

博士論文審査報告書

論 文 題 目

配列特異的エンドリボヌクレアーゼの解析手法の確立及び独立栄養細菌が有するRNA切断酵素への適用

A method toward the cleavage-sites identification of sequence-specific endoribonucleases and its application to those in a chemolithotrophic bacterium

申 請 者

宮本	龍樹
Tatsuki	MIYAMOTO

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2018年2月

1. 論文内容の要旨

Toxin-Antitoxin (TA) 機構は原核生物におけるストレス応答機構であり、毒性タンパク質である Toxin と抗毒性分子である Antitoxin から構成される。通常、Toxin タンパク質の毒性は Antitoxin 分子により抑制されているが、細胞が環境ストレスに曝されると、Antitoxin が優先的に分解され、細胞内で Toxin が遊離し、細胞の増殖を抑制する。Toxin の増殖抑制機構はいくつかのパターンが知られているが、その中で最も報告例が多いものは、Toxin がエンドリボヌクレアーゼとして細胞内 RNA を切断し、タンパク質の合成を阻害するという機構である。

MazF は大腸菌において初めて同定された RNA 切断型 Toxin タンパク質であり、Antitoxin タンパク質 MazE とともに MazEF 機構を構成する。本酵素のホモログは古細菌や真正細菌に広く存在し、MazF の切断配列長や切断配列は微生物種ごとに異なることが知られている。したがって、MazF による細胞内 RNA の選択的分解を介した翻訳制御機構は微生物種に特有であり、種々の微生物に保存された MazF の切断配列を同定することは微生物細胞における翻訳制御機構を理解する上で非常に重要である。以上のような背景を踏まえ、申請者は MazF エンドリボヌクレアーゼの機能解析において重要な RNA 切断配列を高感度・高精度・高効率に同定する手法の構築に取り組んだ。また、この手法を独立栄養細菌が有する MazF に適用し、その切断配列の同定を行うことで、MazF が微生物の生理生態に及ぼす影響を考察した。

本論文は全 4 章より構成されている。第 1 章では、TA 機構の分類、生物学的意義、および現在までに獲得された MazF の配列特異性やその系統学的広がりについてまとめている。第 2 章では、超並列シーケンシング法と RNA 切断活性検出法を組み合わせることで、MazF の基質特異性を「高精度・高感度・高効率」に同定する手法の構築についてまとめている。超並列シーケンシング法では数千万という分子を一度に解析できるため、本手法を用いることでハイスループットに切断候補配列の探索が可能となる。また蛍光消光現象を用いた RNA 切断活性検出法では反応時間が数十分という短時間で実施できることに加え、経時的な RNA 切断活性の追跡が可能となる。本章ではこれら二つの手法の組み合わせが MazF の切断配列の同定に有効であることを示している。第 3 章では、第 2 章で開発した手法を、化学独立栄養細菌である *Nitrosomonas europaea* に保存された MazF の解析に適用した結果についてまとめている。NE0921 および NE1181 にコードされた遺伝子がそれぞれ UGG および AAU を切断する機能的な MazF であること、これらの MazF が隣接する MazE と TA 対を形成することを見出している。また *N. europaea* のゲノム情報、およびそれぞれの MazF の切断配列を参考に、全遺伝子配列中の切断配列の多寡を調べ、それぞれの MazF の生物学的意義に関して考察を行っている。以上の結果を踏まえ、第 4 章では本研究全体の総括、および今後の MazF 研究について理学的・工学的両側面から展望を述べている。

2. 論文審査結果

2018年1月12日に行われた公聴会では、論文内容および関連する事項について質疑応答が行われた。その概要を以下に示す。

(1) 超並列シーケンシング法において RNase やカチオンにより、基質 RNA が分解しないのかという質問があった。これに対して、これらの要因で切断される RNA 分子は存在するが、極微量である旨が述べられた。

(2) RNase III を使用した際、断片化された RNA の 5'末端の状態がどの様であるかという質問があった。これに対して、断片化 RNA の 5'末端はリン酸基が一つ存在する状態であるという回答がなされた。5'末端の情報に関しては、博士論文本文中に明記することとなった。

