

氏名	関 貴洋
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 1052 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	枯草菌糖脂質欠損による ECF シグマ因子の活性化機構の解析
論文審査委員	委員長 准教授 原 弘志 委員 教授 高橋 康弘 委員 准教授 朝井 計 委員 教授 戸澤 讓

## 論文の内容の要旨

枯草菌の細胞膜には UgtP によって合成される 3 種類のグリセロ糖脂質が含まれている。これらの糖脂質の細胞内での機能を知るために *ugtP* 遺伝子を破壊した糖脂質欠損株において表現型解析が行われており、糖脂質欠損株は対数増殖期において太く歪曲した異常な細胞形態を示し、さらに細胞外のストレスに応答して機能する 7 つの extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子のうち  $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^X$  の 3 つが活性化している。このように糖脂質は細胞にとって重要な機能を持っていることが示唆されているが、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっておらず、糖脂質の生理機能についてははっきりとしていない。そこで、糖脂質欠損による ECF シグマ因子の活性化機構を明らかにし、糖脂質の生理的機能について理解することを本研究の目的とした。

枯草菌は 7 つの ECF シグマ因子 ( $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$ ,  $\sigma^Y$ ,  $\sigma^{YlaC}$ ,  $\sigma^Z$ ) を持っており、それぞれ特異的なストレスによって活性化する。各 ECF シグマ因子は非ストレス条件下においてそれぞれに特異的な膜貫通タンパク質であるアンチシグマ因子によって活性が抑制されており、細胞がストレスを感知するとアンチシグマ因子が分解あるいはコンホメーション変化することで活性化すると考えられている。また、各 ECF シグマ因子とそれに対応するアンチシグマ因子をコードする遺伝子はオペロンを形成しており、自身のレギュロンの中に自身のオペロンも含まれており正に自己制御している。

糖脂質欠損株では様々な表現型が確認されているので糖脂質欠損株における ECF シグマ因子の活性化が糖脂質の欠損自体によるのか糖脂質の欠損によって生じた二次的な要因によるものなのかを調べることにした。主要な糖脂質であるジグルコシルジアシルグリセロール (DGlcDG) は細胞表層の構成要素であるリポテイコ酸 (LTA) の膜アンカーであるので、糖脂質欠損によって膜アンカーが変化し LTA の構造が変化することが予想された。そこで、野生型株と糖脂質欠損株の LTA を、抗 LTA 抗体を用いたイムノブロッティング解析により検出を試みたところ、野生株に比べ糖脂質欠損株の LTA は SDS-PAGE における移動度が遅くなることがわかり、糖脂質の欠損により LTA への二次的な影響が生じていることが明らかになった。この LTA への二次的な影響が ECF シグマ因子の活性化の原因であるのかを調べるために、LTA と糖脂質の 2 重欠損株を構築し ECF シグマ因子の活性を解析したところ、LTA と糖脂質の二重欠損株では  $\sigma^M$  と  $\sigma^V$  の活性が LTA の単独欠損株に対して相加的に上昇していることが明らかとなり、LTA を欠損していても糖

脂質欠損の影響が見られた。この結果は、糖脂質欠損株における  $\sigma^M$  と  $\sigma^V$  の活性化は LTA への二次的な影響を介さないことを示している。一方、二重欠損株において  $\sigma^X$  の活性のさらなる上昇は見られず、LTA を欠損していると糖脂質欠損の影響が見られなかった。これは、 $\sigma^X$  の活性化の原因は糖脂質欠損による LTA への二次的な影響である可能性を示唆している。糖脂質欠損株の細胞形態の異常が  $Mg^{2+}$  により部分的にサプレスされることがわかっている。そこで、ECF シグマ因子の活性化も  $Mg^{2+}$  によってサプレスされるかを調べたところ、 $MgSO_4$  の添加によって糖脂質欠損株の  $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^X$  の活性が野生株レベルまで低下した。 $Mg^{2+}$  のような 2 価カチオンは両性リン脂質であるホスファチジルエタノールアミンを欠損し酸性リン脂質のみとなった大腸菌の生育に必須であり、負電荷密度が増加した膜を安定化させると考えられている。それゆえ、電荷を持たない糖脂質を欠損することによって膜上の負電荷の密度が相対的に増加し、電荷分布の様相が異常となり膜が不安定になったことが ECF シグマ因子の活性化した原因の 1 つである可能性が考えられる。

