

氏 名（本籍）	あ ん どう よ し な り 安 藤 吉 成（愛 知 県）
学 位 の 種 類	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 3983 号
学位授与年月日	平成 18 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	Study on the Mechanisms of Gene Expression Regulated by Non-coding RNAs and DEAD Box RNA Helicases in <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌非翻訳型 RNA 及び DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼによる遺伝子発現制御機構の解析)
主 査	筑波大学教授 理学博士 漆 原 秀 子
副 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治
副 査	筑波大学助教授 理学博士 坂 本 和 一
副 査	筑波大学助教授 理学博士 中 村 幸 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

自己切断するリボザイムやリボソームの rRNA 自身が機能を持つことが発見されて以来、RNA 自身の持つ機能が注目されている。特に、細胞内には tRNA や rRNA 以外にも安定な非翻訳型 RNA が多く存在し、タンパク質合成以外の様々な生命現象に関与していると考えられている。このような非翻訳型 RNA の機能発現には、大きな構造変化や他のタンパク質と相互作用することが必要となり、多くの生物でこれに関与する DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼは報告されている。従って、非翻訳型 RNA、及び DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼの機能解明は、生命現象をシステムとして理解する上で重要な課題である。

本研究では、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いて、非翻訳型 RNA、及び DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼによる遺伝子発現制御機構の解析を行った。まず、枯草菌において単離・同定した BS190 RNA 及び BS203 RNA が非翻訳型であることを明らかにし、それらの遺伝子欠損変異株を用いて機能解析を行った。いずれの欠損株でも野生株と比較して大きな変化は見られなかったが、DNA マイクロアレイ解析、及びノーザン解析の結果から、BS190 RNA 遺伝子欠損株において 6 遺伝子の発現が 20 倍以上に上昇していることを見出した。これらの遺伝子は全て、*ilv-leu* オペロン上に存在しており、5' 領域に 450 塩基からなるリーダー領域が存在した。塩基配列を解析した結果、BS190 RNA は、このリーダー配列と連続した 10 塩基の相補配列を 2 箇所持ち、ゲルシフト実験によってこれらの領域での結合を確認した。さらに、試験管内での転写系を用いて、BS190 RNA が *ilv-leu* オペロンの転写を阻害することを証明した。これまでに非翻訳型 RNA による翻訳レベルでの遺伝子発現制御機構は、アンチセンス RNA など数多く報告されているが、転写レベルでの制御機構は知られておらず、BS190 RNA は、転写レベルで遺伝子発現の制御を行う非翻訳型 RNA の最初の例と考えられる。

一方、枯草菌のゲノム情報をもとにして、DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼとして、YdbR を同定し、精製したタンパク質を用いて生化学的な解析を行った。その結果、YdbR タンパク質が ATP 依存性の RNA ヘリカーゼ活性および RNA 依存性の ATP 加水分解活性を有していることが示された。*ydbR* 遺伝子を欠損

した変異株を構築したところ、37℃において、野生株と比較して増殖速度は1.6倍の遅れが生じた。さらに、低温条件下（22℃）での生育ではその遅れが2倍になったが、一方、高温条件下（45℃）では生育の遅れは見られず、野生株と同様の生育曲線を示した。また、増殖期の野生株において、45℃から16℃に温度シフトして1時間培養後に、*ydbR* 遺伝子 mRNA の量が約10倍に上昇することを見出し、YdbRが低温に対するストレス応答をしていることを明らかにした。さらに、YdbRタンパク質の細胞内での局在をショ糖密度勾配遠心法及びウェスタン解析を用いて解析したところ、YdbRタンパク質が50Sサブユニット、70Sリボソームモノマー、及びポリソームと相互作用している可能性が示唆された。ポリソームとの相互作用は、YdbRタンパク質がリボソームの翻訳機能にも関与している可能性を示唆している。これらの結果は、RNAヘリカーゼの多様な機能の解明に寄与するものとして重要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、細胞内に存在する安定な非翻訳型RNAがタンパク質合成以外の様々な生命現象に関与しているとして注目されている。非翻訳型RNAの機能発現には、大きな構造変化や他のタンパク質と相互作用することが必要となり、これにはDEADボックス型RNAヘリカーゼが関与するとされている。従って、非翻訳型RNA、及びDEADボックス型RNAヘリカーゼの機能解明は、生命現象をシステムとして理解する上で重要な課題である。本論文によって、枯草菌における非翻訳型RNA及びRNA結合タンパク質による新規の遺伝子発現制御機構が示唆された。今後、両者の遺伝子発現の詳細を明らかにしていくことで、非翻訳型RNA、及びDEADボックス型RNAヘリカーゼによる新たな遺伝子発現制御機構の発見につながることを期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。