

論文の内容の要旨

題目 大腸菌及び近縁種における alternative σ のレギュロン、プロモーター、プロモーター認識に関する研究

氏名 野中 源

バクテリアの RNA ポリメラーゼ (RNAP) は、 $\alpha_2\beta\beta'\omega$ の 4 サブユニット 5 量体からなる本体 (コア酵素) 及び σ サブユニット (σ 因子) から構成され、コア酵素に σ が結合することで活性型のホロ酵素となる。RNAP による転写において、 σ は転写開始のプロセスで重要な役割を果たす因子であり、プロモーターの認識 (recognition) とプロモーターへの結合 (binding)、そして巻き戻し (melting) の機能を担っている。プロモーターによっては複数の σ に認識されるものも存在するが、通常はプロモーターと σ がセットになっており、転写する遺伝子群 (レギュロン) に応じて σ を使い分けるのである。多くのバクテリアは housekeeping σ (σ^{70}) と呼ばれる生育に必須な遺伝子を発現するための σ の他に、環境変化やストレスへの応答、そして形態変化などの限られた状況に必要な特別なセットの遺伝子を発現するための alternative σ と呼ばれる σ を複数保持している。housekeeping σ のレギュロンは通常 1000 を超える大所帯である。特殊な任務を担当する alternative σ のレギュロンは数 10~100 程度にとどまる。 σ による認識と σ 及び RNAP による結合を受けるために、プロモーター側にも特別な仕組みが備わっている。転写開始点から約 -35bp 上流にある -35 領域、約 -10bp 上流にある -10 領域には特徴的な配列があり、いずれも σ による認識と σ への結合の中心的な役割を担っている。また、一部のプロモーターには -10 の直ぐ上流に E-10 (extended-10) が存在し、-35 の機能を補っている。これらはコア・プロモーター・エレメント (core promoter element) と呼ばれ、認識する σ に応じてそれぞれ非常によく保存されている。*E. coli* では各々の σ に支配されるプロモーターの解析から各 σ に対するプロモーターの共通配列 (コンセンサス配列) がわかっている。プロモーターによってはコアエレメントの更に上流に UP エレメントと呼ばれる α サブユニットが結合する配列をもつものがある。各 σ が認識するプロモーター配列の特徴 (コンセンサス配列) に関してはバクテリアのモデル生物の一つである *E. coli* を中心に比較的研究が進んでおり多くが解明されつつある。変化する環境に対処するためにバクテリアが使いこなす複数の alternative σ がどのような戦略で各々の選択的な遺伝子発現を実現しているのか、 σ 側の特徴からのアプローチはこれからの重要な研究課題の一つである。

E. coli は 7 つの σ を持つ。1000 以上の遺伝子を支配下に置く housekeeping σ である σ^{70} 、一般的なストレスに対応する σ^S 、鉄の制御に関わる FecI、鞭毛の制御に関わる σ^{28} 、そして熱ショック等によるタンパク質へのストレスに関わる 2 つの σ 、 σ^{32} と σ^E 、窒素源利用に関わる σ^{54} である。細胞が熱ショックに晒されたとき、熱ショックタンパク質と呼ばれる一連のタンパク質が素早くそして選択的に誘導される。この熱ショック応答と呼ばれる現象は 1963 年に Ritossa により *Drosophila* ではじめて発見された。その後熱ショック応答の主要な機能が、シャペロンやプ

ロテアーゼの誘導による細胞内のタンパク質の適切な折り畳み状態の維持であることが明らかとなった。*E. coli*は熱ショックにより誘導される一連のタンパク質の発現を2つ alternative σ である σ^{32} 及び σ^E を用いて行う。 σ^{32} は、熱ショックやその他ストレスによる細胞質の異常タンパク質の蓄積によって誘導される。傘下には、異常タンパク質の修復除去などに関わるシャペロンやプロテアーゼなどを擁する。 σ^E は、熱ショックやエタノールショック、その他によるペリプラズムの異常タンパク質の蓄積によって誘導され、ペリプラズムのタンパク質の恒常性維持に関わる遺伝子を支配下に置く。過去の研究における網羅的な解析により σ^E については*E. coli*においてほぼ全レギュロンが明らかとなっている。一方で σ^{32} についてはレギュロンの全貌が解明されておらず網羅的な手法による全貌の解明が待たれていた。また、こうした一つのセットとしてのレギュロン全貌が明らかとなるのと同時に興味が持たれるのは、レギュロン全体が一つの機能を持った遺伝子群としてどのようなダイナミックな挙動で熱ショックに応答しているかということである。

