

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Andriansjah Rukmana

グラム陽性菌では、抗生物質による細胞壁や細胞膜の機能阻害に対して、共に膜に組み込まれたセンサーによって制御されている、2成分制御系と ECF シグマ因子系の2つのシグナル伝達システムが活性化される。グラム陽性菌のモデルである枯草菌についても、遺伝子アレイを用いた、抗生物質に対する転写応答の研究が活発に行われており、3種の ECF シグマ因子と5種の2成分制御系の様々な組み合わせが抗生物質により活性化されることが明らかになっているが、その抗生物質耐性における役割は不明な点が多い。また、LiaRS と名づけられたセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターが、多くの抗生物質で活性化され、その制御下にある LiaH タンパク質が大腸菌の細胞膜ストレスに対する防御タンパク質 PspA と高い配列相同性を有することから、注目されているが、その機能も不明である。

申請者は、ペプチドグリカンの合成を阻害するエンデュラシジンに着目し、それに対する枯草菌細胞の転写応答を、タイリングチップを用いて解析した。同時に、研究が進んでいる、ペプチドグリカン合成の前駆体の合成を阻害するバシトラシンについても比較解析を行った。従来の遺伝子アレイは、薬剤による遺伝子発現量の変化を、薬剤非存在下での発現量に対する比で測定する。それに対して、タイリングチップは各遺伝子の発現量を定量できる。その特性を生かし、薬剤により発現量が5倍以上上昇する遺伝子に加えて、発現の増加量が閾値以上である遺伝子を抽出することにより、発現の誘導倍率が低い遺伝子の中から生物学的に意味のある発現誘導を同定することを試みた。その結果、2つの薬剤のいずれか或いは両方で顕著に発現が誘導される 129 遺伝子を同定した。

抗生物質による発現誘導が報告されている5種の2成分制御系の発現誘導を我々も確認したが、その多くは一過的なものであり、薬剤添加後30分には低下した。しかし、LiaRS の制御下にある遺伝子群の発現誘導は30分後も持続していた。さらに、*lia* オペロンに属する遺伝子の破壊株について、その薬剤耐性を測定した結果、*liaRS* 2成分制御系遺伝子及びその制御下にある *liaIH* 遺伝子の破壊株では、エンデュラシジン耐性が顕著に低下することを見出した。このことは、エンデュラシジンは細胞膜の構造にも影響を与え、その修復のために LiaH に加えて LiaI タンパク質が必須であることを示唆している。また、ECF シグマ因子 SigM の制御化にある多くの遺伝子の発現が誘導されることも見出した。その誘導は、エンデュラシジン存在下で顕著であり、実際、*sigM* 破壊株でもエンデュラシジン耐性が低下していた。さらに、SigM の下流にあり、酸化ストレスにより誘導される *Spx* レギュロンの発現誘導も見出したが、*spx* 破壊株では薬剤感受性が変化せず、その生物学的意味の解明には今後の研究が必要である。

以上のように、タイリングチップを用い、発現の増加量の絶対値も考慮して、抗生物質により発現が誘導される遺伝子を同定するという申請者の新たな方法は、抗生物質に対する複雑な転写応答の解析に非常に有効であることが示された。また、抗生物質に対する枯草菌の防御機構について、今後の研究に有用な新たな知見を得ることができた。特に、*lia* オペロンの破壊に伴う表現型の発見は重要である。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Andriansjah Rukmana

土壌中の細菌は抗生物質を生産することにより、栄養源の獲得において競合する周囲の細菌の増殖を抑えようとする。同時に、細菌は抗生物質に対する抵抗システムも進化させている。細菌が生産する抗生物質は医療において重要な役割を果たしており、細菌の抗生物質に対する応答を分子レベルで解明することは、抗生物質の作用機構とそれに対する耐性菌の発生の機構を解明するために重要である。グラム陽性菌のモデル細菌である枯草菌についても、細胞壁の合成を阻害する抗生物質を中心に、様々な抗生物質に対する転写応答を、遺伝子アレイを用いてゲノムワイドに解析する研究が活発に行われている。

申請者は、新たな抗生物質開発への寄与が期待されているエンデュラシジンに着目し、それに対する枯草菌の転写応答をタイリングチップにより解析した。従来、ゲノムワイドな転写応答の解析に用いられてきた遺伝子アレイは、対象とする細胞での発現変化をコントロール細胞での発現量に対する比で測定するという限界を持っている。それに対して、タイリングチップは各遺伝子の発現量を定量することができる。申請者は、遺伝子の発現比に加えて、発現量の変化の絶対値が、ある閾値以上であるという指標を導入し、発現比が低い遺伝子群の中から、その発現変化が生物学的に有意であるものを同定することを試みた。その結果、期待通り、従来の遺伝子アレイによる解析結果に比して、抗生物質により誘導される、生物学的に重要と考えられる遺伝子セットを明確に同定できることを示した。

具体的には、2成分制御系遺伝子 *liaRS* とその制御下にある *liaFGHI* 遺伝子、ECF シグマ因子遺伝子 *sigM* とその制御下にある SigM レギュロン、酸化ストレスに応答する転写制御因子遺伝子 *spx* とその制御下にある Spx レギュロンが、エンデュラシジンによって発現が顕著に誘導される遺伝子セットの中核と考えられることを申請者は見出した。さらに、こうした遺伝子の発現誘導とエンデュラシジンに対する抵抗性を遺伝学的に評価した。その結果、*liaRS* 及び *liaIH* 破壊株では、エンデュラシジン抵抗性が顕著に低下することを見出し、LiaR レギュレーター DNA 結合部位の解析から、*liaIH* の発現は *liaRS* により一義的に制御されることを明らかにした。LiaH は多くの細菌に保存され、ストレスに対する細胞膜構造の保護に関与していると考えられているが、この結果は枯草菌での役割を明らかにする上で重要な発見である。また、*sigM* の破壊もエンデュラシジン抵抗性を低下させることを明らかにした。抗生物質による酸化ストレスの発生の可能性の発見も、興味深い知見である。

以上のように、本論文は抗生物質に対する細菌細胞の転写応答の研究に新たな方法を導入したものであり、また、枯草菌における抗生物質耐性の分子機構の研究の上で有益な知見を明らかにしたもので、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。