

# 論文内容の要旨

申請者氏名 上田 剛士

H-NSは $\gamma$ -プロテオバクテリアに保存されており、核様体タンパク質ではもともと精力的に研究されているものである。近年、ChIP-chip解析とトランスクリプトーム解析により、H-NSは外来遺伝子のサイレンシングに重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。また、H-NSパラログであるStpAについても、大腸菌ゲノム上の結合領域が決定され、H-NSの結合領域と重複しているが、その結合はH-NS非依存性の部位とH-NS依存性の部位があることが明らかとなり、StpAはH-NSの機能を微調節していることが示唆されている。さらに、H-NS/StpAはDNA結合ドメインと2量体形成ドメインからなるが、腸内細菌ゲノムにはDNA結合ドメインを欠いたパラログが見いだされている。大腸菌にはHhaとYdgTの2種が存在し、それらはH-NS、StpAとヘテロダイマーを形成することが示されている。また、YdgTは野生株において細胞内分子数が少なく、*hha*欠失株で発現が誘導されるため、Hha機能をバックアップしていると考えられている。さらに、いくつかの遺伝子の発現制御機構の解析から、Hha/YdgTはH-NSとヘテロダイマーを形成することで、H-NSによる転写制御に関与していることが示唆されている。

本研究では、H-NS/StpAとHha/YdgTが協調的に働くことが、大腸菌におけるサイレンシングシステムの構築に大きな役割を担っていると予想し、トランスクリプトーム解析、ChIP-chip解析、そしてタンパク質相互作用解析を用いて、大腸菌におけるH-NS様タンパク質群の転写抑制機構における協調的な働きを体系的に解明することを試みた。その結果、各種変異株のトランスクリプトームプロファイルの比較により、H-NS/StpAにより発現が抑制されている遺伝子群のサブセットの転写抑制にHha/YdgTは必須であることを明確に示すことができた。また、ChIP-chip解析の結果は、HhaはH-NS/StpAと大腸菌ゲノム上に共局在しているが、HhaのゲノムDNAへの結合は直接的ではなく、H-NS/StpAとの相互作用を介したものであることを示していた。興味深いことに、*hns/stpA*欠失株のみで発現が上昇する遺伝子、すなわち、Hha/YdgT非依存的にH-NS/StpAの発現抑制を受けている遺伝子では、H-NS/StpAはそのプロモーター領域に結合している傾向が見られ、一方、*hha/ydgT*欠失株で発現が上昇する遺伝子、すなわち、Hha/YdgT依存的にH-NS/StpAの発現抑制を受けている遺伝子では、コード領域にまでH-NS/StpAの結合が広がっていた。こうした結果は、H-NS/StpAによる遺伝子抑性は、H-NS/StpAのプロモーター領域への結合で十分な場合と、Hha/YdgTの結合により、ゲノムDNAの凝縮や離れた部位のBridgingを引き起こす、高次のH-NSホモログ-DNA複合体の形成が必要な場合があることを強く示唆している。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 上田 剛士

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 DNA 結合領域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 に関する ChIP-chip 解析によって、H-NS の結合部位が大腸菌ゲノム上にマッピングされた結果、H-NS が水平伝達によりゲノムに挿入された遺伝子に選択的に結合し、その発現抑制に重要な役割を果たしてきたことが強く示唆されている。また、H-NS のホモログである StpA についてもゲノムワイドな解析が行われ、H-NS による転写抑制を微調節している可能性が示唆されている。

さらに、腸内細菌ゲノムには DNA 結合ドメインを欠いた H-NS パラログが見いだされているが、その機能解析の多くは個別の遺伝子制御に関するものにとどまっており、ゲノムワイドな解析は行われていない。申請者は、大腸菌でのそうしたパラログである Hha と YdgT の H-NS/StpA による転写抑制への関与をゲノムワイドな解析により明確にすることを試みた。その結果、各種 H-NS パラログの欠失変異株におけるトランスクリプトーム及び、H-NS、Hha の結合プロファイルの比較により、H-NS/StpA レギュロンに属する遺伝子のサブセットの転写抑制に Hha/YdgT が必須であること、Hha のゲノムへの結合は、DNA 結合能を有する H-NS/StpA との相互作用を介していることを明確に示した。さらに、Hha/YdgT 依存的に発現制御を受けている遺伝子群と非依存性遺伝子群周辺の H-NS/StpA 結合プロファイルの比較から、H-NS/StpA による転写抑制性は、H-NS/StpA のプロモーター領域への結合で十分な場合と、Hha/YdgT の結合により、ゲノム DNA の凝縮や離れた部位の Bridging を引き起こす、高次複合体の形成が必要な場合があることを強く示唆する興味深い結果を得た。

このように、本論文は、今まで断片的で矛盾も含んでいた Hha/YdgT の機能に関する研究において、体系的な解析により明確な結論を得たという点で大きな意義を持つ。さらに、複数のパラロガス遺伝子の相互作用を介した、細胞内での遺伝子発現制御という非常に興味深い問題の解明の出発点となるという意味で、H-NS 様タンパク質の機能研究にとどまらない、基礎生物学の上で重要な結果を得たと評価できる。また、H-NS/StpA によってサイレンシングを受けている遺伝子群の中には、病原性遺伝子も多く、病原細菌の病原性の解明のために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。