次に、糖脂質欠損による  $\sigma^V$  の活性化機構を調べることにした。 $\sigma^V$  はリゾチームに応答し、アンチシグマ因子 RsiV が分解されることで活性化すると考えられている。そこで、糖脂質欠損による  $\sigma^V$  の活性化がこの RsiV の分解によるのかを調べるため、RsiV の分解に関わるメタロプロテアーゼ RasP と糖脂質の二重欠損株を構築し  $\sigma^V$  活性を測定した。その結果、糖脂質の単独欠損株と糖脂質と RasP の二重欠損株では  $\sigma^V$  活性において差が見られなかった。さらに、FLAG-RsiV を用いたウェスタンブロッティング解析により、糖脂質欠損株における FLAG-RsiV のバンド強度と野生株のバンド強度に差が見られず、糖脂質欠損株において FLAG-RsiV は分解されていないことが示された。これらの結果から糖脂質欠損による  $\sigma^V$  の活性化は RsiV の分解とは異なるメカニズムであることが示された。つづいて、糖脂質欠損による  $\sigma^V$  の活性化に RsiV は関与していないかどうかを調べるために RsiV と糖脂質欠損の二重欠損株において  $\sigma^V$  活性を測定した。その結果、RsiV と糖脂質の二重欠損株の  $\sigma^V$  活性は RsiV の単独欠損株と同じ活性を示し、RsiV を欠損していると糖脂質欠損の影響が見られなくなることがわかった。この結果は糖脂質欠損の影響を RsiV が受けることで  $\sigma^V$  が活性化していることを示している。さらに、RsiV のどのドメインが糖脂質欠損の影響を受容しているのかを調べるために糖脂質欠損では活性化しなかった  $\sigma^W$  のアンチシグマ因子 RsiW と RsiV の細胞内領域、膜貫通領域、細胞外領域をシャッフルしたキメラアンチシグマ因子を構築し、 $\sigma^V$  活性の測定を行った。その結果、細胞外領域が RsiW、膜貫通領域と細胞内領域が RsiV のキメラアンチシグマ因子を発現させても糖脂質欠損による  $\sigma^V$  の活性化は観察されなかった。この結果は、RsiV の細胞外領域が糖脂質欠損の影響を受けることで  $\sigma^V$  が活性化することを示唆している。

以上の結果から、糖脂質欠損株において細胞膜の電荷分布の異常により膜が不安定になったことで RsiV の細胞外領域のコンホメーションが恒常的に変化し、それにより RsiV の細胞内領域のコンホメーションも変化することで、 $\sigma^V$  との親和性が低下し、 $\sigma^V$  が恒常的に活性化していると考えられる。これらのことから糖脂質は電荷密度を低下させることで RsiV などの膜タンパク質が機能できるような環境を形成する働きを担っていると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会が行なった、学位申請者による発表とそれに続く質疑にもとづく論文内容の審査の結果を、以下に要約する。

枯草菌の細胞膜には酵素 UgtP によって合成される 3 種類のグリセロ糖脂質が含まれている。これらの糖脂質の細胞内での機能を知るために *ugtP* 遺伝子を破壊した糖脂質欠損株の表現型解析が行なわれており、糖脂質欠損株は対数増殖期において太く歪曲した異常な細胞形態を示し、さらに細胞外のストレスに応答して機能する extracytoplasmic function (ECF)  $\sigma$  因子のうち  $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^X$  の 3 つが活性化している。このように糖脂質は細胞にとって重要な機能を持っていることが示唆されているが、その詳細な分子メカニズムは未だ明らかとなっておらず、糖脂質の生理機能についてははっきりとしていない。そこで、本論文では、糖脂質欠損による ECF シグマ因子の活性化機構を明らかにし、糖脂質の生理的機能について理解することを研究の目的とした。

