

氏名(本籍)	あ べ きみ ひろ 安部 公博 (茨城県)			
学位の種類	博 士 (理 学)			
学位記番号	博 乙 第 2523 号			
学位授与年月日	平成 22 年 10 月 31 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
審査研究科	生命環境科学研究科			
学位論文題目	Functional Analysis of Tex Protein on the Regulation of Toxin Gene Expression in <i>Clostridium perfringens</i> (ウェルシュ菌における Tex タンパク質による毒素遺伝子発現調節機構の解析)			
主査	筑波大学准教授	理学博士	中 村 幸 治	
副査	筑波大学教授	理学博士	漆 原 秀 子	
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂 本 和 一	
副査	筑波大学准教授	博士(工学)	野 村 暢 彦	

論 文 の 内 容 の 要 旨

大規模な転写解析や非翻訳型 RNA の機能解析などの成果から、予想以上に多くの非翻訳型 RNA や 5' 非翻訳領域から転写されるアテニューター様 RNA が同定されている。これらの機能解析の結果、生体内における遺伝子の発現制御では、これまでに知られている転写アクチベーターやリプレッサーのような DNA 結合タンパク質だけでなく、非翻訳型 RNA や RNA 結合タンパク質などの新たなトランス因子やアテニューターなどのシス因子が、重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。DNA 結合タンパク質は主に、転写の開始を制御するのに対し、非翻訳型 RNA や RNA 結合タンパク質による遺伝子発現制御は、転写伸長や mRNA の安定化及び翻訳段階での調節を行うと考えられている。特に、病原性細菌においては、病原因子の発現制御に、RNA 結合タンパク質と非翻訳型 RNA が関与する例が多数報告されており、病原性の発現機構という観点から、RNA 結合タンパク質と非翻訳型 RNA の相互作用による遺伝子発現制御機構の解明は、重要な課題である。

Tex タンパク質は、百日咳菌において同定されており、C 末端側に SI RNA 結合ドメインをもつ。百日咳菌において、Tex は、菌の生存に必須であり、pertussis toxin (*ptx*) や adenylate cyclase toxin (*cyaA*) の毒素遺伝子の発現を制御する。一方、肺炎球菌においては、Tex は必須ではなく、また、本菌の主要な毒素である pneumolysin (*ply*) の発現調節には関与していないことが報告されている。Tex は、細菌種間における高い保存性から、細菌にとって重要な調節因子であることが考えられるが、病原因子の発現制御機構や標的となる RNA 分子とその相互作用機構については、不明な点が多い。

本研究では、ヒトの大腸内に常在する病原細菌種であるウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) を用いて、RNA 結合タンパク質 Tex の毒素遺伝子発現制御における機能の解析を行った。まず、ウェルシュ菌において、Tex が、毒素遺伝子の発現を制御しているかどうかを調べるため、ウェルシュ菌 *tex* 遺伝子破壊株を作製し、ノザン解析によりウェルシュ菌毒素遺伝子群の mRNA 量を野生株と *tex* 遺伝子破壊株との間で比較した。その結果、26 個の病原遺伝子のうち、プロテアーゼ、溶血毒素、腸管毒素、接着因子の発現には変化がみら

れなかったが、*tex* 遺伝子破壊株において、3種類のヒアルロニダーゼ遺伝子 (*nagH*, *nagJ* 及び *nagL*) とシアリダーゼ遺伝子 (*nanJ*) の mRNA の発現量が減少した。次に、*Tex* が、標的 mRNA の安定性を調節しているかどうか検討するため、対数増殖期中期のウェルシュ菌野生株と *tex* 遺伝子破壊株を対数増殖期まで培養し、リファンピシン添加により、細胞内の転写を停止させ、その後、*Tex* 標的遺伝子について経時的にノザン解析を行った結果、両者の間で、顕著な違いはみられなかった。*Tex* 標的遺伝子の mRNA の 5' 末端とプロモーター構造を解析するために、プライマーエクステンション法により、それぞれの転写開始点を決定した。その結果、*Tex* 標的遺伝子は、それぞれ独自のプロモーターをもつことが明らかとなった。しかし、プロモーター上流には共通配列は見出されなかった。

Tex のもつ SI RNA ドメインは RNA と結合するほか、DNA とも結合し得ることが知られている。*Tex* と DNA /RNA への結合能を *in vitro* において検証するために、標的遺伝子のプロモーター DNA 及び mRNA 5' 末端領域をプローブとし、精製した *Tex* を用いて、それぞれ、ゲルシフト法により解析したところ、*Tex* は、*Tex* 標的遺伝子のプロモーター DNA 断片には結合活性を示さなかったが、*Tex* 標的遺伝子 mRNA の 5' 末端領域と結合した。また、*Tex* の制御を受けないコラゲナーゼ遺伝子 (*colA*) の mRNA を用いた競合阻害実験の結果から、*Tex* とその標的遺伝子 mRNA との結合は、特異的であった。

一方、ウェルシュ菌体内において、His タグ付の *Tex* を発現させ、結合する RNA 分子の解析を行ったところ、2成分制御系 VirR/VirS 系の重要な因子である VR-RNA と結合することが分かった。さらに、VR-RNA 欠損株を作成し、毒素遺伝子の発現への影響を解析したところ、*Tex* 標的遺伝子であるヒアルロニダーゼ遺伝子 (*nagH*, *nagJ* 及び *nagL*) とシアリダーゼ遺伝子 (*nanJ*) の mRNA の発現量が増加していた。

以上の結果から、*Tex* は mRNA の 5'UTR に結合し、転写レベルで標的遺伝子の発現を正に調節する一方、VR-RNA は *Tex* に結合することで、*Tex* と標的 mRNA の 5' 領域との相互作用を阻害し、*Tex* 標的遺伝子を負に制御している制御モデルが示唆された。本研究から得られた知見は、RNA 結合タンパク質の病原性に関係した遺伝子の転写レベルでの発現制御機構の理解に寄与するものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、大規模な転写解析の結果、新規非翻訳型 RNA のほかに、5' 非翻訳領域に由来する転写物が数多く、同定されている。これらは、遺伝子発現制御において、アテニューエーター領域からの転写物と考えられ、予想以上に多くの遺伝子が転写の伸長段階での調節を受けていることが明らかとなった。生体内において、一次代謝産物や RNA 結合タンパク質はこれらの領域と結合し、生物を取り巻く環境変化に応じた遺伝子の発現制御を行っている。従って、機能性の非翻訳型 RNA の機能解析に加え、RNA 結合タンパク質による転写レベルでの遺伝子発現制御機構の解析は、遺伝子発現制御のネットワークを解析するために必須な研究課題であるといえる。本論文によって、細菌類によく保存されている 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ことは重要であり、いまだ未知な部分が多いリボ制御機構を解明する上で、多大なる寄与をすることが期待される。

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。