

論文審査結果の要旨

Mg²⁺は細胞が正常に増殖・生育するための必須な微量元素の一つである。その働きは主として、酵素の補助因子として知られている。しかしながら、近年、*Salmonella enterica* serovar Typhimuriumにおいて、細胞外Mg²⁺センサーPhoQが発見された。Mg²⁺センサーPhoQは細胞外Mg²⁺濃度を感知し、転写因子PhoPのリン酸化を調節し、種々の遺伝子発現を制御している。このように、細菌細胞においてMg²⁺は細胞の恒常性保持のために、種々の遺伝子発現制御を行う重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

本研究では、大腸菌において細胞外Mg²⁺により制御される遺伝子群(Mg²⁺ stimulon)を明らかにするために、DNAマイクロアレイ解析を用いた。さらに、それらの遺伝子発現がPhoQ-PhoP二成分情報伝達機構により制御されていることをS1 nuclease assay、DNaseI footprinting assay、in vitro transcription analysisを用いて明らかにした。(主論文1)

次に大腸菌PhoQのペリプラズム領域に種々の変異を導入し、それら変異体のMg²⁺センサーとしての機能解析を行い、大腸菌PhoQが実際に細胞外Mg²⁺を感知しているセンサーであることを明らかにした。(主論文2)

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成17年 2月22日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	おがさわら 小笠原	ひろし 寛
学位の種類	博 士 (農学)	
学位記番号	農 第 8 3 号	
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学位論文題目	Transcriptional regulation of DNA repair gene expressions by bacterial signal transduction system	
論文審査委員 (主 査)	教授	内 海 龍 太 郎
(副主査)	教授	河 村 幸 雄
(副主査)	教授	重 岡 成

論文内容の要旨

1. 二成分制御系 CpxR/CpxA システムによるウラシル DNA グリコシラーゼ (*ung*) 遺伝子の発現抑制と突然変異生成機構 (主論文 1)

大腸菌二成分制御系 CpxR/CpxA による *ung* 遺伝子の制御を明らかにするために、転写制御因子 CpxR を菌体内で高発現させた。その結果、*ung* 遺伝子の転写が負に制御され、ウラシル DNA グリコシラーゼの活性も抑制され、G:C→A:T トランジション突然変異が誘発されることが見出された。CpxR/CpxA 系を活性化することで知られている外膜リポタンパク質 NlpE を高発現させても *ung* 遺伝子発現の抑制が観察された。これらのことより、*ung* の発現は、細胞の膜ストレスにより活性化され、CpxR/CpxA により負に制御されることが明らかとなった。DNase I footprinting assay、および Gel shift assay を行った結果、CpxR は、*ung* の転写開始点より上流の -61~-88 の領域 (CpxR box: GTAAA(5N)GTAAA) に結合することが明らかとなり、リン酸化した CpxR は *ung* プロモーターへの結合能が高まることが示された。さらに、*In vitro* において転写実験を行った結果、*ung* の転写はリン酸化された CpxR によって、抑制されることも明らかとなった。これらの結果より、CpxR/CpxA 情報伝達システムによる *ung* の負の制御が突然変異誘導に深く関与していることが明らかとなった。

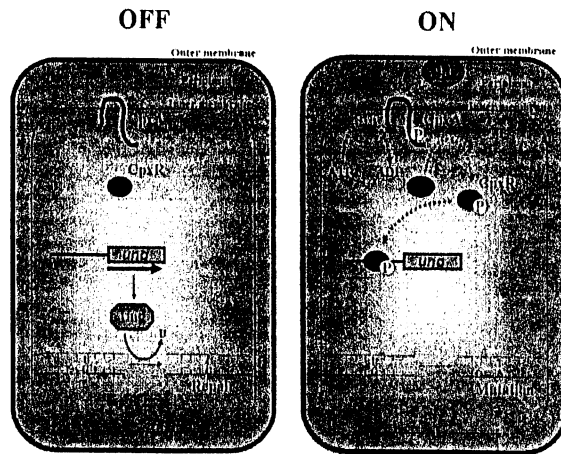


図 1. CpxR/CpxA 系による *ung* 遺伝子制御のモデル

2. 二成分制御系 ArcA/ArcB 系による DNA 修復、複製に関わる遺伝子群の発現制御機構の解明(主論文 2)

