

氏名	原 義令
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 765 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 24 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	細菌の脂質合成初期過程の分子遺伝学的研究
論文審査委員	委員長 教授 松本 幸次 委員 教授 大西 純一 委員 教授 高橋 康弘 委員 准教授 朝井 計 委員 准教授 原 弘志

## 論文の内容の要旨

全てのリン脂質の前駆体であるホスファチジン酸 (PA) は、グリセロール 3 リン酸 (G3P) にアシルトランスフェラーゼ (AT) により、2つのアシル基が転移されて合成される。これらの反応は大腸菌や動物細胞で詳しく研究され、2種の AT が触媒する事が示されてきた。第 1 は G3PAT で、大腸菌ではその活性を PlsB が担っている。第 2 はリゾホスファチジン酸(LPA)AT で、大腸菌ではその活性を PlsC が担っている。近年多くの細菌のゲノム配列が解読され、その結果、PlsB が保存されていない細菌が多く存在することが明らかとなった。

2006 年に肺炎双球菌では新規の G3PAT である PlsY が発見され、それまで機能未知であった PlsX の機能は、PlsY のアシル転移反応の基質であるアシルリン酸の合成を行うものであることが明らかとなった。また、PlsC にはアシル転移反応の基質が異なる 2つのタイプが存在することも明らかとなった。

枯草菌においても前後して、PlsY と PlsX が LPA の合成に関与することが示唆されていた。私はこのことを受け、以前、枯草菌のこれらの発現制御株をもちいて、大腸菌 *plsB* を導入し、相補実験を行った。その結果、*plsY* に関しては増殖を十分に相補したが、*plsX* には相補をみることができなかった。そのため PlsY は LPA を合成する G3PAT と考えることができたが、PlsX は不明瞭なままとなっていた。

そこで第 1 章では枯草菌における PlsY と PlsX の機能と相互の関係を、大腸菌の *plsB* 変異株を用いた新たな実験系を構築し、さらに検討した。

その結果、*plsX* は *plsY* と同時に発現したときのみ、*plsB* 変異株の増殖を相補することが明らかとなった。また枯草菌 PlsY は、*in vitro* の研究から、アシルリン酸を基質とする G3PAT 活性を持つことが示されたため、これらの結果を合わせて、枯草菌でも PlsY と PlsX によって LPA が合成されているものと推定した。

PlsX が LPA 合成に関与するため、*plsX* を発現抑制した際に PlsB が増殖を回復できなかったことに疑問が持たれ、詳細に検討した。その結果、*plsX* の発現抑制時に、*plsB* を LPA 合成に必要と考えられる量よりも過剰に発現した状態では増殖が相補され、この状態であれば *plsX* を完全に欠損することが可能であることが明らかとなった。以前にアシル-アシルキャリアープロテイン（アシル ACP）の蓄積による増殖阻害が起こることが明らかとなっていて、PlsB と PlsX はどちらもアシル ACP を基質とするため、PlsB が過剰量必要とされるのはアシル ACP の蓄積を防ぐためであると考えられる。

第 2 章では、細菌界に 2 つのタイプの PlsC が存在する理由を検討し、考察した。

2 つのタイプの PlsC が存在する理由として、どちらかのタイプの PlsC がそれを保存しない細菌では機能できないためである可能性が考えられた。大腸菌と枯草菌で PlsC は必須であるが、保存する PlsC のタイプが異なっていたため、これらの細菌の PlsC を置換しても増殖可能であるかを検討した。その結果、各細菌の PlsC は置換可能であり、増殖に影響を与えなかった。そのため保存する PlsC のタイプの違いは機能できるか否かといったレベルで決定されているわけではないと示唆される。この事実から、使用する AT を決定する要素はその酵素的特徴で、特定の細菌により適したものが保存されているのではないかと推測される。

第 3 章では、PlsY の酵素的特徴について解析を行った。

PlsY の酵素的特徴はほとんど明らかとなっていない。そのため、枯草菌 PlsY の酵素活性について検討した。その結果、PlsY は PlsB と比較して低濃度のマグネシウムイオンに対する要求性が高いことなどの性質が異なること、また G3P アナログによる酵素活性の阻害の程度が低いことなどが明らかとなった。そのため、PlsB と PlsY が異なる酵素的特徴を持つことが、枯草菌では PlsB ではなく PlsY を保存されている理由だと推測される。

第 4 章では、PlsY をターゲットとする新規薬剤のスクリーニングを行った。

PlsY は、真核生物にはこれまでに見出されていなく、病原性を持つグラム陽性菌など、細菌に広く保存されている。このため、新規薬剤のターゲットとなるものとして注目された。枯草菌で PlsB が PlsY に代わり G3PAT として機能できることが明らかとなっていたため、*plsB* の発現の有無を対照としてスクリーニングに利用できると考え、PlsY に特異的な薬剤のスクリーニングを行った。その結果、目的とする薬剤は発見できなかった。そのため PlsY に特異的な薬剤が非常に少ない可能性が考えられる。

これらに加え小さな章を設けて、第 5 章では BLASTP を用いて G3PAT の細菌界における分布と、その多様性について解析を行い、PlsY タイプの分布と PlsB タイプの分布と PlsX との相関を考察した。第 6 章では PlsX の機能領域の解析を行った。

