

論文内容の要旨

申請者氏名 福地 圭介

ゲノム配列決定によって見いだされた枯草菌新規遺伝子の破壊変異株バンク作成中に、新規2成分制御系 YycFG が細胞の増殖に必須であることを見いだした。YycFG は、*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* などの病原性を示すグラム陽性菌にも保存され、同様に細胞の増殖に必須であることが示されており、グラム陽性菌に広く保存されている重要な制御系である。本研究においては、YycFG 遺伝子が制御する遺伝子群を明らかにすることにより、その細胞増殖の調節機能を解析することを目的とした。

2成分制御系遺伝子は、枯草菌の複製開始点から60Kb離れた位置にあり、レギュレーター遺伝子 *yycF*、センサー遺伝子 *yycG* に加えて4個の遺伝子がオペロンを形成していると推定された。この *yycFG* 遺伝子の発現時期とオペロン構造の解析のため、ノーザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、確かに *yycFG* と下流の4遺伝子は1つのオペロンを形成し、対数増殖期に発現することがわかった。各遺伝子の破壊変異株の作成を試みたところ、オペロン下流に位置する4遺伝子については容易に破壊変異株が得られたが、*yycFG* 両遺伝子については破壊変異株を得ることができなかった。そのため両遺伝子の発現が LacI 蛋白質により制御可能な Pspac プロモーターの支配下においた条件破壊変異株を作成した。

yycF 条件破壊変異株、*yycG* 条件破壊変異株は、Pspac プロモーターからの転写が誘導される IPTG 存在下の条件でのみ野生株と同様の生育を示し、IPTG 無添加の条件では、センサー遺伝子 *yycG* 条件破壊変異株では生菌数の低下が見られた。*yycG* の上流に位置するレギュレーター遺伝子 *yycF* の条件破壊変異株では、IPTG 無添加の条件では培養開始2時間で菌体濁度の増加が停止し、その後生菌数が急激に減少するといったより顕著な生育阻害が観察された。さらに、細胞を DAPI 染色した後、蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、IPTG 無添加の条件では、両条件破壊変異株で染色体および細胞質の失われた細胞が観察された。制御遺伝子 *yycF* 全長を組み込んだマルチコピープラスミドを導入した YycF 蛋白質過剰発現株について顕微鏡観察を行ったところ、細胞の極での分裂により生じた mini cell が野生株に比べ40倍の頻度で観察された。さらに、YycF 蛋白質過剰発現株では平均細胞長が短くなっており、過剰な細胞分裂が起きていることが示唆された。

この為、その発現量により細胞分裂の頻度が規定され、細胞増殖に必須な細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の転写に対する YycF 蛋白質過剰発現の影響を調べた。*ftsAZ* 上流には、対数増殖期の主要なシグマ因子である σ^A 依存性の P1 および P3 プロモーターと孢子形成の初期過程の転写制御を担う σ^H 依存性の P2 プロモーター、計3つのプロモーターが同定されている。これらのプロモーターからの転

写量を測定するために、それぞれのプロモーター配列を LacZ レポーター遺伝子に結合し、枯草菌 *amyE* 遺伝子部位に挿入した株を作製し、YycF 蛋白質を過剰発現させた条件での LacZ 活性を測定した。その結果、P2 および P3 プロモーター活性は、YycF 蛋白質の過剰発現によって変化は見られなかったのに対し、P1プロモーター活性は野生株の4倍以上に増加が見られた。このことから、YycF 蛋白質が P1 プロモーターの制御を介し、細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の発現を促していることが示された。この制御が YycF 蛋白質による直接の制御であるかを調べるために、YycF 蛋白質を精製し、*ftsAZ* のプロモーター領域に対する結合能をゲルシフト法および DNaseI フットプリント法により解析したところ、YycF 蛋白質は P1プロモーター上流領域に特異的に結合することがわかった。この *ftsAZ* P1 プロモーターの機能を調べるために、その欠失変異株を作成したところ、正常な細胞分裂周期が失われ、細胞の伸長が観察されたが、細胞増殖速度は野生株と同じであった。このため、YycFG が細胞の増殖に必須である他の遺伝子の発現制御にも関与する可能性が示唆された。