大腸菌二成分制御系欠損株を用いた DNA マイクロアレイのデータ (http://ecoli.aist-nara.ac.jp/xp_analysis/2_components)より、約 30 種存在する二成分制御系のうち、細胞内の酸化還元状態を感知するとされる ArcA/ArcB 系は、DNA 修復、複製に関与する遺伝子 *uvrA* (ヌクレオチド除去修復 UvrABC のサブユニット)を制御していることが示唆された。本研究において、S1 nuclease assay を行った結果、*uvrA* の転写は、*arcA* 欠損株においては上昇し、ArcA を高発現させると減少することが明らかになった。また、*uvrA* と分岐して発現している DNA 複製に必須な一本鎖 DNA 結合タンパク質をコードする *ssb* の転写も ArcA を高発現させると減少することが判明した。*cydA* (シトクロム d オキシダーゼのサブユニット)の遺伝子発現は、嫌気培養条件下で ArcA/ArcB 系によって正に制御されることが知られている。還元剤である DTT (dithiothreitol) 存在下で(嫌気培養条件下に相当する)、*cydA* の遺伝子発現は誘導されるが、*uvrA* の転写は抑制された。これらの結果は、*uvrA* の転写が嫌気条件下で ArcA/ArcB によって負に制御されていることを示唆した(図 2a)。さらに精製された ArcA を用いて Gelshift assay を行ったところ、ArcA が、リン酸化依存的に *uvrA:ssb* のプロモーター領域に結合することが明らかとなり、DNase-I footprinting を行った結果、*uvrA* の転写開始点から +16~+19、*ssb* の転写開始点 P1 から上流の -80~-95、-41~-54、-1~-10 に ArcA が結合する領域 (ArcA box: T/AGTTAAT TAT/A) が明らかとなった。*In vitro* における転写実験を行った結果、*uvrA*、*ssb* の転写が ArcA によって抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、ArcA/ArcB 系が細胞内の酸化還元状態を感知することで、*uvrA*、*ssb* の発現を制御していることが明らかとなった。

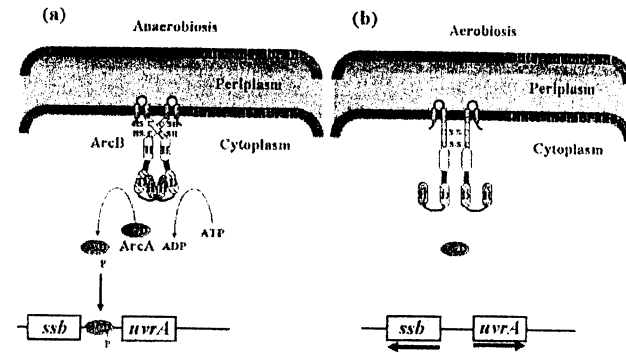


図 2. ArcA/ArcB による *uvrA*、*ssb* 遺伝子制御のモデル図

論文審査結果の要旨

ウラシル DNA グリコシラーゼ(*ung*)は、DNA のシトシンの脱アミノ化によってウラシルに変換された結果生じる G : U ミスマッチを取り除く塩基除去修復因子として機能しており、大腸菌からヒトに至る多くの生物に保存されている。シトシンが脱アミノ化を受けウラシルになることは細胞内 DNA で頻繁に見られ、ウラシルが生じると対側にアデニンを挿入し、グアニンからアデニンへの塩基置換が生じる。ウラシル DNA グリコシラーゼをコードする *ung* の欠損株では、G:C→A:T トランジションが誘発されることが知られている。このように *ung* の転写制御機構の解明は生物の突然変異生成と深く関与するものである。

一方、大腸菌において、*ung* の遺伝子発現は定常期で著しく低下する一方、二成分制御系 CpxR/CpxA の発現が上昇することが知られていたが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究において、大腸菌 CpxR/CpxA 系による *ung* の詳細な転写機構が解明された(主論文 1)。

さらに大腸菌二成分制御系欠損株を用いた DNA マイクロアレイのデータを解析した結果、細胞内の酸化還元状態を感知する二成分制御系 ArcA/ArcB によって、DNA 修復に関わる遺伝子、*uvrA* の発現が制御されていることが見出された。詳細な転写解析より、*uvrA* は、ArcA/ArcB により負に制御されることを明らかにした(主論文 2)。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成 17 年 2 月 22 日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	伊原 誠 <small>い ほん まこと</small>
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農 第 8 4 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Electrophysiological actions of neurotoxic insecticides on native and recombinant ligand gated ion channels (生得および組換えリガンド依存性イオンチャンネルに対する神経作用性殺虫剤の電気生理学的活性)
論文審査委員 (主査)	教授 駒 井 功 一 郎
(副主査)	教授 村 上 哲 男
(副主査)	教授 河 村 幸 雄