

論文内容の要旨

申請者氏名 澤 誠人

RNA 分解酵素の Ribonuclease (RNase) は遺伝子発現の転写後制御において重要な役割を担っている。*Corynebacterium glutamicum* (コリネ型細菌) は主要な RNase を 3 種類保有しており、その一つが RNase III である。RNase III は二本鎖 RNA を特異的に切断し、mRNA、rRNA、non-coding RNA の分解と成熟化に関与している。近年、small RNA や RNA 結合タンパク質などの研究から、細菌における遺伝子発現にも転写後制御が重要であることが明らかになってきた。本研究では、コリネ型細菌において転写後制御を担う RNase III の発現制御機構とその標的遺伝子について解析を行った。

まず、主要な RNase である RNase E/G と RNase J の破壊株 ($\Delta rneG$ 、 Δrnj) をそれぞれ作製し、RNase III をコードする *rnc* 遺伝子の発現量を解析した。その結果、野生株と比較して、 $\Delta rneG$ 株および Δrnj 株では *rnc* mRNA の発現量が有意に増加していた。また、 $\Delta rneG$ 株および Δrnj 株における *rnc* mRNA の半減期は野生株よりもそれぞれ増加し、安定性の増加が確認された。さらに、RNase III の細胞内における存在量を解析したところ、野生株と比較して $\Delta rneG$ 株および Δrnj 株では増加していた。以上の結果から、RNase E/G や RNase J が RNase III の発現量を制御していることが判明した。

大腸菌では、RNase III 自身が *rnc* mRNA を分解することで発現を制御している。そこで、コリネ型細菌において RNase III の機能欠損株 (*rnc* E138A) を作製し、*rnc* mRNA の発現量および安定性を解析した。その結果、野生株と *rnc* E138A 株で *rnc* mRNA の発現量や安定性に有意な差は見られなかった。以上の結果から、コリネ型細菌では RNase III による *rnc* mRNA の自己発現制御は行われていないと結論付けた。

逆に、RNase III が RNase E/G や RNase J の発現を制御しているのか調べるため、野生株と Δrnc 株で *rneG* mRNA と *rnj* mRNA の発現量解析を行った。その結果、野生株と比較して Δrnc 株では両 mRNA の発現量に差は見られなかった。以上の結果から、コリネ型細菌において RNase III は RNase E/G や RNase J により制御を受けているが、RNase III は RNase E/G や RNase J の発現を制御しないことが判明した。

RNase の高発現は増殖に必須な mRNA を過剰に分解し、増殖に悪影響を及ぼす可能性がある。そこで、*gapA* プロモーターを含むプラスミドを用いて RNase III 発現株を作製したところ、生育に悪影響は見られず *rnc* mRNA の発現量が野生株の約 9.6 倍に増加した。この結果から、コリネ型細菌では RNase III が高発現できることが判明した。

本研究によって、コリネ型細菌における mRNA 分解を担う主要な RNase の制御関係を明らかにした。また、コリネ型細菌においては RNase III の高発現が可能であるということも判明した。今後、RNase III の標的遺伝子の特定や切断点の認識機構の解明を行い、複数遺伝子の発現量を制御することで効率的な発酵生産への応用が期待される。

やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 澤 誠人

グルタミン酸をはじめとする多くのアミノ酸の発酵生産に古くから利用されてきた有用工業微生物である *Corynebacterium glutamicum* (コリネ型細菌) は、mRNA 分解の引き金となる主要な RNA 分解酵素の Ribonuclease (RNase) として、RNase III、RNase E/G、RNase J の 3 種類を保有している。その一つである RNase III は、二本鎖 RNA を特異的に切断し、mRNA、rRNA、non-coding RNA の分解と成熟化に関与している。また、生理的役割として他の微生物では見られない細胞分裂に関連する遺伝子の発現を制御していることが知られている。近年、small RNA や RNA 結合タンパク質などの研究から細菌における遺伝子発現にも転写制御だけでなく、転写後制御が重要な役割を担っていることが明らかになってきた。申請者の所属する研究室では、これらの主要 RNase の発現制御機構や生理的役割を理解し、得られた知見をもとに代謝を制御することで有用物質生産への応用を目指している。

申請者は、コリネ型細菌における転写後制御を担う RNase III の発現制御機構および標的遺伝子について解析を行い、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) RNase III について、遺伝子破壊株の表現型、mRNA の安定性、タンパク質の発現レベル、5'RACE 解析による切断点などの解析により、RNase III は、他の主要 RNase である RNase E/G や RNase J により発現制御を受けていることを明らかにした。
- 2) RNase III 遺伝子破壊株の解析により、RNase III は、他の主要 RNase である RNase E/G や RNase J の発現制御を行っていないことを明らかにした。
- 3) RNase III の機能欠損株を用いた RNase III 自身の発現解析により、大腸菌とは異なり、自己発現制御が行われていないことを明らかにした。
- 4) 大腸菌とは異なり、コリネ型細菌の RNase III の過剰発現が可能であることを明らかにした。

以上の結果から、コリネ型細菌における mRNA 分解を担う主要な RNase の制御関係を明らかにした。また、コリネ型細菌においては RNase III の過剰発現が可能であるということも判明した。今後、RNase III の標的遺伝子の特定や切断点の認識機構を解明し、複数遺伝子の発現量を人為的に制御することで発酵生産への応用が期待できる。

以上のように、本論文はコリネ型細菌の RNase III について、他の主要 RNase との発現制御および自己発現制御の有無について解析し、他の微生物とは異なる RNase III の発現制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、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。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】