

バイオサイエンス研究科 博士論文要旨

所属 (主指導教官)	バイオサイエンス研究科細胞生物学専攻(森 浩禎 教授)		
氏名	川野 光興	提出	平成 14 年 2 月 8 日
題目	Functional analysis of Long Direct Repeat (LDR) sequences in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌ゲノムに存在する Long Direct Repeat [LDR]の機能解析)		
要旨			
大腸菌ゲノム配列解析より約 500 bp を単位とする repetitive 配列の存在が明らかにされた。BLAST 解析から染色体 27.4 分領域にスパーサー領域を持たない形で LDR-A、-B、-C の 3 コピーが存在し、染色体の反対側に相当する 79.7 分領域に約 450 bp の LDR-D と名付けた単位が 1 コピー存在することが明らかにされた。そこで本研究では、この配列の細胞内機能の解明を目的に研究を行った。この配列の類似配列の存在を調べるために統計的手法による類似配列探索の方法の開発を行い、探索を行った。その結果新たに 4 コピーの存在が明らかとなり、これらはすでに存在が確認されていた領域に隣接する形でその存在を確認した。他微生物における LDR 配列の存在を調べるために 10 種の微生物のゲノム配列を利用して Southern 解析を行った。その結果、大腸菌と近縁の腸内細菌にのみその存在を確認することができた。一部をクローン化し、その配列解析を行った結果、保存性が高いことが明らかとなった。特にこの配列には 35 アミノ酸をコードする ORF 領域 (ORF35) が予測されていたが、この領域の保存性が特に高く、何らかの機能を持つことが強く示唆された。 この配列の細胞内における機能を解析することを目的に、この配列の欠失株を作製したが、特に変化を観察することはできなかった。しかし、この配列 (LDR-D) を多コピープラスミドにクローン化し過剰に供給すると、ORF35 を過剰に供給する方向にクローンされた場合のみ、細胞に対して致死的な効果を観察することができた。そこでこの原因を同定することを目的に、その ORF を含む様々な DNA 断片を作製してプラスミド上の <i>lac</i> プロモーターからの転写増強による生育阻害の効果を調べた。その結果、ORF35 の過剰発現によって細胞の生育阻害、核様体の凝集化が生じることが明らかとなった。ORF35 にアンバー変異を導入した断片では生育阻害がみられなくなったが、宿主にそのサプレッサー変異株を用いることにより再び生育阻害が観察されたことから、ORF35 のタンパク質産物がこれらの生育阻害の原因と考えられた。そして、ORF35 を <i>ldrD</i> 遺伝子と名付けた。<i>ldrD</i> と <i>lacZ</i> の融合遺伝子を作製して、その翻訳活性を調べたところ、ORF35 はその直前にみられる SD 配列を用いて翻訳され得ることが示された。 <i>ldrD</i> の発現の可能性を知るために、リピート配列から合成される mRNA の同定を試みた。Northern 解析の結果、<i>ldrD</i> の方向と同じ向きに約 370 nt (<i>ldrD</i> mRNA)、反対の方向に 60 nt (RdID RNA) の転写産物を同定した。配列解析の結果、ともにプロモーター様配列が存在し、primer extension の実験を行い、転写開始点の決定を行った。その結果、この 2 つの RNA は重複する領域にコードされていることが			

判明し、RdID RNA は antisense RNA として機能することが推測された。また antisense RNA の転写活性を低下させる変異により *ldrD* 遺伝子の発現が有意に上昇した。antisense RNA を細胞内にトランスに供給することにより *ldrD* の発現が低下したことから、RdID antisense RNA は *ldrD* 遺伝子の翻訳制御に関与していることが示唆された。

β -galactosidase assay によりこれらのプロモーターの活性を調べてみたところ、これらの RNA は恒常的に転写されており、*rdlD* プロモーターは *ldrD* プロモーターと比べて約 130 倍の活性をもつことが分かった。両 RNA の細胞内安定性を調べたところ、RdID RNA の半減期は約 2 分であったが、*ldrD* mRNA のそれは約 30 分と非常に安定であった。このことから、*ldrD* mRNA は特殊な構造を形成していることが示唆されたため二次構造予測プログラムによりその構造を調べたところ、ステム・ループを多く含む構造を取り得ることが示された。

これらの結果から、LDR は過剰に発現すると生育を阻害する toxin タンパク質をコードする安定な mRNA と、antisense RNA として機能する不安定な RNA を転写している、toxin-antitoxin モジュールをもつ配列であった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 川野 光興

大腸菌ゲノム配列解析から約 500 bp という長大な機能未知の反復配列が発見された。その染色体上の配置がほぼ染色体上の対称な位置に存在することから、その機能解明が待たれていた。本論文は機能解明を目的にバイオインフォマティクスを利用した類似配列の再探索、欠失や過剰生産系の細胞に与える影響の解析、コードされる RNA やタンパク質の同定を試み、以下の点を明らかにした。

- 1) 新たな探索方法を開発し、新規類似配列を発見した。その結果、すでに存在している領域が同反復配列のホットスポットになっている可能性を示した。
- 2) 入手した 10 種のバクテリアのゲノムを用い、Southern 解析の結果大腸菌に近縁の腸内細菌に分布していることを示した。
- 3) 生理機能を調べるために、反復配列の欠失および多コピープラスミドからの過剰供給の実験から、欠失による影響は見られなかったが、過剰供給による致死性を示した。また過剰供給による核様体の形態変化を明らかにした。
- 4) 致死性を示す原因を同定することを目的に Northern 解析を行った結果、2 種類の RNA を同定し、それぞれの RNA の半減期を示した。また、Primer extension の実験でそれぞれの RNA の転写開始点の同定を行い、mRNA と anti sense RNA である可能性を示し、転写調節機構のモデルを提唱した。

以上のように、本論文は大腸菌およびその近縁のバクテリアゲノムに存在する長大な反復配列の機能解析を行ったもので、タンパク質がコードされている可能性を示し、2 種類の RNA を同定した。タンパク質自身の同定には到らなかったが、転写調節機構に関するモデルを提唱し、特にタンパク質コード領域のみによって細胞を死に至らしめる機能を持つことを証明した。細胞死をもたらす遺伝子の同定を行った研究で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。