

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 大腸菌RNase GのmRNA認識機構の解析                                                                                                                                                                        |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                                               |
| 著者(和文)            | 伊藤和敬                                                                                                                                                                                          |
| Author(English)   | Kazutaka Itou                                                                                                                                                                                 |
| 出典(和文)            | 学位:博士(工学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第9480号,<br>授与年月日:2014年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:和地 正明,中村 聡,丹治 保典,福居 俊昭,平沢 敬                                                                          |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Engineering),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第9480号,<br>Conferred date:2014/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                                          |
| Category(English) | Doctoral Thesis                                                                                                                                                                               |
| 種別(和文)            | 審査の要旨                                                                                                                                                                                         |
| Type(English)     | Exam Summary                                                                                                                                                                                  |

(博士課程)

## 論文審査の要旨及び審査員

| 報告番号        | 甲第  |       | 号 | 学位申請者氏名 |  | 伊藤 和敬 |      |     |
|-------------|-----|-------|---|---------|--|-------|------|-----|
| 論文審査<br>審査員 |     | 氏 名   |   | 職 名     |  |       | 氏 名  | 職 名 |
|             | 主査  | 和地 正明 |   | 教授      |  | 審査員   | 平沢 敬 | 准教授 |
|             | 審査員 | 中村 聡  |   | 教授      |  |       |      |     |
|             |     | 丹治 保典 |   | 教授      |  |       |      |     |
|             |     | 福居 俊昭 |   | 准教授     |  |       |      |     |

### 論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は、「大腸菌 RNase G の mRNA 認識機構の解析」と題し、6 章よりなっている。

第 1 章「序論」では、細菌の RNase 研究の歴史と現状、RNA レベルの遺伝子発現機構について概説している。また、本論文の研究対象である大腸菌 RNase G 発現の経緯とこれまでの研究について概説し、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章「RNase G による切断点の同定および切断点認識の解析」では、RNase G の特異的な基質である *adhE* mRNA の 5'末端非翻訳領域 (5'-UTR) と *lacZ* 遺伝子のコード領域を融合した融合遺伝子を構築し、融合遺伝子由来の mRNA が *adhE* mRNA と同様な RNase G による制御を受けることを明らかにしている。さらに *adhE* 5'-UTR における RNase G による切断点をプライマー伸長法により同定している。その結果、RNase G は-18 と-19（翻訳開始点の A を+1 とする）の間のリン酸ジエステル結合を切断することを明らかにしている。また、-32 と-33 の間を RNase III が切断することを見出している。さらに RNase G の切断点前後に変異を導入した変異型の *adhE* mRNA を構築し、切断点変異の有無にかかわらず、染色体由来 *adhE* mRNA と同様の位置を RNase G が切断することを明らかにしている。このことから RNase G は *adhE* mRNA を切断する際に、切断点周辺の塩基配列を認識していないことを明らかにしている。

第 3 章「RNase G の mRNA 認識部位の解析」では、*adhE* 5'-UTR にランダムな欠失を導入した欠失型 *adhE* 5'-UTR を構築して RNase G の認識配列の同定を試みている。構築した 6 種の欠失型 *adhE* 5'-UTR のうち、RNase G 依存的な制御を受けない 3 種では共通して-145 から-125 の配列を欠失していたことから、RNase G による認識には *adhE* 5'-UTR の-145 から-125 の配列が必要であることを予測している。

第 4 章「RNase G の認識における二次構造の重要性」では、二次構造予測プログラム mfold を用いて *adhE* 5'-UTR の二次構造を予想し、RNase G の切断点、RNase G の認識領域、RNase III の切断点の三要素が 2 次構造的には近接して存在することを予測している。これを基に *adhE* 5'-UTR 内の上記三要素が集中する周辺の二次構造が RNase G による *adhE* mRNA の認識に重要なのではないかと仮説を立て、不要と思われる配列を欠失させた 5'-UTR を構築している。構築した欠失型 5'-UTR には染色体由来の *adhE* mRNA と同様に-18 に RNase G の切断点が存在し、-32 に RNase III の切断点があることを確認している。つまり *adhE* mRNA の認識には、上記三要素を含む特定の二次構造さえあれば良いことを明らかにしている。

第 5 章「*adhE* 5'-UTR を用いた目的タンパク質の生産系構築」では、*adhE* mRNA の 5'-UTR とプロリン - 4 - ヒドロキシラーゼ (P4H) や緑色蛍光タンパク質 (GFP) の遺伝子との融合遺伝子を構築し、mRNA の安定化によるタンパク質の大量発現を試みている。その結果、*adhE* 5'-UTR による mRNA の安定化は、*adhE* mRNA のみならず、*p4h* mRNA や *gfp* mRNA に対しても同様有効であることを明らかにしている。このことから、*adhE* 5'-UTR と RNase G 欠損株を利用した mRNA の安定化によるタンパク質大量発現系を提案している。

第 6 章「総括」では、本研究の要点を総括し、本研究の意義と今後の展望を述べている。

これを要するに、本論文は大腸菌 RNase G による *adhE* mRNA の認識機構を明らかにし、そのタンパク質大量発現への応用の可能性を示したものであり、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は、博士（工学）の学位論文として十分に価値があるものと認められる。