実から、申請者は、trans-translation によるストールしているリボソームの解放と、それによる変異タンパク質の発現量の回復が、温度相補の機構ではないかと考察している。10Sa RNA の機能とされている trans-translation 機構は、主に *in vitro* の実験が進められている。*in vivo* における解析、細胞内での実際の役割については研究が必要であったが、*ssrA* 遺伝子の存否が細胞の表現型に顕著な影響を与える変異株を分離し、その機構について考察を加えたことは意義のある研究と評価した。また、申請者は分離した *ssrA* 依存温度感受性変異株を用いて、trans-translation 機構に必須な遺伝子の分子遺伝学的な解析等を試みた。その実験結果は現時点では不十分なものであるが、その手法の有効性は十分に認められ、今後の研究の展開に貢献するものといえる。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に示された研究業績を中心として、これに関連した研究分野について口頭試問した結果、合格と認めた。