

論文内容の要旨

申請者氏名 中川 明

グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) は、RNA ポリメラーゼに直接結合し、そのプロモーター認識能、転写開始能を変化させることにより、細胞レベルでの転写調節に大きな影響を与えるグローバルな制御因子である。本分子はアミノ酸飢餓やグルコース枯渇などの栄養飢餓ストレス、対数増殖期から定常期への移行時に一過的に細胞内に蓄積されることが観察されている。大腸菌において ppGpp は、RelA タンパク質、SpoT タンパク質により合成され、SpoT タンパク質により分解される。RelA タンパク質の ppGpp 合成機構は酵素学的には多くの研究蓄積がある。しかし、その遺伝子である *relA* の発現制御機構はほとんど解明されておらず、ppGpp による細胞内生理機能ネットワークの全体像解明において重要な研究である。申請者はこの点に注目し、ppGpp 量の制御の全体像解明を目的に、*relA* 遺伝子の発現制御機構の解析を進めた。

申請者はまず、*relA* 遺伝子の発現制御領域の同定を試みた。その結果、すでに報告されているプロモーターのさらに上流に新しいプロモーターを同定した。既知のものを P1、新たに発見したものを P2 と命名し、プライマー伸長法による転写開始点を決定した。Western 解析より、RelA タンパク質は、これら 2 つのプロモーターに依存して発現することが示された。P1 からの転写は恒常性を示すのに対し、P2 は対数増殖期から定常期への生育相移行期に一過的な転写の活性化を示すことが明らかになった。

生育相移行期は、細胞増殖を止め、定常期に向けた細胞内生理状態の遷移期であり、トランスクリプトーム解析の結果からも非常に多くの遺伝子群の発現の変化が報告されている。しかし、その制御機構はほとんど明らかになっていない。ppGpp はこの生育相移行期に一過的に細胞内量の増加が観察される分子であり、状態遷移のシグナル分子としての可能性が議論されているが、その分子機構は不明である。そこで、P2 の発現制御機構をモデルとして、生育相移行期における転写制御機構の解析を進めた。申請者は配列解析より P2 領域に CRP の結合様配列を確認し、本転写因子による制御の可能性、そして生育相移行期の染色体高次構造変化に機能する H-NS などの核様体タンパク質による制御の可能性を考え、それらの変異株による解析を進めた。

CRP タンパク質をコードする *crp* 遺伝子の変異による *in vivo* の実験、精製 CRP タンパク質と P2 制御領域 DNA との *in vitro* 結合実験の結果から、P2 プロモーターの CRP の結合による転写調節機構を明らかにした。H-NS をコードする *hns* 及び *crp* の単独及び 2 重変異株の解析、そして精製した CRP と H-NS タンパク質による *in vitro* の P2 への結合実験より、H-NS が CRP の DNA 結合能、もしくは転写活性化能を強める機能を見出した。更に *hns* 変異株内での P2 からの発現の減少を *rpoS* 変異と ppGpp を合成できない SpoT の変異が抑制することを発見した。

申請者は、以上の結果より、CRP、H-NS、RpoS、ppGpp 各因子による *relA* P2 プロモーターの生育相移行期における一過的転写活性化の分子機構のモデルを提唱した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中川 明

多様な環境の変化に対応するため、バクテリアは様々なストレス応答機能を進化させてきた。アミノ酸飢餓における緊縮応答機構も重要な環境応答機構の一つである。この応答にはグアノシン 4 リン酸 (ppGpp) の一過的な細胞内量の変動が伴う。またこの分子は、対数増殖期から定常期に移る際に、一過的に細胞内濃度が増大することから、細胞増殖における生育相変動のシグナル分子としての可能性が注目され、その合成機構の解明が進められてきた。大腸菌においては、*relA* 遺伝子および *spoT* 遺伝子による ppGpp の合成調節機構が明らかにされている。SpoT タンパク質は ppGpp の合成と分解を行うことのできるタンパク質で、その遺伝子は生育に必須である。一方、*relA* 遺伝子はアミノ酸飢餓状態での緊縮応答を示さない、リラックス型の変異株として分離されており、ppGpp 合成能を持つタンパク質をコードする。

ppGpp 分子は、RNA ポリメラーゼの β , β' サブユニットに結合し、プロモーター選択に機能するシグマ因子の RNA ポリメラーゼコア酵素との結合選択性を変えることによる転写調節に機能することが知られている。さらに ppGpp の合成はリボソームの状態と密接に関連しており、特に緊縮応答における RelA による ppGpp の合成は、リボソームとの相互作用が必要である。

対数増殖期から定常期に移る際、染色体構造の変化を伴うことが知られており、この構造変化は H-NS, Fis, HU など一群の核様体タンパク質と呼ばれる因子による制御を受けている。しかし、現在までこの変動のシグナルの実体は明らかになっていない。

申請者の中川氏は、対数増殖期から定常期への生育相移行期における分子機構に着目し、移行期に一過的に蓄積する ppGpp の調節機構の解明に向けて、その合成酵素である RelA タンパク質をコードする *relA* 遺伝子の発現調節機構の解析を進めた。これまで *relA* 遺伝子の解析から明らかにされていた発現調節機構とは別に、一過的に生育相移行期に活性化される新たなプロモーターを発見し、その転写調節の分子機構の解析を進めてきた。その結果、本プロモーターの活性化に必要な因子群の同定に成功し、H-NS, CRP, RpoS による転写機構モデルを提唱した。

以上の研究結果は、ppGpp 合成を司る RelA タンパク質の転写調節機構の全体像を明らかにし、生育相移行の分子機構解明への糸口を与える学術上の貢献である。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。