

所属 (主指導教官)	遺伝子教育研究センター 生体情報 森 浩禎		
氏名	Md. Arifuzzaman	提出	平成 14 年 1 月 8 日
題目	Characterization of HscC (Hsc62), homologue of Hsp70 in <i>Escherichia coli</i> : overexpression of HscC modulates the activity of house keeping sigma factor σ^{70} . (大腸菌 Hsp70 ファミリータンパク質、HscC(Hsc62)タンパク質の機能解析：HscC タンパク質の過剰発現は σ^{70} の活性阻害を引き起こす)		
要旨	<p>HscC, the third member of the Hsp70 family in <i>Escherichia coli</i>, shares 33 % identity with the two other homologues, DnaK and HscA, and displays ATPase activity. An important role for DnaK is its inhibitory effect on σ^{32} activity, which contributes to the regulation of gene expression during the heat shock response. Genetic and biochemical evidences indicate that DnaK-DnaJ chaperone system interacts with σ^{32}, thus, DnaK involved in negative regulation of the heat shock response.</p> <p>Although HscC is a highly conserved protein in Hsp70 family, its function is still unknown. In this thesis, I focused on the physiological function of HscC and described the first characterization of HscC as a possible negative regulator of σ^{70}. I could not detect significant expression of the <i>hscC</i> gene under normal laboratory condition. However, the <i>in vivo</i> primer extension analysis and <i>in vitro</i> transcription assay revealed that overexpression of HscC specifically reduced the σ^{70}-dependent promoter activity and also inhibited normal cell growth. In addition, the co-purification analysis showed the interaction of HscC or the putative ATPase and substrate binding domains of HscC with σ^{70}. These results indicate that HscC forms a complex with σ^{70} and negatively regulates its activity. To elucidate the domain(s) responsible for the functional specificity of HscC, I constructed a set of hybrid proteins containing all combinations of ATPase, substrate-binding, and C-terminal domains</p>		

of DnaK and HscC. I observed that the hybrid molecules carrying the ATPase domain of HscC and the substrate-binding domain of either HscC or DnaK reduced the σ^{70} -dependent promoter activity and also form complex with σ^{70} . The result suggests that the ATPase domain determine the functional specificity of HscC *in vivo*. Based on the findings, both the ATPase and substrate-binding domains of HscC are important for the physiological function of HscC.

From these findings, I speculate that the Hsp70 family of proteins might interact with various σ factors through their ATPase and substrate-binding domains to control sigma (σ) factor activity *in vivo*.

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Md. Arifuzzaman

Hsp70 ファミリーに属するタンパク質は分子シャペロンとして細胞内タンパク質の品質管理機能を担うことが明らかにされてきた。本研究においては、大腸菌に存在が確認された3つ目の新規 Hsp70 タンパク質である HscC の細胞内機能の解明を目的に、遺伝学的および生化学的な解析を行ったものである。

申請者はこの遺伝子の生理機能を調べるために、欠失および過剰供給による細胞の変化の観察を行った。欠失による表現形の変化を観察することができなかったが、多コピープラスミドからの過剰供給を行ったところ、生育を阻害することを明らかにした。

この遺伝子の周辺の構造解析の結果、上流の *ybeK* とオペロンを形成している可能性が高いが、*ybeK* と *hscC* との間にはターミネーター様の配列が存在することから発現が減少する可能性が考えられた。そこで、この遺伝子の細胞内での発現を調べる為に、*lacZ* 遺伝子との融合遺伝子を作製し、その発現解析を行った。その結果、配列解析により予測されたように上流の *ybeK* からオペロンとして発現される可能性が高いこと、そしてターミネーターにより *hscC* への流れ込みが抑えられている可能性を指摘した。これまで DnaK が heat shock 転写因子の σ^{32} の活性を制御することが明らかになっていたので、HscC も同様に σ 因子の活性を制御するかどうかを検討したところ、 σ^{70} を特異的に制御することを発見した。in vivo における転写抑制を primer extension 実験によって、さらに in vitro における転写実験により、 σ^{70} 依存性のプロモーターを特異的に抑制することを明らかにした。抑制機構の解析を目的として、HscC と σ^{70} との特異的な相互作用の存在を確認する為に、His タグを利用して HscC タンパク質と相互作用するタンパク質の同定を行った。その結果、HscC が特異的に σ^{70} と相互作用することを明らかにした。Hsp70 タンパク質は ATPase、基質結合、そして C 末端の各ドメイン構造をとることが明らかにされており、HscC もそれぞれに対応する領域が存在し、同様の構造をとっていることが考えられる。そこで、申請者はその部分が特異性を決定しているかを明らかにすることを目的として、DnaK と HscC の各ドメインを入れ替えたキメラタンパク質の作製を行い、相互作用解析および生理機能解析を行った。その結果、基質特異性を決定しているのは、基質結合ドメインではなく、ATPase ドメインであることを示した。本研究で特に重要な発見は HscC の基質となるものが house keeping 遺伝子群の発現を制御する転写因子の σ^{70} であることを示した点にある。 σ^{70} は定常状態に機能する転写因子であるが、それを抑えるシャペロンの存在が自然界での大腸菌にとってどのような意味があるのか、大きな問題を提起したものだといえる。また、基質特異性を利用して、分子シャペロンの詳細なドメインの機能解析へと展開が進んだ。

以上のように、本論文は分子シャペロンにおける生理的な機能分担、各ドメインの詳細な解析により新しい知見を与えるもので、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。