枯草菌は 7 つの ECF  $\sigma$  因子 ( $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^W$ ,  $\sigma^X$ ,  $\sigma^Y$ ,  $\sigma^{YlaC}$ ,  $\sigma^Z$ ) を持っており、それぞれ特異的なストレスによって活性化する。各 ECF  $\sigma$  因子は非ストレス条件下においてそれぞれに特異的な膜貫通タンパク質であるアンチ  $\sigma$  因子によって活性が抑制されており、細胞がストレスを感知するとアンチ  $\sigma$  因子が分解あるいはコンホメーション変化することによって ECF  $\sigma$  因子が遊離して活性化すると考えられている。また、各 ECF  $\sigma$  因子とそれに対応するアンチ  $\sigma$  因子をコードする遺伝子はオペロンを形成しており、自身のレギュロンの中に自身のオペロンも含まれており正に自己制御しているので、各  $\sigma$  因子の遺伝子のプロモーター活性の解析によって、その  $\sigma$  因子の活性を測定することができる。

糖脂質欠損株ではさまざまな表現型が確認されているので、糖脂質欠損株における ECF  $\sigma$  因子の活性化が糖脂質の欠損によるのか別の要因によるものなのかを調べた。主要な糖脂質であるジグルコシルジアシルグリセロール (DGDG) は細胞表層の構成要素であるリポテイコ酸 (LTA) の膜アンカーであるので、糖脂質欠損によって膜アンカーが変化し LTA の構造が変化することが予想される。野生型株と糖脂質欠損株の LTA を抗 LTA 抗体を用いた免疫ブロッティング法で解析したところ、野生株に比べ糖脂質欠損株の LTA は SDS 電気泳動に置ける移動度が遅くなることが示され、糖脂質欠損により LTA への二次的な影響が生じていることが明らかになった。この LTA への二次的な影響が ECF  $\sigma$  因子の活性化の原因であるのかを調べるために、LTA と糖脂質の 2 重欠損株を構築し、ECF  $\sigma$  因子の活性を測定したところ、LTA と糖脂質の 2 重欠損株では  $\sigma^M$  と  $\sigma^V$  の活性が LTA の単独欠損株に対して相加的に上昇していることが明らかとなり、LTA を欠損していても糖脂質欠損の影響が見られた。この結果は、糖脂質欠損株における  $\sigma^M$  と  $\sigma^V$  の活性化は LTA への二次的な影響を介さないことを示している。一方、2 重欠損株において  $\sigma^X$  の活性のさらなる上昇は見られず、LTA を欠損していると糖脂質欠損の影響が見られなくなることがわかった。これは、 $\sigma^X$  の活性化の原因は糖脂質欠損による LTA への二次的な影響である可能性を示唆している。糖脂質欠損株の細胞形態異常は  $Mg^{2+}$  により部分的にサプレスされることが知られている。ECF  $\sigma$  因子の活性化も  $Mg^{2+}$  によってサプレスされるかを調べたところ、 $MgSO_4$  の添加によって糖脂質欠損株の  $\sigma^M$ ,  $\sigma^V$ ,  $\sigma^X$  の活性が野生株レベルまで低下していた。 $Mg^{2+}$  のような 2 価カチオンは、両性リン脂質であるホスファチジルエタノールアミンを欠損し、酸性リン脂質のみとなった大腸菌の生育に必須であり、負電荷が増加した膜を安定化するものと考えられる。電荷をもたない糖脂質が欠損することによって膜表面の電荷分布の様相が変化したことが、ECF  $\sigma$  因子の活性化の原因のひとつと考えることができる。

