

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), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9480号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 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), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9480号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻:	生物プロセス	専攻
Department of		
学生氏名:	伊藤 和敬	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野):	博士 (工学)
Academic Degree Requested	Doctor of
指導教員 (主):	和地 正明
Academic Advisor(main)	
指導教員 (副):	
Academic Advisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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。

大腸菌のエンド型リボヌクレアーゼの一種である RNase G は、16S rRNA の成熟に関与する他、アルコールデヒドロゲナーゼ (AdhE) やエノラーゼをはじめとする主要な糖代謝酵素の発現量を制御することが知られている。RNase G 変異株ではこれらの mRNA の半減期が増大し、タンパク質発現が増加する。中でも AdhE は RNase G 変異株において非常に高い発現を示す。*adhE* mRNA の 5'末端側非翻訳領域 (5'-UTR)を *lacZ* に融合した *adhE-lacZ* 融合遺伝子でも RNaseG 変異株において過剰発現が見られたことから、RNase G は *adhE* mRNA の 5'-UTR を認識し mRNA を切断することが予想された。そこで本研究では、遺伝子発現の RNA レベルでの制御を解明することを目指すとして、RNase G の選択的基質である *adhE* mRNA に着目し、RNase G の切断部位、基質 RNA のどのような構造を認識しているかを調べた。

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、*adhE* 5'-UTR の切断点をプライマー伸長法により同定した。その結果、翻訳開始点から-18 に RNase G の切断点が存在し、翻訳開始点から-32 に RNase III の切断点があることが確認できた。さらに切断点変異型の *adhE* 5'-UTR における切断点を同定した。その結果、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 が切断することが明らかとなった。このことから RNase G は *adhE* 5'UTR を切断する上で、切断点周辺の塩基配列を認識していないことが明らかとなった。

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、6 種の欠失型 *adhE* 5'-UTR を用いて解析を行った。得られた 6 種の欠失型 *adhE* 5'-UTR の内、RNase G 依存的な制御を受けないものを 3 種類発見した。この RNase G 依存的な制御を受けない 3 種の欠失型 *adhE* 5'-UTR では、共通して-145~-125 の配列を欠失していた。このことから RNase G は *adhE* 5'-UTR の-145~-125 の配列を認識していることが予測された。

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、Mini 5'-UTR ver. 1 と ver. 2 を構築した。Mini 5'-UTR ver. 2 についても、染色体由来の *adhE* mRNA と同様、翻訳開始点から-18 に RNase G の切断点が存在し、翻訳開始点から-32 に RNase III の切断点があることが確認できた。つまり *adhE* mRNA に係る転写後制御には、Mini 5'-UTR ver. 2 のようにごく一部の二次構造さえあれば良いことが明らかとなった。

第 5 章「*adhE* 5'-UTR を利用した目的タンパク質の生産系構築」では、*adhE* 5'-UTR と目的タンパク質の融合遺伝子を用いて、生産系の構築を行った。

第 6 章「総括」では、本研究の総括とともに、今後の展望を考察した。

以上、本研究により以下のような成果が得られた。

(1) *adhE* 5'-UTR は-18 に RNase G の切断点が、-32 に RNase III の切断点があることを明らかにした。

(2)RNase G と RNase III の切断点を含むステム・ループ構造が *adhE* mRNA の RNA レベルでの発現制御に必要であることが明らかとなった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	生物プロセス	専攻
Department of		
学生氏名：	伊藤 和敬	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	和地 正明	
Academic Advisor(main)		
指導教員 (副)：		
Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Regulation of mRNA stability permits, flexible changes to cell metabolism and rapid adaptation to new environments. In bacteria, RNA is degraded by several types of RNase that target different sites at different efficiencies. In *Escherichia coli*, the degradation of mRNAs begins with several internal cleavages by endoribonucleases such as RNase E, RNase G, RNase III, and RNase P. The resulting fragments are then subjected to digestion in a 3'-to-5' direction by exonucleases such as RNase II, PNPase, and RNase R.

E. coli RNase G, encoded by the *rng* gene, was originally identified as an endoribonuclease that generates the mature 5'-end of 16S rRNA. Recently, it was reported that ribosomes containing unprocessed 16S rRNA in *rng* mutant cells exhibited defects in proofreading in protein synthesis, indicating that RNase G is important for accurate protein synthesis. RNase G is involved in the degradation of several mRNAs, including *adhE* and *eno*, which encode alcohol dehydrogenase and enolase respectively. Previous research indicates that the 5' untranslated region (5'-UTR) of *adhE* mRNA confers RNase G-dependent regulation on *lacZ* mRNA when tagged at the 5'-end, but it has not been elucidated yet how RNase G recognizes *adhE* mRNA.

Primer extension analysis revealed that RNase III and RNase G cleave phosphodiester bonds between -33A and -32C, and between -19A and -18C, respectively (the A of the start codon was designated as +1). SDS-PAGE showed a correlation between the level of accumulation of the -32-end product and the expression level of the AdhE protein, suggesting that the -32 product is mostly translated. Site-directed mutagenesis indicated that RNase G did not recognize the nucleotides at -19 and -18. Random deletion analysis indicated that the sequence from -145 to -125 was required for RNase G-dependent degradation. Secondary structure prediction and further site-directed deletion suggested that the stem-loop structure, with a bubble in the stem, is required for RNaseG-dependent degradation of *adhE* mRNA.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).