

学 位 論 文 題 名

生体内ポリリン酸の遺伝子転写制御に関する研究

学位論文内容の要旨

ポリリン酸はリン酸が数個から数千個直鎖状に高エネルギーリン酸結合した化合物である。自然界においては、バクテリアなどの原核生物から高等真核生物であるほ乳類や緑色植物に至る様々な生物の組織内及び細胞内でその存在が確認されている。ポリリン酸は種々の生理機能を有する可能性があるにも関わらず、その詳細は未解明なままである。本論文では、大腸菌におけるポリリン酸の機能の一つであるストレス応答に関係する遺伝子の発現制御に焦点をあて、そのメカニズムを明確にすることを目的として実験を行った。本論文は、5章から構成されており、それぞれの概要は以下の通りである。

第1章は序論であり、本研究の目的を明らかにした。

第2章では、ポリリン酸の *rpoS* 遺伝子転写制御について観察した。大腸菌においてポリリン酸合成酵素をコードする遺伝子 (*ppk*) を欠損した株は、過酸化水素や浸透圧ショック、熱ショックに対する耐性が低下することが報告されており、ポリリン酸が大腸菌のストレス応答に重要な役割を果たしていると考えられている (Crooke et al. 1994; Rao and Kornberg 1996)。そこで本章では、ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を解明することを試みた。大腸菌菌体内のポリリン酸濃度は、菌体内でポリリン酸分解酵素を高発現させることにより検出限界以下にまで減少させた。その結果、ポリリン酸分解酵素高発現株では野生株と比較して過酸化水素に対して高感受性となった。また、その際にカタラーゼをコードする *katE* 遺伝子の転写効率が低下していた。更に、*katE* 遺伝子の発現を制御している *rpoS* 遺伝子の転写を観察したところ、菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率も低下していることが分かった。つまり、菌体内ポリリン酸の減少による過酸化水素耐性の低下は *rpoS* 遺伝子の発現低下に起因することが分かった。本章により、菌体内ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現制御因子である *rpoS* 遺伝子の転写を制御していることを明らかにすることができた。

第3章では、ポリリン酸の転写制御因子としての機能が他のストレス応答遺伝子にも影響を与えているか否かについて調べた。そこで、代表的なストレス応答レギュロンである SOS 遺伝子群の転写に及ぼすポリリン酸の影響を観察した。第2章で述べた方法を用いて菌体内ポリリン酸濃度を低下させると、マイトマイシン C (MMC) 及び UV に対して高感受性となった。この感受性の上昇は、菌体内で PPK を高発現させることによって回復することから、SOS 応答とポリリン酸との関連性が示唆された。このメカニズムを解明するために、SOS 遺伝子の一つである *recA* 遺伝子の転写量を観察した。その結果、菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *recA* 遺伝子の転写誘導効率が低下することが分かった。また、菌体内で PPK を過剰発現させ、菌体内ポリリン酸の濃度を上昇させると、UV や MMC による DNA 損傷の有無に関わらず、*recA* 遺伝子の転写が誘導されることが分かった。*recA* 遺伝子以外の SOS 遺伝子として *umuDC* 遺伝子の転写への影響を観察したところ、菌体内のポリリン酸濃度が低下すると *umuDC* 遺伝子の転写誘導効率も低下することが分かった。これらの結果より、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転写誘導にも関与していることが分かった。また、ポリリン酸が、大腸菌内すべての遺伝子の転写誘導制御にグローバルに関わっている可能性を調べる目的で、ストレス応答遺伝子以外の遺伝子である *lacZ* の転写誘導にポリリン酸が与える影響について調べた。その結果、ポリリン酸の *lacZ* 遺伝子転写誘導への影響は認められなかった。これらの結果より、ポリリン酸による転写誘導の制御は大腸菌すべての遺伝子に対する非特異的なものではないことが分かった。

第4章では、ポリリン酸の遺伝子転写制御機構の一つの可能性として考えられているポリリン酸と RNA polymerase の相互作用について観察した。その結果、*in vitro* 及び *in vivo* において、ポリリン酸と RNA polymerase の相互作用を示す結果が得られた。このことから、ポリリン酸が RNA polymerase と結合することにより RNA polymerase の機能的性質に影響を与え、promoter の選択性等を変化させる可能性が示唆された。

第5章は総括であり、本研究により大腸菌ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにすることができた。ポリリン酸の存在はバクテリアからほ乳類に至るまで広く確認されていることから、大腸菌以外においてもポリリン酸が転写制御因子として機能している可能性がある。今後更に多くの生物でポリリン酸の合成や分解等の代謝に関わる遺伝子がクローニングされることにより、ポリリン酸と遺伝子転写制御の関連性が解明されていくものと期待される。本論文で得られた成果は、今後ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにする上での足がかりとなるものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	棟方正信
副査	教授	上館民夫
副査	教授	木下晋一
副査	教授	高井光男
副査	助教授	柴肇一