(3) RNase III と基質 RNA をインキュベーションした際、どの程度 RNA の分解反応を進行させたかという質問があった。これに対して、元の基質 RNA はほぼ分解されるが、次世代シーケンサー (MiSeq) でシーケンシングが可能な鎖長程度であったという回答がなされた。断片化 RNA の鎖長、その存在量に関しては重要であるため、博士論文の付録に追加することとなった。

(4) 実験に使用した RNase inhibitor が阻害する RNase に関して質問があった。本研究で用いた RNase inhibitor は RNase A に対応するものであり、本情報を博士論文に追記する。

(5) 次世代シーケンサーで得られたデータの解析において、冗長さの値 1,000 を一つの指標とした理由について質問があった。これに対して、複数の解析値を試したが結果は大きく変わらず、その中から適切と思われる数値を選定したという回答がなされた。本数値の設定にはリード総数が重要となるため、博士論文にもリード総数に関する情報を追記することとなった。

(6) MazF の RNA 切断はどのようなときに解除されるのかという質問があった。これに対して、微生物細胞が非ストレス環境下に戻ることににより解除されると考えられる旨が述べられた。

(7) MazF の作用によって微生物が休眠しているのであれば、休眠すると有利になるような特定の遺伝子配列には標的配列が少ないのではないかと、MazE 分解に関わるプロテアーゼ遺伝子中に切断配列は多いのかという質問を受けた。これに対して、最低限生存に必要なタンパク質を翻訳するため、リボソームタンパク質が必要であると考えられること、実際にリボソームタンパク質をコードする遺伝子の一部は切断配列が少ない旨が述べられた。さらに、本研究で用いたバイオインフォマティクス解析からは、プロテアーゼ遺伝子の配列中に切断配列数が特に多い、あるいは特に少ないといった傾向は見られなかったという回答がなされた。

(8) 細胞内 RNA 量を減らす要因には何が考えられるのかという質問があった。これに対して、MazF を含めた RNA 切断酵素による RNA の分解と RNA ポリ

メラゼによる転写量の調節が重要であるという回答がなされた。

(9) 現状，MazF 研究に関してどのような研究テーマが隆盛であり，今後どのように研究が発展していくと考えられるかという質問を受けた。これに対して，現状の MazF 研究は病原性微生物の Toxin タンパク分子の機能解明が主である旨が述べられた。また今後の研究の展開としては，(i) MazF が実際に下流のシグナル経路にどのように影響を及ぼしうるのかを調査する研究，(ii) 実際の環境中で宿主に感染した際，Toxin タンパク分子が微生物のストレス耐性や生存率にどのように影響を及ぼしうるのかを調査する研究が発展していくであろうという回答がなされた。

(10) MazF の切断配列を情報生物学的，構造生物学的方面から予測できないのかという質問があった。これに対して，MazF 自身に多様性があること，また現状で MazF と核酸の複合体の結晶構造解析の例が少ないことから，現状ではその予測は難しいと考えられる旨が述べられた。

以上の質疑応答を通じ，申請者が本研究の意義と実験結果について十分な学識を有し，必要と考えられる考察を行っていることが確認された。また公聴会後に提出された改訂版論文は，公聴会における審査員からの指摘を踏まえて内容面・形式面ともに十分な修正がなされていることを確認した。申請者は，RNA 分解酵素である MazF の切断配列同定手法の開発を行った。また本手法を，環境微生物 *N. europaea* が有する MazF に適用し，その切断配列と微生物の生理・生化学的知見が関連しうることを明らかとした。これらの成果は，微生物細胞における翻訳制御機構，ストレス応答機構の理解を深める上で重要である。このように本論文は微生物学の研究領域を発展させる優れたものであり，博士（工学）の学位論文としてふさわしいと考えられる。

2018 年 2 月

審査員

主査 常田 聡 早稲田大学教授 博士(工学) 東京大学 _____

副査 竹山 春子 早稲田大学教授 博士(工学) 東京農工大学 _____

副査 木賀 大介 早稲田大学教授 博士(理学) 東京大学 _____

副査 野田 尚宏 早稲田大学客員准教授 博士(工学) 早稲田大学 _____