

論文内容の要旨

申請者氏名 村山 智彦

RNA ポリメラーゼ (RNAP) のコア酵素は、 α 、 β 、 β' のサブユニットより構成され、DNA を鋳型に相補的な RNA 合成を行う触媒活性を持つ。コア酵素は、 σ 因子と結合してホロ酵素を形成し、遺伝子のプロモーター配列と結合して、転写開始複合体を形成する。このとき、RNAP の α サブユニットは、転写因子あるいはプロモーターの上流配列 (UP エlement) と相互作用することで、RNAP がプロモーター領域と結合するのを助けている。 α サブユニットは、N 末端ドメイン (α -NTD) および C 末端ドメイン (α -CTD) から成り、 α -NTD が RNAP サブユニットの会合に必須である一方、 α -CTD は転写因子および UP エlement と直接相互作用することで、転写開始複合体の形成を促進する。

α -CTD の機能は、大腸菌を用いた分子生物学的あるいは生化学的な実験手法により精力的に解析が行われてきた。その結果、 α -CTD は転写開始複合体の安定化、プロモーターの開裂、転写伸長因子 NusA との相互作用など、転写開始に限らず、転写伸長あるいは停止にも関与する可能性が示唆されてきた。一方で、大腸菌以外の細菌の α -CTD に関する解析は限られている。枯草菌には、 α -CTD と直接相互作用し、様々なストレス応答に関与する Spx と呼ばれる枯草菌特異的なタンパク質の存在が知られている。 α -CTD は細菌種によりその機能が異なる可能性がある一方、UP エlement との相互作用に必要とされる一次構造の保存性は、種を超えて高い。加えて、UP エlement は多くの細菌種で見出されることから、種を超えて保存されている α -CTD の機能が存在することも明らかである。しかしながら、 α -CTD に関するゲノムワイドな解析は、黄色ブドウ球菌のみで行われておらず、異なる細菌種における α -CTD の機能を比較検討する情報が十分にあるとは言い難い。

本研究では、枯草菌 α -CTD の機能をゲノムワイドに解析し、大腸菌と比較検討することを目指した。培養液に加える誘導物質を切り替えることで、細胞内で発現している野生型 α サブユニットを、 α -CTD を欠失した変異型 α サブユニット切り替えられる枯草菌株を作成した。次に、作成した株を用いて、トランスクリプトーム解析および RNA ポリメラーゼのゲノム上の結合領域を決定する ChAP-chip 解析を行った。その結果、枯草菌の α -CTD は、対数増殖期から定常期への生育状態の変化、および糖の代謝またはリボソームの生合成に関わっていることが判明した。大腸菌においても、 α -CTD がこれらの機能に関与していることが広く知られており、 α -CTD の生物学的な重要性は種を超えて維持されていることが示された。その一方で、 α -CTD 欠損の影響を受ける個々の遺伝子を詳細に調べたところ、大腸菌と枯草菌では、 α -CTD の関わる転写制御機構が異なることが示された。このことは、 α -CTD が細菌種の転写制御機構の多様性に寄与していることを示している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 村山 智彦

細菌の RNA ポリメラーゼ (RNAP) のコア酵素は細菌種を超えて高度に保存されており、 $\alpha^2\beta\beta'$ のサブユニットからなる複合体である。また、転写はコア酵素に σ 因子が結合してホロ酵素を形成した後、プロモーター配列と結合し、転写開始複合体を形成するところから始まるが、そのプロモーター配列も種を超えて保存されている。転写開始は転写強度を決定する最も重要なステップであり、一部のプロモーターでは、-35 領域の上流に存在するアデニン、チミンに富む DNA 配列 (UP エlement)、あるいは転写因子結合部位に結合した転写活性化因子と RNAP の α サブユニットが直接相互作用することが、RNAP とプロモーターとの結合、それに続く転写開始に必要とされる。

α サブユニットの機能は、主に大腸菌を用いて詳細に解析されてきた。特に大腸菌の様々な転写活性化因子あるいは UP エlement と α サブユニットの相互作用に関しては、詳細なメカニズムが明らかになっている。しかしながら、他の細菌種における α サブユニットの機能は、明らかになっているとは言い難い。大腸菌と並び、モデル微生物として、多くの転写制御機構の機能解明に用いられてきた枯草菌においても、 α サブユニットの機能解析は、特定の遺伝子制御に関与する特定の転写因子との相互作用のみに限定されており、大腸菌と枯草菌の α サブユニットの機能が両者に保存されているのか、あるいは高度に分化しているのかは明らかでない。

本論文では、枯草菌の高度な遺伝子組み換え技術を用い、野生型 α サブユニットの発現を停止し、代わりに C 末端領域を欠損した α サブユニットを発現させ、 α サブユニットの C 末端ドメイン (α -CTD) を欠失した RNAP が、RNAP 全体の 70% を占める株を構築した。次に、この株を用いたトランスクリプトームおよび ChAP-chip 解析により、転写プロファイルおよび RNAP の枯草菌ゲノム上の分布を網羅的に決定した。その結果、枯草菌の α -CTD は炭素源の代謝、リボソームの合成など枯草菌の増殖に関わる機能に寄与していることを明らかにした。大腸菌の α -CTD もこれらの生理機能に関わる転写制御に関与していることから、 α -CTD の生理的な重要性は細菌種を超えて保存されていることが示された。一方で、 α -CTD が制御する遺伝子や制御システムは、大腸菌と枯草菌で異なっており、 α -CTD は転写制御機構の多様性にも寄与することが、同時に示された。なお、これらの成果は、申請者が筆頭著者である論文 (The role of α -CTD in the genome-wide transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* cells, 2015 年 PLoS One 印刷中) にて報告されている。

以上のように、本論文は細菌の転写制御機構の主要因子である RNAP の α サブユニットの機能を、枯草菌の高度な遺伝子工学的手法とゲノム解析技術によって解析したもので、RNAP の新たなゲノム解析手法の開発、枯草菌 RNAP に関する基盤的知見の蓄

積等、学術上、さらには応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

学力の確認の結果の要旨

申請者氏名 村山 智彦

試問の科目・方法・判定

| (科 目) | (方 法) | (判 定) | (備 考) |
|-------------|-------|-------|-------|
| <u>関連科目</u> | 口頭試問 | 合格 | |
| <u>外国語</u> | 口頭試問 | 合格 | |

審査委員一同は、平成27年 7月28日 本論文申請者に対し博士論文の関連科目及び外国語について上記のとおり試験を行った結果、本学大学院博士後期課程を修了した者と同等以上の学力を有することを確認した。