

論文の要約

報告番号	甲 第 1052 号	氏名	関 貴洋
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		
<p>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をコードする <i>ugtP</i> 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σ^M, σ^V, σ^Xの3つが活性化していることがわかっている。このように糖脂質は枯草菌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。</p> <p>枯草菌は7つのECFシグマ因子($\sigma^M, V, W, X, Y, Z, YlaC$)を持っており、$\sigma^Z$を除く6つのECFシグマ因子は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膜へと隔離されることで活性が抑制されている。まず、糖脂質欠損株におけるσ^M, σ^V, σ^Xの活性の上昇がこれらのECFシグマ因子の活性化によってもたらされているのか確かめるために、各ECFシグマ因子と糖脂質の二重欠損株を構築し活性を各ECFシグマ因子の認識するプロモーターと <i>lacZ</i> の転写融合を用いたβ-Gal assayによってECFシグマ因子の活性を測定した。その結果、各ECFシグマ因子と糖脂質欠損の二重欠損株においても、β-ガラクトシダーゼ活性がなくなり、糖脂質欠損株ではσ^M, σ^V, σ^Xが実際に活性化していることが確認された。次に、UgtPタンパク質の欠損の影響によってECFシグマ因子が活性化しているのかを調べるためUgtPの活性部位である18番目のヒスチジンをアラニンに置換し糖脂質合成活性を失った変異UgtP_{H18A}を糖脂質欠損株において発現させECFシグマ因子の活性を測定した。その結果、UgtP_{H18A}を発現させてもECFシグマ因子の活性の低下は見られず、UgtPタンパク質の欠損ではなく糖脂質の欠損の影響によってECFシグマ因子活性化していることが強く示唆された。糖脂質が細胞表層の重要な構成要素であるリポテイコ酸 (LTA) の膜アンカーとして機能していることから、糖脂質欠損によってLTAへの二次的な影響が予想された。そこで、野生型株と糖脂質欠損株のLTAを、抗LTA抗体を用いたウェスタン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。この糖脂質欠損によるLTAへの二次的な影響が糖脂質欠損株におけるECFシグマ因子の活性化の原因かを調べるために、LTAと糖脂質の二重欠損株のECFシグマ因子の活性の解析を行った。その結果、LTAと糖脂質の二重欠損株においてσ^Mとσ^VはLTA欠損と糖脂質欠損の両方の影響で相加的に活性が上昇した。一方、σ^X活性は上昇せず、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。これらの結果は、σ^Mとσ^Vの活性化はLTAへの二次的な影響を介さず活性化するが、σ^XはLTAへの二次的な影響を介して活性化することを示唆している。糖脂質欠損株の細胞形態の異常がMg²⁺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Mg²⁺によってサプレスされるかを調べたところ、MgSO₄の添加によって糖脂質欠損株のECFシグマ因子の活性が野生株レベルまで低下することが明らかになった。これはMg²⁺により糖脂質欠損株の細胞膜が安定化し、各ECFシグマ因子のアンチシグマ因子が機能できるようになったことを示唆している。糖脂質を持たない大腸菌に、枯草菌ECFシグマ因子とその活性を抑制する膜タンパク質であるアンチシグマ因子のオペロンを持ったプラスミド、ECFシグマ因子が認</p>			

識するプロモーターと *lacZ* の転写融合を持ったプラスミド、IPTGによって発現制御可能にした *ugtP* を持ったプラスミドを導入し、大腸菌において *ugtP* を発現させた時の枯草菌 ECF シグマ因子の活性を測定した。その結果、大腸菌において *ugtP* を持たせるだけで σ^M と σ^V の活性が低下し、IPTGによって発現を誘導し糖脂質を合成させることでさらに活性の低下が見られた。この結果は、糖脂質によって σ^M と σ^V のアンチシグマ因子が機能できるようになることを示している。これらの結果から、糖脂質欠損株における ECF シグマ因子の活性化は、膜の不安定化によりアンチシグマ因子の機能が低下したために起きている可能性が考えられる。

次に、糖脂質欠損による σ^V の活性化の分子メカニズムについて解析を行った。 σ^V はリゾチームに強く応答し、その活性化機構は膜タンパク質であるアンチ σ^V 、RsiV の分解によると考えられている。糖脂質欠損株における σ^V の活性化が RsiV の分解を伴っているのかを調べることにした。RsiV の膜貫通領域の分解に働くメタロプロテアーゼ RasP と UgtP の二重欠損株において σ^V 活性を解析したところ、 σ^V 活性は UgtP の単独欠損株と変わらなかった。また、FLAG タグを付けた RsiV を用いてウェスタン解析を行ったところ糖脂質欠損株と野生株で FLAG-RsiV 量に差は見られなかった。これらの結果より糖脂質欠損株における σ^V の活性化は RsiV の分解を伴わない別のメカニズムであることが明らかとなった。また、RsiV と UgtP の二重欠損株において σ^V 活性を解析したところ RsiV を欠損していると糖脂質欠損の影響は見られなくなった。これは糖脂質欠損の影響を RsiV が受けることを示し、糖脂質欠損株における σ^V の活性化機構に RsiV が関与してい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 σ^M と σ^V の活性化は糖脂質欠損によって生じた膜の電荷プロパティの異常による可能性が示唆され、 σ^X の活性化は LTA への二次的な影響によることが示唆された。また、糖脂質欠損株における σ^V の活性化は RsiV の分解を伴わないメカニズムによって活性化していることが示され、RsiV のコンホメーション変化によって活性化している可能性が示唆された。これらのことから、糖脂質は細胞膜上の電荷プロパティを整えることでアンチシグマ因子などの膜タンパク質が機能できる環境を作る働きを有している可能性が考えられる。