次に糖脂質欠損による $\sigma^V$ の活性化機構を調べた。 $\sigma^V$ はリゾチームに応答し、アンチ $\sigma$ 因子 RsiV が分解されることによって活性化することが示されている。そこで、糖脂質欠損による $\sigma^V$ の活性化が同様の RsiV 分解によるのかを調べるため、RsiV の分解に関わるメタロプロテアーゼ RasP と糖脂質の 2 重欠損株を構築し $\sigma^V$  活性を測定したところ、糖脂質の単独欠損株と糖脂質と RasP の 2 重欠損株では $\sigma^V$  活性に差が見られなかった。さらに FLAG タグを付加した $\sigma^V$ を用いて細胞内の $\sigma^V$ 量を免疫ブロッティング解析したところ、リゾチーム処理によっては減少したが、糖脂質欠損では変化は見られなかった。これらの結果から糖脂質欠損による $\sigma^V$ の活性化は RsiV の分解とは異なるメカニズムであることが示された。続いて、糖脂質欠損による $\sigma^V$ の活性化に RsiV は関与していないのかどうかを調べるために、RsiV と糖脂質欠損の 2 重欠損株に $\sigma^V$  活性を測定した。その結果、RsiV と糖脂質の 2 重欠損株の $\sigma^V$  活性は RsiV の単独欠損株と同じ活性を示し、RsiV を欠損していると糖脂質欠損の影響が見られなくなることがわかった。この結果は糖脂質欠損の影響を RsiV が受けることで $\sigma^V$ が活性化していることを示している。RsiV のどのドメインが糖脂質欠損の影響を受容しているのかを調べるために、糖脂質欠損では活性化しなかった $\sigma^W$ のアンチ $\sigma$ 因子 RsiW と RsiV の細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞外ドメインをシャッフルしたキメラアンチ $\sigma$ 因子を構築し、 $\sigma^V$  活性の測定を行なった。その結果、細胞外ドメインが RsiW になっているキメラを発現させても糖脂質欠損による活性化は観察されなかった。この結果は RsiV の細胞外ドメインが糖脂質欠損の影響を感知することで $\sigma^V$ が活性化することを示唆している。

以上の結果から、糖脂質欠損株における $\sigma^V$ の活性化機構を考察すると、 $\sigma^V$ は糖脂質欠損株において膜表面電荷分布の異常を RsiV の細胞外ドメインが感知し、コンホメーション変化を起し、その情報が細胞内ドメインまで伝わりコンホメーションが変化することで $\sigma^V$ が遊離し活性化していると考えられる。糖脂質は膜表面の電荷分布を調整することによって、RsiV などの膜タンパク質が機能できるような環境を形成する働きを担っている可能性が考えられる。

ECF  $\sigma$  因子は、細菌が外部環境の変動に応答して遺伝情報発現を制御するのに重要な役割を担っているが、その応答機構が明らかになっている例は数少ない。本論文の研究は、枯草菌の糖脂質欠損株に注目して、これが LTA への二次的な影響を介さずに $\sigma^M$ と $\sigma^V$ を、LTA への二次的影響を介して $\sigma^X$ を活性化していることを見出した。また、従来リゾチームへの応答反応からアンチ $\sigma$ 因子 RsiV の分解によって活性化するとされてきた $\sigma^V$ が、おそらくは細胞膜表面の電荷分布の異常に応答して RsiV がコンホメーション変化を起こすことによって、RsiV の分解を伴わずに活性化することを示した。大腸菌においても細胞膜表面の電荷分布の異常によって各種トランスポーター膜タンパク質のコンホメーション変化が生じることが示されている。本研究による発見は枯草菌における糖脂質の生理的機能と ECF  $\sigma$  因子の活性化機構に新たな視点を導入するものである。学位申請者は、博士前期課程で共同筆頭著者として 1 報、博士後期課程で筆頭著者として 1 報、第二著者として 1 報を国際誌に発表している。以上のことから、当審査委員会は、本論文を博士(理学)の学位を授与するに値するものと判断した。