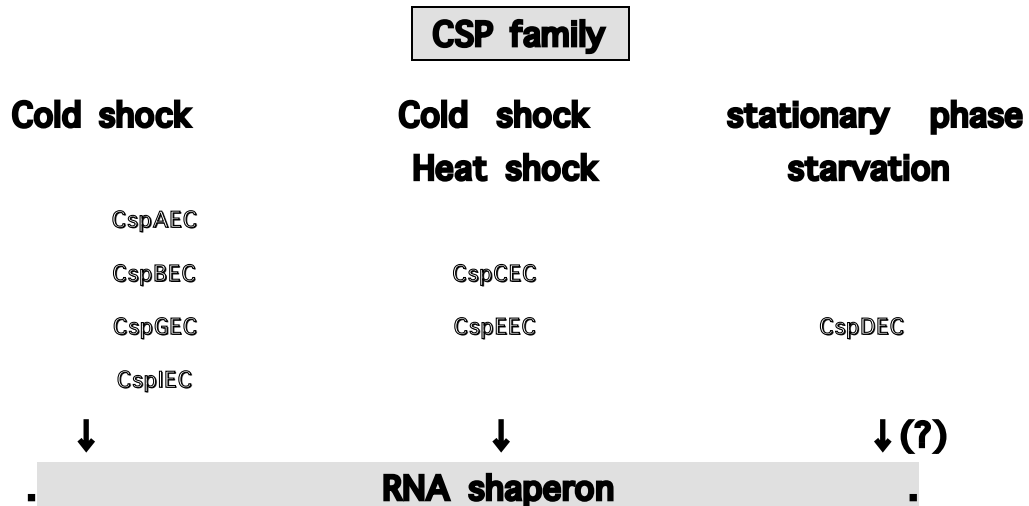


***Thermus thermophilus* HB8 CSP の構造機能解析  
代謝制御メカニズムの解明～ストレス応答からのアプローチ～**

宮崎 敏子、中川 紀子、増井 良治、倉光 成紀  
大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻 倉光研究室  
zakky@bio.sci.osaka-u.ac.jp

細胞はその生育環境や細胞周期に応じてタンパク質発現をコントロールし、生命活動を営んでいる。本研究ではストレス応答、特に cold shock への適応機構を例に、細胞内でおこる RNA レベルでの代謝制御機構を理解する事を目的とした。

ストレス → 転写・翻訳 制御 → 応答



Cold shock protein

低温環境下において発現が誘導されるタンパク質として *E.coli* の Cold shock protein ; CspA(70a.a)が最初に同定され、現在では他の原核生物を始め、多くの真核生物においても、CSP-like protein が同定されている。*E.coli* においては、CspA～CspI の 9 つのホモログが報告されており、これらのすべてが非常に良く保存された単鎖 RNA 結合モチーフ (RNP1,RNP2) をもつ。CspA,B,G,I は低温時のみ、CspC,E は低温時高温時の両方で発現に誘導がかかる。また、CspD は定常期、もしくは栄養枯渇時に発現が誘導される。このよ

うに発現の時期は各ホモログで異なるが、CSP はそれぞれの環境下で RNA シャペロンとなるという考え方が現在主流となっている。CSP は mRNA の二次構造を不安定化する事により転写の antiterminator として機能する一方で、ある特定の promoter に結合して転写の activator として機能すると考えられている。RNA レベルでの代謝制御のメカニズムを知る上で、CSP の機能解析は非常に有効な手段であると思われる。

先述の様に *E.coli* には CSP ホモログが 9 つ存在する。これに対し、我々が対象とする *Thermus thermophilus* HB8 は、TTHA0175, TTHA0359 の 2 つの CSP しか持たない。多岐にわたるであろう CSP の機能の本質をとらえる上で、ホモログが少ない事は非常に有利である。

#### TTHA0175 の X 線結晶構造解析

*Thermus thermophilus* HB8 の 2 つの CSP のうち、まず TTHA0175 の X 線結晶構造解析を行うことにした。

TTHA0175 を大腸菌で大量発現させ、精製し、結晶化スクリーニングを行った所、結晶が得られた。SPRing-8 にて X 線回折実験を行った結果、分解能 1.75 Å の回折データが得られた。格子定数は  $a=36.654 \text{ \AA}$ 、 $b=38.355 \text{ \AA}$ 、 $c=47.395 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=104.234^\circ$ 、 $\beta=90.748^\circ$ 、 $\gamma=104.377^\circ$ 、空間群は P1 で、非対称単位中に 4 分子存在している。現在、*E.coli* の CspA をモデルに (Identities = 37/67 (55%), Positives = 48/67 (71%)) 分子置換法による解析を進行している。

#### 複合体検索

Csp はどの生物種においても 70a.a 前後からなる小さなタンパク質で *in vitro* では単鎖 DNA/RNA への結合が報告されているものの、*in vivo* の解析はほとんど進んでいない。Csp が本当に RNA シャペロンとして機能するのであれば、その複雑な制御機構の過程で他の因子と複合体を形成する事が考えられる。Csp が生体内において他の因子と複合体を形成するかどうかを解析するために、*Thermus thermophilus* HB8 の genome 上の Csp に epitope tag を導入し、細胞内で発現させ、Csp と共沈する因子の解析を試みている。