

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 千穂

プラスミド等の可動性遺伝因子は宿主の新規遺伝子の獲得を補助し、宿主の環境適応（進化）に重要な役割を担う。プラスミド上の遺伝子が宿主染色体由来の因子の制御を受けることは以前から知られていたが、最近の研究から宿主染色体上の遺伝子もまたプラスミド由来の因子の制御を受けることが示されている。このようなプラスミドー宿主染色体間相互作用の鍵因子として、本研究では核様体タンパク質 (NAPs) に着目している。NAPs は DNA に結合し、DNA の構造を変化させることで多くの遺伝子の転写を制御する。プラスミド pCAR1 (*Pseudomonas* 属細菌を主な宿主とする) には NAPs の一種である MvaT ホモログ Pmr がコードされており、*P. putida* KT2440 株を宿主とした解析から、Pmr は pCAR1 が宿主にもたらす特異的な形質の発現に関与すること、pCAR1 保持に伴う宿主への負荷を軽減する作用を持つことが明らかとなっていたが、このような Pmr の機能が発現する分子機構は不明であった。*Pseudomonas* 属細菌の MvaT ホモログは腸内細菌の H-NS とアミノ酸配列の保存性は無いものの、大腸菌の *hns* 破壊株の表現型を相補できることから「H-NS ファミリータンパク質」に含まれる。H-NS は C 末端側の DNA 結合ドメインで標的塩基配列に結合した後、その分子を「足場」にして N 末端側の二量体/多量体化ドメインにより DNA 上で多量体化することで外来遺伝子領域の転写を抑制する。このため本研究では、Pmr の多量体形成様式と塩基配列認識機構という観点から、Pmr の転写制御機構の解明を目的としている。

本論文は 6 章から成り、第 1 章では序論として腸内細菌の H-NS と *Pseudomonas* 属細菌の MvaT を中心に、H-NS ファミリータンパク質に関する研究の現状を述べている。

第 2 章では Pmr のホモ多量体化に重要な領域の同定を行い、Pmr と H-NS におけるホモ多量体形成機構の違いを議論している。様々に切り縮めた Pmr 派生体のホモ多量体形成能をタンパク質間クロスリンク法で評価した結果、N 末端側 61 残基から成る Pmr_{nt61} が二量体/多量体ドメインであることを同定した。Pmr_{nt61} のモデル構造からホモ多量体形成に重要と予測された 22 残基のアラニン置換体を作製したところ、7 残基のアラニン置換体でホモ多量体形成能が低下していた。これらの残基は Pmr_{nt61} の N 末端側に集中していたが、H-NS ではこの領域に加えて両ドメインを繋ぐリンカー領域近傍もホモ多量体形成に重要であることが示されていた。一方 Pmr の場合、当該領域のホモ多量体形成への寄与は認められなかったことから、H-NS と Pmr とではホモ多量体形成に重要な領域が異なり、両者は異なる分子機構で機能発現していることが明らかとなった。

第 3 章では Pmr と KT2440 株染色体由来の MvaT ホモログ TurA, TurB とのヘテロ多量体形成について議論している。以前に各遺伝子破壊株のトランスクリプトーム解析と改変クロマチン免疫沈降法による結合箇所の同定が行われたが、各因子は独自のレギュロンを持

つにも拘わらず結合箇所は一致するという矛盾した結果が得られていた。本研究ではこの矛盾を解決するためヘテロ多量体形成時の結合比に着目した。表面プラズモン共鳴法を用い、固定化した Pmr, TurA, TurB に対して Pmr を結合させたところ、TurB-Pmr 間の結合比は TurA-Pmr, Pmr-Pmr 間の結合比の約半分であることが示唆された。すなわち最初の「足場」によって次に生じるホモ・ヘテロ多量体の組成が変化し、最終的に多量体が結合する範囲（転写が抑制される範囲）が変化するため、ヘテロ多量体の組成が各因子の転写制御に重要であると考えられた。

第4章では多量体形成の「足場」の形成位置を調べるため、Pmr, TurA, TurB の塩基配列特異性の比較を試みている。多量体形成が塩基配列特異性の評価を妨害することが明らかとなったため、単量体で存在する Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメイン (Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct) と多様な塩基配列のライブラリーを用いて SELEX 法による高親和性塩基配列の同定を試みたが、標的塩基配列の濃縮は見られなかった。ゲルシフトアッセイでは poly[d(I-C)]（競合核酸として使用される）への結合も見られたことから、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct は標的塩基配列への特異性が低く、多様な塩基配列中から高親和性塩基配列を同定することは難しいと判断された。

第5章ではこれまでに得られた知見を構造学的に議論することを目指して、Pmr とその派生体を用いた結晶化条件のスクリーニングを行っている。1,728 条件の中から微結晶が生じる条件が見出されており、結晶の質を高めるための条件検討を行ったことが論じてある。

以上本研究からは、Pmr の転写制御に重要な多量体形成機構と塩基配列認識機構の一部が明らかになった。同一のプラスミドが異なる宿主に保持された場合、プラスミドや宿主染色体の転写が宿主毎に変化することが報告されているが、異なる宿主は異なる NAPs を持つという観点に立てば、本研究はプラスミドが異宿主内でどのように機能発現するかを解明する上で重要な基盤情報を与えるものであり、応用上も基礎科学的にも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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。