

氏名	樊 玉琪
学位の種類	博 士 ( 学 術 )
学位記番号	博 甲 第 8131 号
学位授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Analysis of Toxin-Antitoxin System in <i>Thermus thermophilus</i> HB27 ( <i>Thermus thermophilus</i> HB27 株における Toxin-Antitoxin システムの解析)

主査	筑波大学教授	博士(農学)	中村 顕
副査	筑波大学教授	農学博士	星野 貴行
副査	筑波大学准教授	博士(生命科学)	應 蓓文
副査	筑波大学教授	博士(農学)	高谷 直樹

## 論 文 の 要 旨

Toxin-antitoxin (TA) system は多くのバクテリアや古細菌のゲノム・プラスミド中に多数見出される遺伝子群である。TA system は以前、プラスミドの安定保持や抗ウイルス因子として機能すると考えられてきたが、近年ではストレス時に細胞を休眠状態へ導く cell persistence の現象と関連すると考えられており、注目を集めている。従来 TA system の解析は、常温菌、特に病原性細菌を中心になされており、好熱性細菌などの極限環境細菌ではほとんど報告がない。

樊氏は本論文で、これまでに TA system の報告がない高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株に着目し、本菌株のゲノム中に見いだされる TA system について以下の解析を行った。

まず、HB27 株ゲノム中に見いだされる、既知の VapBC および HicBA TA system と相同性を示す 7 種の遺伝子が、実際に TA system として機能するのかどうかを検討した。これら 7 種の TA を toxin のみ、あるいは TA ペアで大腸菌に導入して異種発現させ、生育に与える影響を検討した結果、VapC に分類される TTC0125 toxin と HicB に分類される 2 種(TTC1395、TTC1705)の toxin を発現させた場合に生育抑制が認められ、その生育抑制は対になる antitoxin との共発現では認められないことを明らかにした。その結果、これら 3 種が実際に機能する TA system であると結論した。

次に VapBC に分類される TTC0125-TTC0126 に着目し、酵素活性などの生化学的な解析を行った。まず TTC0125 toxin 及び TTC0126 antitoxin を、大腸菌を宿主にそれぞれ生産・精製した。精製タンパク質を用い

て酵素活性について検討した結果、TTC0125 は遊離の一本鎖 RNA に対する RNase 活性を有するが、TTC0126 の添加によりその活性が阻害されること、さらに TTC0125 は tRNA および intact ribosome 内の rRNA には作用しないことを明らかにした。また TTC0125 は *in vitro* で mRNA を分解することにより翻訳を阻害し、その阻害は TTC0126 により抑制されることを明らかにした。この結果、TTC0125 は細胞内で mRNA を分解することにより翻訳を阻害し、生育抑制を引き起こすものと結論した。

VapC toxin は PIN domain を有しており、活性中心は 3 つの酸性アミノ酸で構成される。そこで樊氏は次に、他の VapC toxin との alignment から、TTC0125 の活性中心を D4, E40, D99 であると推定し、これらを含んで、他の VapC toxin との間で保存されているアミノ酸残基 計 14 か所を選択し、これらに部位特異的変異によりアミノ酸置換を導入した。これらの変異体について、大腸菌を宿主とした生育抑制活性及び *in vitro* での RNA 分解活性を検討した結果、活性中心と推定される 3 残基を含む計 9 アミノ酸の変異により、どちらの活性も失われることを明らかにした。これらのアミノ酸のほとんどは、TTC0125 の立体構造モデル上でタンパク質の同じ面に位置しており、活性中心及び基質結合に関わる残基、ならびに活性中心の構造維持に必要な残基であると推定している。

最後に樊氏は、TTC0125-TTC0126 の細胞内での機能について検討を行うために、TTC0125 単独及び TTC0126 との同時破壊株を作製し、これらの変異株が低濃度のカナマイシンに対して有意な耐性を示すことを明らかにした。さらに TTC0125-TTC0126 は、他の TA module と異なり、glyoxylate や malate に関連した一次代謝酵素と推定される遺伝子群とオペロンを形成していることを明らかにした。これらの結果から、TTC0125-TTC0126 はオペロンを構成する代謝酵素遺伝子と何らかの機能的関連があるものと推定した。

## 審 査 の 要 旨

今まで報告されていなかった *T. thermophilus* の TA system について解析を行い、3 種が実際に TA として機能することを明らかにした点は、高度好熱菌で TA system が機能していることを示した初の報告である。また、そのうちの 1 種について分子レベルで機能を詳細に明らかにした点、及びこの TA system が細胞内で抗生物質ストレスと関連することを明らかにした点は学術的に高く評価できる。さらに、この TA system が一次代謝酵素をコードする遺伝子群とオペロンをなしており、両者が機能的に関連することを推定した点は、今後の TA system の研究に新たな展開をもたらすと考えられる。

平成29年1月27日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。