論文内容の要旨

申請者氏名 森本 拓也

真核生物では Ras や Rho、Cdc42 などの多種多様な低分子量 GTP 結合蛋白質が、細胞内情報伝達の分子スイッチとして非常に重要な働きを担っている。細菌においても大腸菌 Era や枯草菌 Obg など生育に必須な低分子量 GTP 結合蛋白質がいくつか報告されている。しかしながら、Era/Obg ファミリーに属する蛋白質については、生育への必須性といくつかの遺伝学的、生化学的知見が明らかになっているにとどまり、未だこれらの蛋白質の特異的な細胞内機能は明らかになっていない。

本論文では、まず、大腸菌 Era、枯草菌 Obg のアミノ酸配列をもとに枯草菌全蛋白質に対して相同性解析を行ない、枯草菌には 9 つの Era/Obg ファミリーに属する蛋白質をコードする遺伝子が存在することを明らかにした。この 9 つの Era/Obg ファミリーをコードする遺伝子のうち、*obg*、*ysxC* が生育に必須であることは既に報告されていた。そこで、残り 7 つの遺伝子の破壊を試み、*obg*、*ysxC* に加え、新たに 4 つの遺伝子 (*bex*, *yphC*, *ylqF*, *yqeH*) が破壊不可能である必須遺伝子であることを明らかにした。これら生育に必須な 6 つの蛋白質をコードする遺伝子について、IPTG による発現の制御が可能な変異株を作製し、発現抑制下での染色体複製開始に与える影響をフローサイトメーターによって解析した。その結果、Bex, YqeH 蛋白質の減少に伴い、染色体複製開始時期が早くなっていた。このことから Bex, YqeH は染色体複製開始を抑制し、開始時期を制御する分子スイッチとして働いている可能性が示された。

大腸菌では、Era 蛋白質の GTPase 活性が低下し、GTP 型が安定化する変異株 *eral* が報告されている。そこで枯草菌 Bex に同様の変異 (P17R) を導入した変異蛋白質 (Bex1) を精製し、GTPase 活性の測定を行ったところ、大腸菌と同様に、GTPase 活性が野生型 Bex と比べ顕著に低下しており、GTP 型変異蛋白質であることが分かった。ついで野生型 Bex と Bex1 を用いて RelA との相互作用を、Yeast two-hybrid 実験における β -ガラクトシダーゼ活性を指標として解析した。その結果、 β -ガラクトシダーゼ活性は Bex1 では野生型 Bex 蛋白質と比べて2倍に上昇した。このことから RelA は野生型 Bex 蛋白質と比べ、Bex-GTP 型変異蛋白質との相互作用が強いことが示された。そこで RelA は Bex-GTP 型蛋白質と結合することで GAP (GTPase activating protein)として働いている可能性を考え、RelA 蛋白質の添加による Bex の GTPase 活性への影響を調べた。その結果、RelA 添加時には、同じ濃度の BSA を加えた時と比べ、Bex、Bex1 蛋白質の GTPase 活性は共に上昇した。このことから RelA は Bex の GAP として働きうることが分かった。

一方、枯草菌 *bex1* 変異株 (GTP 型 Bex) の表現型の解析を行ったところ、生育には大きな影響が見られないにもかかわらず、染色体複製開始時期が早まる現象が、Bex 蛋白質の減少時と同様に観察された。このことから、染色体複製開始の抑制には GDP 型 Bex 蛋白質が働いている可能性が考えられた。また、この変異株では細胞増殖の移行期に発現する DNA 取込み能、孢子形成能、走化性に影響が見られた。

以上のような実験結果から、GTP 型 (RelA 活性の制御) と GDP 型 (染色体複製開始を負に制御) の構造変化を介した Bex の枯草菌細胞周期を制御する分子スイッチとしての機能について議論を行った。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森本 拓也

申請者は、大腸菌 *Era*、枯草菌 *Obg* に代表され、真核生物の低分子量 GTP 結合蛋白質との配列相同性から、細菌細胞内でのシグナル伝達に関わっていると考えられている *Era/Obg* ファミリーのシステマティックな機能解明を、枯草菌において進めた。*Era/Obg* ファミリーは細菌に普遍的に保存されており、研究されたもののほぼ全てが細菌の増殖に必須であり、細胞周期の進行あるいは細胞分化の制御に関与することが示唆されている。しかしながら、どのような蛋白質と相互作用し、どのように細胞増殖を制御しているか、その分子機構は明らかにされていない。本論文では、枯草菌には 9 種の *Era/Obg* ファミリーが存在し、その内 6 種もが増殖に必須であること、さらに *Bex*, *YqeH* の 2 種は染色体複製を負に制御すること、また、*Bex* は *RelA* と相互作用し、緊縮制御の活性化に関わることが明らかにされた。

申請者は、まず、相同性検索により、枯草菌ゲノム上には 9 種類の *Era/Obg* ファミリーをコードする遺伝子が存在することを明らかにした。興味深いことに、それらは全て真核生物・古細菌を含め、他生物にも保存されていた。9 遺伝子のうち、2 遺伝子(*obg*, *ysxC*)については、枯草菌の増殖に必須であることが報告されている。そこで、残る 7 遺伝子について、破壊株あるいは発現制御株を作製することにより、*bex*, *yphC*, *ylqF*, *yqeH* の 4 遺伝子も必須遺伝子であることを明らかにした。

次に、*obg*, *ysxC* を含む必須 6 遺伝子の発現制御株を用いて、各蛋白質の枯渇に伴う細胞と核様体の形態、染色体複製開始頻度の変化を観察し、その表現型が *bex*, *yqeH* と残る 4 蛋白質に 2 分されることを見出した。特に、前 2 者の枯渇は過剰な染色体複製を誘発することを明らかにした。

申請者はさらに、*Bex* 蛋白質に焦点を絞り、それが GTPase 活性を持つことを *in vitro* で証明した。さらに、その GTP 結合配列に変異を導入し、GTPase 活性が顕著に低下した蛋白質を作製した。並行して、酵母 2-hybrid system を用いた *Bex* と相互作用する蛋白質の検索から、緊縮制御の制御蛋白質である *RelA* との相互作用を見出した。そして、*in vitro* で *RelA* が *Bex* の GTPase 活性を上昇させることを明らかにした。さらに、同じ *bex* 変異を枯草菌ゲノム上の遺伝子に導入したところ、形質転換能・運動性の喪失、孢子形成能の低下という表現型を示した。この表現型は *RelA* 変異株の表現型と類似しており、*in vivo* でも *Bex* と *RelA* が相互作用し、緊縮制御の活性化に関与していることを強く示唆している。また、*RelA* の関与については今後の検討課題ではあるが、枯草菌 *bex* 変異株においても、過剰な複製開始も観察された。

以上のように、本論文は枯草菌において複数の *Era/Obg* ファミリー蛋白質が細胞の増殖に必須であることを始めて明らかにし、さらに、そのうち *Bex* 蛋白質は *RelA* と相互作用し緊縮制御の活性化に関与することを見出し、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。