

氏名	山 森 哲 雄 やま もり てつ お
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 687 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌温度適応機構の分子生物学的研究 —熱ショックタンパク質の意義

論文調査委員 (主査) 教授 由良 隆 教授 小関治男 教授 寺本 英

### 論 文 内 容 の 要 旨

対数増殖期の大腸菌細胞が合成する DNA, RNA, タンパク質の量比, タンパク質の種類と量などは、一般に培養温度の影響を余り受けない。ところが、30℃で増殖させた培養を急に42℃に移すと、数分後には特定のタンパク質の合成速度が一時的に著しく(10倍以上)増大することを観察した。この現象は、従来ショウジョウバエなどで知られている熱ショックタンパク質の合成と類似しており、申請者はこの問題を遺伝子発現の調節機構並びに生物の温度適応機構という観点から解析した。

まず培養温度の変換(30→42℃)後、経時的に合成されるタンパク質を同位元素標識アミノ酸で短時間標識し、ゲル電気泳動法により解析した結果、分子量約8.7万、8.1万、7.6万、7.3万、6.4万、1.8万、1.6万の少なくとも7種類のポリペプチド鎖を熱ショックタンパク質として同定した。これらのタンパク質の合成速度は、温度変換後1—2分で始まり、5—10分で最大となり以後急速に減少する。転写阻害剤リファンピシンを用いた実験により、この合成誘発は転写(RNA合成)段階で起ることが示唆された。

分子量6.4万の熱ショックタンパク質は、特異抗体による沈降反応、特殊形質導入ファージλgroEを紫外線照射菌に感染させて作られるタンパク質の解析などの方法により、groE(mop)遺伝子の産物であることを明らかにした。

一方これらの熱ショックタンパク質の誘発が正常に起らないナンセンス変異株を見つけ、その欠陥が大腸菌染色体上76分に位置する単一のアンバー変異(hin-165と命名)によることを示した。この変異株に、種々の効率のサプレッサー遺伝子を導入した菌株間の高温での生育、groEタンパク質の合成量を調べた結果、(1)サプレッサー活性の強さがhin遺伝子産物の合成量を規定し、それにより熱ショックタンパク質の合成速度が決まること、(2)細胞の生育には、高温になる程多量のhin遺伝子産物、従って熱ショックタンパク質(少なくともその一部)の合成を必要とすることが示唆された。

さらに野生型大腸菌を生育限界温度に近い高温(45—46℃)で培養すると、多量の(30℃の時の数倍)熱ショックタンパク質が作られ、細胞は耐熱性(致死温度55℃での生存率の増加)を獲得することが判っ

た。また低温から高温への変換により熱ショックタンパク質が蓄積する場合にも一時的に耐熱性が増大し、hin-165 変異株ではその様な耐熱性の変化が見られないことも明らかになった。これらの結果は、熱ショックタンパク質の合成または蓄積が高温での細胞増殖並びに耐熱性獲得において重要な役割を果すことを示すもので、温度適応機構の一つのモデル系を提供したといえよう。

### 論文審査の結果の要旨

大腸菌の温度適応機構に関する分子レベルでの研究は、これ迄ほとんど皆無に近い状態であった。近年タンパク質の電気泳動法特に二次元ゲル電気泳動の技術開発により多数のタンパク質の分離同定が可能となり、温度によるタンパク質合成の変動も解析しうる様になった。申請者は、大腸菌の培養を低温から高温に移すと、数種のタンパク質（熱ショックタンパク質）の合成が一時的に促進されることを発見し、温度適応におけるこの現象のもつ意義を遺伝子発現制御の立場から系統的に解析を試みた。

高温で誘発される熱ショックタンパク質合成の詳細な速度論的解析は、この誘発がメッセンジャー-RNA 合成段階で起ることを示唆する最初の結果をもたらした。次いで、これらのタンパク質の一つが、ファージ増殖 (T4, ラムダなど) に必須の宿主遺伝子 gro E の産物であることを、特異抗体や  $\lambda$  gro E 形質導入ファージなどを用いて明らかにした。一方、一群の熱ショックタンパク質の誘発に欠陥をもつ大腸菌変異株を見出し、高温で gro E 遺伝子などの転写誘発も起らないことを示した。この変異遺伝子 (hin とよぶ) の発見によって、熱ショックタンパク質合成の遺伝的制御機構解明の重要な糸口が得られたと思われる。また、hin-165 変異がナンセンス変異であることを利用し、種々の効率をもつサプレッサーを導入し、hin 遺伝子産物が多量に作られる程、熱ショックタンパク質の合成量、高温における菌の増殖の程度が増大することを明らかにした。その結果、熱ショックタンパク質の合成は少なくとも高温で細胞が増殖するには必要であるとの結論に到達した。

さらに、熱ショックタンパク質の蓄積が、致死温度 (55°C) に対する細胞の抵抗性をもたらすという興味深い事実を見出し、大腸菌の耐熱性、温度適応機構における熱ショックタンパク質の役割を強く示唆する結果を得た点は、今後の研究の方向を示す重要な成果といえよう。

以上の様に、申請者は熱ショックタンパク質合成の誘発現象の発見に端を発し、それが遺伝情報転写段階の調節によることを明確に示し、細胞の温度適応における生理的意義に関する基本的な考えを提示するなど独創性の高い成果をあげた。これらの結果は、従来知られていなかった新しい転写制御系の存在を示すと共に、細胞の温度適応機構という生物にとって最も基本的な現象の一つを分子生物学的に解明するための突破口を開いたものとして高く評価される。以上の審査結果を総合し、本論文は理学博士の学位取得に十分な内容をもつものであると結論した。