そこで、マクロアレイを用いた転写産物の解析を行い、YycFG の制御下にある遺伝子の検索を試みた。その結果、YycF 蛋白質の過剰発現により、D-リボースリン酸化酵素をコードする *rbsK*、Surfactin 生産酵素群をコードする *srf* オペロン、ABC 型膜輸送蛋白質をコードする *ftsE* および *lplC* 遺伝子など、8 遺伝子のシグナル強度の増加が検出された。そして、*rbsK* 及び *ftsE* 遺伝子については、そのプロモーター領域に YycF 蛋白質が結合することを、ゲルシフト法および DNaseI フットプリント法により確認した。その結果、YycF 蛋白質の認識配列と考えられる 6 塩基からなる繰り返し配列を見いだすことができた。

srf オペロン内にコードされる ComS 蛋白質は、MecA-ClpC 複合体の分解を介して、 σD の発現を抑制する。実際、YycF 蛋白質過剰発現株では、 σD の発現量が大きく減少し、細胞の運動性が著しく低下していた。

このように、2成分制御系 YycFG は細胞膜・表層機能に関係する、複数の遺伝子の発現制御に関与している可能性が示されたが、それらは全て破壊可能な遺伝子であり、なぜ、YycFG は細胞増殖に必須であるかという問題についての解答は得られていない。マクロアレイの解析では、約 2,000 の遺伝子について信頼性のあるシグナルは検出されず、この中に YycFG によって制御される必須遺伝子が存在する可能性も考えられる。また、配列特異性の低い DNA 結合蛋白質である AbrB やヒストン様蛋白質 Hbsu が、枯草菌の対数増殖期の転写制御において重要な役割を果たしている。YycFG も AbrB や Hbsu と同様に、増殖に必須な特定の遺伝子の発現を制御するのではなく、グローバルな転写制御因子として機能している可能性も考えられる。今後、本研究により同定された YycF 結合配列に基づき、ゲノム上のすべての YycF 結合配列を同定することにより、YycFG 制御系の細胞機能制御の全容が明らかにされると考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 福地 圭介

細胞内外の環境変化を感知するセンサーキナーゼと、それからのリン酸転移により活性化されるレスポンスレギュレーターのパairからなる 2 成分制御系は、環境変化に対応した遺伝子発現を制御するためのシグナル伝達システムとして、細菌において中心的な役割を果たしている。さらに、細菌 2 成分制御系の中には、細胞周期の進行を制御し、増殖に必須であるものも最近見出されており、関心を集めている。申請者は、枯草菌ゲノム配列決定により見出された 2 成分制御系キナーゼ YycG とレギュレーター YycF の pair が細胞増殖に必須であることを独自に見出し、その制御下にある遺伝子群の同定を試み、以下の新たな知見を得た。

- 1) *yycFG* 遺伝子の発現を人為的に制御可能なプロモーターの制御下においた条件破壊変異株、及び YycG センサーに依存しない活性型 *yycF* 変異株の解析により、YycG センサーは YycF の活性化を介して、細胞増殖に必須であることを遺伝学的に明らかにした。
- 2) YycF レギュレーターを細胞内で過剰発現すると、過剰な細胞分裂が誘導されるという観察から出発し、YycF は細胞分裂遺伝子 *ftsAZ* の P1 プロモーターの上流に結合し、その転写を正に制御する能力を有することを明らかにし、正常な細胞分裂周期の制御に関与している可能性を示した。
- 3) YycF レギュレーターの過剰発現により発現が誘導される遺伝子を、マクロアレーを用いて検索し、細胞膜蛋白質の輸送に関わると考えられる *ftsEX* オペロン、リボース取り込みと利用に関与する *rhs* オペロンの発現を、直接的に正に制御する能力を持つことを示した。また、*sf* オペロン内に存在する *comS* 遺伝子の発現を誘導することにより、細胞表層関係の遺伝子発現に関わる σ^D の発現を制御することを示唆する結果を得た。
- 4) 3 種の制御領域への YycF 蛋白質の結合を DnaseI フットプリント法で解析することにより、6 塩基からなる繰り返し配列が YycF 認識配列と考えられることを明らかにし、今後、YycFG の制御下にある全遺伝子の同定のための基礎を作った。

以上のように、本論文は低 GC グラム陽性細菌に保存されている必須 2 成分制御系遺伝子 *yycFG* の制御下にあると考えられる遺伝子を世界で初めて同定し、YycFG が細胞表層や細胞膜に関連する複数の遺伝子の発現制御に関与するグローバルなレギュレーターであるという、興味深い可能性を示す結果を得ており、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。