本研究では、*E. coli*の alternative σ と熱ショック応答を主題に、様々な角度からの検証を行った。課題(1)：*E. coli*における σ^{32} プロモーターと σ^{32} レギュロンの網羅的解明。細胞質の熱ショック応答で中心的な役割を担う σ^{32} について、レギュロンメンバーを網羅的に解明することを目的とした。DNA microarrayを用いたグローバルな遺伝子抽出の手法とプロモーターを推定するためのバイオインフォマティックスの手法、そして全プロモーターを検証すべく転写開始点のマッピング及びin vitro転写、これらを組み合わせることで網羅的かつ高い精度で σ^{32} のレギュロンメンバーのほぼ全てを明らかとした。その結果、 σ^{32} は約50のプロモーター、約90の遺伝子を支配下に置くことがわかり、これまで知られていたレギュロンメンバーを約3倍に増やすことに成功した。そして σ^{32} による熱ショック応答はこれまでに知られていたよりもはるかに広範な細胞内プロセス、そしてタンパク質の保護に及ぶことが明らかとなった。これまで σ^{32} は細胞質の恒常性維持に働いていると考えられてきたが、本研究から細胞膜の恒常性維持にも関与している可能性が示唆されたことは大きな発見と言える。その結果、*E. coli*における熱ショック応答について細胞質と細胞膜は主に σ^{32} が、そしてペリプラズムは主に σ^E が管理するという役割の分担が明らかとなった。本研究に先行して行われた研究では、同様の手法によってペリプラズムの熱ショック応答で中心的な役割を担う σ^E に対しても網羅的なレギュロンの解明を達成している。こうした一連の研究は、ある特定の alternative σ のレギュロンの全貌とそこから明らかになる生理的な役割の全貌を見たという意味で非常に大きな成果と言える。また、 σ^{32} と σ^E という熱ショック応答の主役を通じて熱ショック応答の全貌が見えたことも大きな成果である。課題(2)：*E. coli*及び近縁種における σ^E 全レギュロンの網羅的プロモーターの解析。先にも述べた σ^E に関する先行研究は網羅的な手法によって約60の σ^E プロモーターを明らかとした。本研究ではこの60の全 σ^E プロモーターをGFPに連結したプロモーターライブラリーを構築し、全プロモーターを対象とした発現挙動を解析した。その結果、 σ^E のレギュロンの挙動は予想以上にダイナミックなレンジをもっていること、そしてごく少数の非常に強いプロモーターと大半の弱いプロモーターから構成されていることがわかった。興味深いことに、強いプロモーターは転写

調節因子やポーリンの恒常性維持に関するものであり、*E. coli* とその近縁種でよく保存されているものであった。RNA ポリメラーゼの α -サブユニット C 末端が結合する UP エlement (-35 ~ -65) の存在により、殆どのプロモーターの強度は強められることがわかった。更には σ^E プロモーターが ppGpp や UP エlement の影響を受け、そして σ^E ホロ酵素の細胞内レベルに応じた複雑な制御を受けていることが明らかとなった。ある特定の alternative σ レギュロンの全セットでの挙動を調べた貴重な報告であるばかりでなく、随時変わる環境への適応のための σ^E レギュロン全体がもつダイナミックな応答の様式を垣間見た点でも重要な知見と言える。課題(3)：*E. coli* 及び近縁種における σ^{32} 全レギュロンの網羅的プロモーターの解析。本研究により網羅的に同定された σ^{32} プロモーターの情報と、全 σ^E プロモーターの網羅的な挙動解析によって確立したプロモーターライブラリーを用いた手法により、全 σ^{32} プロモーターの挙動解析を行った。その結果、 σ^{32} のプロモーターも σ^E に劣らず非常にダイナミックなレンジでの挙動を示し (~100 倍のレンジ)、 σ^{32} による広範でダイナミックな熱ショック応答が明らかとなった。そして、シャペロンやプロテアーゼ等のいわゆる古典的な熱ショックタンパク質は強いプロモーターの部類に含まれ、タンパク質の恒常性維持が σ^{32} の最も重要な役割の一つであることが再確認された。また、一方で本研究により見いだされた新規 σ^{32} プロモーターの多くは弱い部類に含まれることから、これまで発見されなかったプロモーターとレギュロンを効率よく解明できていたということがわかった。そして、更には、melting の能力を強化させた変異型 σ^{32} を用いた全 σ^{32} プロモーターの挙動の解析により、 σ^{32} が持つ弱い melting の能力がレギュロンのダイナミックなレンジでの発現に貢献していることを明らかとした。1000 もの遺伝子の発現を司る housekeeping σ とは異なり、alternative σ は σ 自身のこうした melting 能力を巧みに利用した戦略により、環境に応じたダイナミックな遺伝子の発現を可能にしていると考えられる。

本研究では、モデル生物でもある *E. coli* を主に取扱い、様々なレベルでの σ が持つ巧みなメカニズムを明らかとした。alternative σ の生理的な意義に迫るレギュロン遺伝子全貌の解明に始まり、次には alternative σ のプロモーターがどのようにレギュロンの遺伝子発現というアウトプットに寄与しているかをプロモーターの側から解明、更には alternative σ によるレギュロン制御を melting という σ の側からの視点で解析した。「レギュロン」「プロモーター」「 σ によるプロモーター制御」という3つの視点から、*E. coli* の熱ショック応答と alternative σ の理解を大きく前進させた。