学位論文題名

生体内ポリリン酸の遺伝子転写制御に関する研究

ポリリン酸はリン酸が数個から数千個直鎖状に高エネルギーリン酸結合した化合物である。自然界においては、バクテリアなどの原核生物から高等真核生物であるほ乳類や緑色植物に至る様々な生物の組織内及び細胞内でその存在が確認されている。ポリリン酸は種々の生理機能を有する可能性があるにも関わらず、その詳細は未解明なままである。本論文では、大腸菌におけるポリリン酸の機能の一つであるストレス応答に関係する遺伝子の発現制御に焦点をあて、そのメカニズムを明確にすることを目的として実験を行った。本論文は、5章から構成されており、それぞれの概要は以下の通りである。

第1章は序論であり、本研究の目的を明らかにした。

第2章では、ポリリン酸の *rpoS* 遺伝子転写制御について観察した。大腸菌においてポリリン酸リン酸化酵素をコードする遺伝子 (*ppk*) を欠損した株は、過酸化水素や浸透圧ショック、熱ショックに対する耐性が低下することが報告されており、ポリリン酸が大腸菌のストレス応答に重要な役割を果たしていると考えられている (Crooke et al. 1994; Rao and Kornberg 1996)。そこで本章では、ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を考え、ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を解明することを試みた。大腸菌菌体内のポリリン酸濃度は、菌体内でポリリン酸分解酵素を高発現させることにより検出限界以下にまで減少させた。その結果、ポリリン酸分解酵素高発現株では野生株と比較して過酸化水素に対して高感受性となった。また、その際にカタラーゼをコードする *katE* 遺伝子の転写効率が低下していた。更に、*katE* 遺伝子の発現を制御している *rpoS* 遺伝子の転写を観察したところ、菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *rpoS* 遺伝子の転写誘導効率も低下していることが分かった。つまり、菌体内ポリリン酸の減少による過酸化水素耐性の低下は *rpoS* 遺伝子の

発現低下に起因することが分かった。本章により、菌体内ポリリン酸がストレス応答遺伝子の発現制御因子である *rpoS* 遺伝子の転写を制御していることを明らかにすることができた。

第3章では、ポリリン酸の転写制御因子としての機能が他のストレス応答遺伝子にも影響を与えているか否かについて調べた。そこで、代表的なストレス応答レギュロンである SOS 遺伝子群の転写に及ぼすポリリン酸の影響を観察した。第2章で述べた方法を用いて菌体内ポリリン酸濃度を低下させると、マイトマイシンC (MMC) 及びUVに対して高感受性となった。この感受性の上昇は、菌体内でポリリン酸リン酸化酵素を高発現させることによって回復することから、SOS 応答とポリリン酸との関連性が示唆された。このメカニズムを解明するために、SOS 遺伝子の一つである *recA* 遺伝子の転写量を観察した。その結果、菌体内ポリリン酸濃度の低下によって *recA* 遺伝子の転写誘導効率が低下することが分かった。また、菌体内でポリリン酸リン酸化酵素を過剰発現させ、菌体内ポリリン酸の濃度を上昇させると、UV や MMC による DNA 損傷の有無に関わらず、*recA* 遺伝子の転写が誘導されることが分かった。*recA* 遺伝子以外の SOS 遺伝子として *umuDC* 遺伝子の転写への影響を観察した結果、菌体内のポリリン酸濃度が低下すると *umuDC* 遺伝子の転写誘導効率も低下することが分かった。これらの結果より、ポリリン酸が SOS 遺伝子群の転写誘導にも関与していることが分かった。また、ポリリン酸が、大腸菌内すべての遺伝子の転写誘導制御にグローバルに関わっている可能性を調べる目的で、ストレス応答遺伝子以外の遺伝子である *lacZ* 遺伝子の転写誘導にポリリン酸が与える影響について調べた。その結果、ポリリン酸の *lacZ* 遺伝子転写誘導への影響は認められなかった。これらの結果より、ポリリン酸による転写誘導の制御は大腸菌すべての遺伝子に対する非特異的なものではないことが分かった。

第4章では、ポリリン酸の遺伝子転写制御機構の一つの可能性として考えられているポリリン酸と RNA polymerase の相互作用について観察した。 [³²P]ラベルしたポリリン酸と RNA polymerase を混合して gel shift assay を行った結果、ポリリン酸-RNA polymerase 複合体の形成が濃度依存的に観察された。また Native-PAGE では、菌体内で PPK を過剰発現させた際の RNA polymerase の移動度の増加が観察された。これらの結果から、*in vitro* 及び *in vivo* におけるポリリン酸と RNA polymerase の相互作用が示された。このことから、ポリリン酸が RNA polymerase と結合することにより RNA polymerase の機能的性質に影響を与え、promoter の選択性等に変化を及ぼしている可能性が示唆された。

第5章は総括であり、本研究で得られた成果を総括した。

これを要するに、著者は本研究によって大腸菌ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにすることができた。ポリリン酸の存在はバクテリアからほ乳類に至るまで広く確認されていることから、大腸菌以外においてもポリリン酸が転写制御因子として機能している可能性がある。今後更に多くの生物でポ

リリン酸の合成や分解等の代謝に関わる遺伝子がクローニングされることにより、ポリリン酸と遺伝子転写制御の関連性が解明されていくものと期待される。本研究は、今後ポリリン酸の遺伝子転写制御因子としての機能を明らかにする上での足がかりとなるものであり、微生物工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。