

論文内容の要旨

博士論文題目 枯草菌 RNA ポリメラーゼの細胞内の動態

氏名 楠屋 陽子

(論文内容の要旨)

近年、ChIP-chip 解析によって、mRNA 合成酵素である RNA ポリメラーゼ (RNAP) の生体内の動態が、細菌から真核生物まで、様々な生物で明らかにされつつある。RNAP は DNA 上の特別な認識配列 (プロモーター) に特異的に結合し、その後、ダイナミックに立体構造を変化させてプロモーターから離脱し、DNA 上を進行しつつ mRNA 合成を進める。この移行には、様々な障壁が存在し、RNAP が停滞することが知られている。

大腸菌では、RNAP の停滞に関して、いくつかの異なる原因が報告されている。RNAP がプロモーターに結合したまま離脱しない‘プロモーター停滞 (poised RNAP)’、プロモーター近傍 (下流) 領域の特定の DNA 配列に依存して RNAP が停滞する‘プロモーター近傍停滞 (promoter-proximal paused RNAP)’、アテニュエーションシグナルと呼ばれる特殊な DNA 配列に依存して生じる‘転写減衰 (transcription attenuation)’である。これらの RNAP 停滞には、RNAP がプロモーターを認識するために必要とされる σ 因子や、転写伸長時に RNAP のサブユニットとして機能する転写伸長因子 NusA が重要な機能を果たすことが明らかとなっている。

本研究では、まず、枯草菌における RNAP の挙動を、 σ 因子、RNAP (β' サブユニット)、NusA のゲノム上の分布の ChIP-chip 解析により明らかにした。その結果、大腸菌と異なり、枯草菌においては、RNAP の停滞は、限られた遺伝子においてのみ観察され、それらの遺伝子は転写減衰により転写伸長が制御されていることが明らかになった。このことから、枯草菌では、転写開始時の転写制御機構として、転写減衰が主として働いていることが示唆された。

さらに、枯草菌遺伝子にはプロモーター近傍の停滞を抑制するメカニズムがあることを想定し、大腸菌で、プロモーター近傍の RNAP 停滞の抑制因子として機能している GreA の関与を解析した。その結果、GreA を不活性化した枯草菌では、多くの遺伝子で RNAP のプロモーター近傍での停滞が観察されるようになった。この結果は、枯草菌でも、転写の開始または伸長の初期段階において RNAP の停滞が起こるが、転写伸長因子 GreA がその停滞の解消に重要な役割を果たしていることを示している。

以上の解析により、枯草菌では転写開始時の RNAP の停滞は基本的に GreA により抑制されており、枯草菌で観察される RNAP のプロモーター近傍での停滞は転写減衰配列によって積極的に誘導されているという、大腸菌とは異なる転写制御機構の特徴が明らかとなった。

氏名	楠屋 陽子
----	-------

(論文審査結果の要旨)

DNA 結合タンパク質と共精製されるゲノム DNA 断片を、タイリングアレイを用いてゲノム配列上にマッピングする ChIP-chip (Chromatin immunoprecipitation coupled with tiling chip) 法は、細胞内での DNA 結合タンパク質のゲノム上での分布を可視化できる、近年開発された研究手法である。申請者は、ChIP-chip 法を駆使しつつ、生化学的、遺伝学的解析も行うことにより、枯草菌 RNA ポリメラーゼの細胞内の動態について、以下のような、新たな知見を得た。

まず、転写開始因子 σ^A 、PNAポリメラーゼコア酵素 (RNAP)、転写伸長因子 NusA の ChIP-chip 解析を行い、それらのプロモーター領域からコード領域における分布を統計的に解析することにより、転写開始反応から伸長反応の移行において、 σ^A -RNAP 複合体から NusA-RNAP 複合体への変換が起こることを、細胞内で示した。さらに、興味深いことに、大腸菌では RNAP のプロモーター近傍での停滞が多く、転写単位で観察されるのに対して、枯草菌では転写減衰配列によるプロモーター下流での積極的な RNAP の停止は観察されるが、開始複合体から伸長複合体の移行時における開始複合体の蓄積は起こっていないことを見出した。

申請者は、こうした特徴的な枯草菌 RNAP の挙動に転写因子 GreA が関与していることを想定し、GreA の ChIP-chip 解析と *greA* 変異株における RNAP の ChIP-chip 解析を行った。その結果、GreA は転写開始複合体及び伸長複合体の双方と結合していること、さらに、GreA の機能が失われると RNAP のプロモーター近傍での蓄積が誘導されることを示し、枯草菌における転写開始複合体から伸長複合体へのスムーズな移行に、GreA が積極的な役割を果たしていることを示した。

このように、本論文は先端的なゲノム科学的手法により枯草菌細胞内での RNAP の挙動の特徴をゲノムワイドに解明し、それが大腸菌 RNAP の挙動とは異なり、その結果、両細菌における転写制御戦略の違いにも関係している可能性を示したものであり、細菌細胞内における転写制御システムの理解に大きく貢献するものである。また、基礎生物学の上で重要な結果を得たのみでなく、開発した研究手法は病原性細菌や有用細菌の転写制御システムの理解にも貢献するものであり、実用面でも意義のあるものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。