

論文内容の要旨

申請者氏名 川合 良和

SOS 制御系は、多くのバクテリアが共通に持つシステムであり、DNA が損傷を受け、DNA の伸長が阻害を受けると誘導され、DNA 修復能の増加、細胞分裂の抑制、突然変異の増加やプロファージの誘発など多様な現象を示す。これらの現象は大腸菌において特に詳しく研究が進められており、LexA (リプレッサー) により通常その発現が抑制されている SOS 遺伝子群の発現誘導を伴うことが知られている。枯草菌でも DNA 損傷時に SOS 応答が誘導され、大腸菌と同様な現象を示す。その誘導機構も大腸菌と共通であり、いくつかの SOS 遺伝子は両者で共通に見い出されている。しかしながら、大腸菌 SOS 遺伝子で、損傷乗り越え修復や DNA 合成の抑制に関与する *umuD*、SOS 応答の抑制因子であると考えられている *dinI*、細胞分裂の抑制に関わる *sulA* などは、その機能の重要性にも関わらず、相同遺伝子が見い出されない。このことは、大腸菌と枯草菌では、異なる遺伝子が同様な SOS 機能を持つことを示唆している。

本論文では、まず、DNA マクロアレイによる解析により、*lexA* 破壊株で発現量の増加が認められる遺伝子を検索した。その結果、153 遺伝子において *lexA* 破壊株で有意な発現上昇が見られた。そのうち 38 遺伝子 (これまでに同定された枯草菌 SOS 遺伝子を全て含む) についてはプロモーター領域に LexA の結合配列に類似した配列を含むことから、LexA による直接的な制御を受ける可能性が考えられた。

これらの遺伝子の中には機能を予測することが困難な遺伝子が約半数あり、細胞分裂阻害因子も含まれていると予想された。その候補として、*lexA* 破壊株で非常に高い発現上昇を示した *yneA* オペロン (*yneA*, *yneB*, *ynzC*) に注目し細胞分裂阻害への関与を検討した。まず、*yneA* オペロンと *lexA* との二重破壊株を作製し観察したところ、*lexA* 破壊株で見られた細胞の伸長は抑制され、野生株と同様な細胞長に戻った。次にこの細胞伸長の抑制が *yneA* オペロンを構成するどの遺伝子の欠失によるものかを確認するため、各遺伝子をそれぞれ二重破壊株に導入したところ、YneA を供給することで再び *lexA* 破壊株と同様な細胞の伸長が観察された。また、野生株で YneA を強制的に発現させることでも細胞の伸長は誘導された。これらのことから、YneA は SOS 反応誘導時に細胞分裂阻害因子として機能することが明らかになった。

続いて、YneA による細胞分裂阻害機構の解明を目指した。そこで、FtsZ 抗体を用いた免疫顕微鏡観察、および酵母 2 ハイブリッド法による解析を行った。*lexA* 破壊株や野生株での YneA 過剰発現では、分裂面での Z-ring 形成頻度の減少が観察された。しかしながら、両者の相互作用は検出されなかった。そこで、YneA が収縮環上での Z-ring の安定性に影響を与えている可能性を考え、他の細胞分裂蛋白質との酵母 2 ハイブリッド解析を試みたが相互作用は検出されなかった。また、YneA 抗体を用いたウエスタン解析から、YneA が膜蛋白質であることが示され、さらに、YneA-GFP 融合株を用いた細胞内局在の解析では、細胞の中央など分裂面に相当する位置において、主に強い YneA-GFP の蛍光が観察された。これらのことから、YneA は Z-ring が形成される前に分裂面を認識し、そこに局在することで、FtsZ の分裂面への局在を抑制している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 川合 良和

生物では細胞内外のストレスに対応するための、遺伝子セットとその制御システムを備えている。細菌における、ストレス対応のためのグローバルな制御系のひとつとして、SOS 制御系がある。その鍵となる制御蛋白質は LexA リプレッサーであり、紫外線照射等で DNA に損傷が起こると、RecA 蛋白質により不活化される。その結果、DNA 修復遺伝子群を含む一群の遺伝子の発現が誘導される。LexA と RecA は多くの細菌に保存され、SOS 制御系は細菌に普遍的と考えられるが、実際にどのような遺伝子セットが誘導されるかは、大腸菌以外の細菌での研究は進んでいない。本論文では枯草菌 SOS レギュロンに属する遺伝子のシステムティックな探索が行われ、さらに、その中から細胞分裂を阻害する機能を持つ蛋白質が同定された。

申請者は、枯草菌における SOS レギュロンの全体像の解明を目指し、まず、配列解析及びアレー解析を行った。具体的には、LexA 結合配列をゲノム上で検索し、その下流に存在する遺伝子の発現を野生株と *lexA* 破壊株で比較した。また、DNA マクロアレーを用いた、野生株と *lexA* 破壊株での遺伝子発現の比較を行った。その結果、枯草菌 SOS レギュロンに属する遺伝子と考えられる 46 遺伝子を同定した。その内、既知のものは 6 遺伝子である。興味深いことに、大腸菌と共通なものは、DNA 修復系遺伝子のみであり、細菌の遺伝子システムの多様性が明らかになった。

SOS システムの重要な機能として、大腸菌では SulA 蛋白質による細胞分裂の一時的阻害が知られている。しかしながら、枯草菌にはその相同遺伝子は存在しない。申請者はその問題に注目し、解析を進めた。枯草菌でも *lexA* 破壊株では細胞伸長が起こる。しかしながら、新たに SOS 遺伝子であると同定した *yneABC* オペロンを同時に決失させると、その細胞伸長が抑制された。さらに、YneA 蛋白質を野生株で人為的に発現させると細胞伸長が起こり、枯草菌 YneA は細胞分裂阻害因子であることが証明された。

さらに、YneA の作用機構を調べるために、その局在性、細胞分裂に関与する蛋白質との相互作用を検討した結果、YneA は特定の蛋白質と相互作用するのではなく、細胞膜全体に分布し、その結果、何らかの細胞膜の構造変化が起こり、細胞分裂開始の鍵となる FtsZ 蛋白質の分裂部位での重合が阻害されると考えられることを明らかにした。YneA の他生物での保存性等を考慮すると、YneA はファージ由来とも考えられ、ファージの細胞増殖抑制機構を、枯草菌は自己のストレス対応機構に取り込んだとも考えられる。

以上のように、本論文は枯草菌において SOS レギュロンの解明に新たな展開をもたらし、特に新たな細菌細胞の分裂抑制の分子機構を明らかにしたことにより、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学

位論文として価値あるものと認めた。