

論文内容の要旨

申請者氏名 Ebru Uyar

細菌の核様体タンパク質は、転写・複製・組換え等の過程に関与すると共に、ゲノム DNA の折りたたみによる高次構造の形成とその制御も担っている。そうした、核様体タンパク質の中で、大腸菌の主要核様体タンパク質 H-NS は、多くの研究が行われてきている。また、StpA は、H-NS との間で 58% のアミノ酸配列が保存されている核様体タンパク質であり、生化学的性質も H-NS と非常に似ていることも明らかになっている。しかしながら、*hms* 破壊が増殖に大きな影響を与えるのに対して、*stpA* 破壊株の増殖は、野生株と比較して変化が認められない。そこで、StpA と H-NS の細胞内での機能を明らかにすることを目的として、ChIP-chip 法により、細胞内での StpA と H-NS のゲノム DNA 上の分布を調べた。

まず、ChIP-chip 解析のために、*hms* あるいは *stpA* 遺伝子に Flag タグを付加した株を作製した。作製した株の増殖速度は野生株と変化せず、H-NS 及び StpA の発現量にもタグの付加は影響を与えなかった。そして、Flag タグを利用し、H-NS と StpA を細胞内から精製し、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した。その結果、野生株のバックグラウンドでは、両タンパク質の分布は基本的に一致していた。

次に、*stpA* 破壊株における H-NS の分布と *hms* 破壊株における StpA の分布を解析した。なお、両変異株においても H-NS あるいは StpA の発現量は変化しないことも確認した。その結果、*stpA* 破壊株における H-NS の分布は、野生株に対して、大きな変化は認められなかった。このことは、*stpA* 破壊株において、明確な表現型が認められないことと一致している。

対照的に、*hms* 破壊株において、StpA の結合部位は、野生株に比べて約 1/3 に減少した。*stpA* にタグが付加された *hms* 破壊株の増殖速度が、本来の *stpA* 遺伝子を持つ *hms* 破壊株に比べて、低下していたため、後者の株について、StpA 抗体を用いて解析を行ったが、結果は変化しなかった。また、StpA は、DNA 結合のために基本ユニットである 2 量体形成能が、H-NS に比べて低いことが知られており、2 量体形成能を上げる F21C 変異を導入した株を作製した。変異の導入により、StpA の 2 量体形成能が H-NS と同等になることを確認したが、ゲノム上の分布は大きく変化しなかった。これらの結果は、StpA の DNA 結合能は H-NS と異なっていること、野生株における StpA の結合部位には、H-NS 非依存の部位と H-NS 依存性の部位があることを示している。また、*hms* 破壊株では、野生株において H-NS/StpA によって発現が抑制されている遺伝子の多くが発現するようになり、その結果、増殖の抑制が起ることを示唆している。

今まで、StpA の細胞内での機能は不明であったが、本研究により、その基本的な性質を明らかにすることができた。今後、どのような生育条件で、StpA の機能が必須になるか、特に病原性大腸菌を用いた研究が興味深い。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ebru Uyar

細菌のゲノム DNA は、細胞内では、核様体タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質により、高度に折りたたまれた高次構造を形成している。また、核様体タンパク質は、転写・複製・組換え等にも関与している。近年、GFP 融合タンパク質等を用いた細胞生物学的解析、あるいは、ChIP-chip 法を用いた DNA 結合タンパク質の分布のゲノムワイドな解析等の手法の導入により、核様体構造の理解に新たな展開がもたらされている。例えば、多くの研究が行われてきた、大腸菌の核様体タンパク質 H-NS についての ChIP-chip 解析により、ゲノム上の約 400 の結合部位がマッピングされ、H-NS が水平伝達によりゲノム上に挿入された遺伝子の発現抑制に重要な役割を果たしてきたと考えられることが明らかとなっている。

申請者は、H-NS のパラガス遺伝子である StpA について、ChIP-chip 解析を中心に、その細胞内での機能を明らかにすることを試みた。病原性大腸菌を含めて、H-NS を保持する細菌の大部分は、パラガス遺伝子を保持しており、大腸菌 StpA のアミノ酸配列は、H-NS の配列との間で 58% が保存されている。また、生化学的性質も基本的に同一であると考えられてきた。しかしながら、*hms* 遺伝子の破壊が大腸菌の増殖に大きな変化を与えるのに対して、*stpA* 遺伝子の破壊は影響がなく、StpA の細胞内での機能については不明な点が多かった。

申請者は、様々な遺伝学的背景のもとで、ChIP-chip 法により、StpA 及び H-NS のゲノム上での分布を比較解析し、野生株では両タンパク質の結合部位はオーバーラップしていること、そして、H-NS の結合部位は *stpA* 遺伝子破壊株でも変化しないのに対して、StpA の結合部位は *hms* 遺伝子破壊株で約 1/3 に減少することを明らかにした。さらに、StpA の結合部位の減少は、DNA 結合単位である 2 量体量等の影響ではなく、StpA と H-NS 固有の DNA 結合能の違いによると考えられることを明らかにした。また、野生株における StpA の結合部位には、H-NS 非依存の部位と H-NS 依存性の部位があることも明らかとなった。この結果、*hms* と *stpA* の破壊の大腸菌の増殖に対する影響の違いの背景が明らかになると共に、StpA の細胞内の働き方について、新たな興味深い知見を得られた。

このように、本論文は、ChIP-chip 法という新たな研究手法を駆使して、StpA の細胞内での基本的な性質を明らかにしたものであり、今後、細菌ゲノムの進化や核様体構造の変化を通じた環境応答機構の理解に、大きく貢献するものである。また、StpA は病原性細菌の進化や病原遺伝子の発現制御にも重要な役割を担っていると考えられ、本論文は、基礎生物学の上で重要な結果を得たのみでなく、病原細菌の理解という側面でも意義のあるものである。よって、本論文は博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値のあるものと認める。