## 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。

リン脂質合成の初期過程で重要なリン脂質であるホスファチジン酸 (PA) は、グリセロール 3 リン酸 (G3P) からアシル転移酵素 (AT) により、アシル基が転移されてリゾホスファチジン酸 (LPA) が合成され、次にこの LPA に更にアシル基が転移されて合成されることが明らかとなっている。これらの反応は大腸菌や動物細胞で詳しく研究され、2つの異なるアシルトランスフェラーゼ (AT) が触媒することが示されてきた。大腸菌では、第1段階は PlsB が G3PAT であり、第2段階目は PlsC が LPAAT である。近年、多くの細菌のゲノム配列が解読され、その結果、PlsB が保存されていない細菌が多く存在することが明らかとなった。原義令氏は、枯草菌の脂質合成の初期過程の研究が十分に行われていないことから、この過程に興味をもち、博士課程の研究をすすめることとした。

第1章では枯草菌における PlsY と PlsX の機能と相互の関係を、大腸菌の *plsB* 変異を相補する系を開発し解析した結果を述べている。

この研究を進める過程で、2006年になって肺炎双球菌では新規の G3PAT である PlsY が発見され、それまで機能未知であった PlsX の機能は、PlsY のアシル転移反応の基質であるアシルリン酸の合成を行うものであることが明らかとなった (Lu *et al.*, 2006)。また、さらに PlsC には基質とするアシルドナーが異なる、2つのタイプが存在することも明らかとなった。枯草菌においては、前後して、PlsY と PlsX が LPA の合成に関与することが示唆されるようになり (Yoshimura *et al.*, 2005)、原氏は枯草菌のこれらの発現制御株をもちいて、LPA を合成することで既によく知られている大腸菌 *plsB* を導入し、相補実験を行った。その結果、*plsY* に関しては増殖を十分に相補したが、*plsX* には相補をみることができなかった。PlsY は、LPA を合成する G3PAT と考えることができたが、しかし、PlsX は LPA 合成に関与するかは不明瞭なままとなった。そこで、大腸菌の *plsB* 変異株を用いたあらたな実験系を構築して、さらに検討をすすめた。その結果、*plsX* は *plsY* と同時に発現したときのみ、*plsB* 変異細胞の増殖を相補することができることを見出した。*plsY* は別に行った *in vitro* の研究からアシルリン酸を使用する G3PAT 活性が確かであることを示し、これらの結果を合わせて、枯草菌でも PlsY と PlsX によって LPA が合成されているものと推定した。

原氏は、*plsX* を発現抑制した際に PlsB が増殖を回復できなかった原因に疑問を持ち、この問題を詳細に検討した。*plsX* の発現制御時に *plsB* を、LPA 合成に必要と考えられる量よりも過剰に発現した状態では増殖が相補されることを見出し、この状態であれば *plsX* を完全に欠損することが可能であることを明らかにした。この原因は、以前にアシル-アシルキャリアープロテイン (アシル ACP) の蓄積による増殖阻害が起こることが明らかとなっていて (Jiang and Cronan, 1994)、PlsB と PlsX はどちらもアシル ACP を基質として使用するため、PlsB が過剰量必要とされるのはアシル ACP のむやみな蓄積を防ぐためであるとの考察を展開させた。古くから知られる大腸菌の *plsB* 変異株である BB26-36 株が、グリセロール要求性を示すためには *plsX50* 変異の共存を必要とする理由についても同様の機構が関与すると考察した。

第2章では、細菌界に2つのタイプの PlsC が存在する理由を検討し考察を試みている。

大腸菌と枯草菌では、どちらも必須であるが保存する PlsC のタイプが大きく異なっている。これらの細菌の PlsC を交換し、増殖可能であるかを検討した。その結果、両者の PlsC は交換可能であり、増殖に影響を与えないことを示した。そのため、これらのタイプの違いは機能できるか否かといったレベルで決定されているわけではないことを示した。枯草菌では、これと同時に PlsY を PlsB に交換しても増殖に影響を

与えないことも示した。これらのことから、ATのタイプの違いを決定する因子を考察した。枯草菌は保存するATの特徴からリン脂質合成にアシル CoA を使用しないなどの相違を挙げ、このような観点から考察をおこなった。

第3章では、PlsYの酵素的特徴について解析をおこなった。

PlsYは最近になって肺炎双球菌で発見されたもので、その酵素的特徴はほとんど明らかとなっていない。このため、原氏は、枯草菌 PlsY の酵素的特徴を明らかにすることを目的として、大腸菌を用いて *plsY* の過剰発現系を構築し、PlsY-His6 の大腸菌膜画分をもちい、酵素活性について検討した。活性の測定は、化学合成したパルミトイルリン酸から [<sup>14</sup>C] G3P に、アシル基が転移されて、生成した LPA を TLC で展開し放射活性を定量した。その結果、PlsY は PlsB と比較して低濃度のマグネシウムに対する要求性が高いこと等の性質が異なること、またジヒドロキシアセトン 3 リン酸、DL-グリセルアルデヒド 3 リン酸の、G3P アナログによる酵素活性の阻害の程度が低いことなどの興味深い特徴を明らかにした。このことにもとづき、枯草菌で PlsB でなく PlsY が保存されていることの生理的意義について考察した。

第4章では、PlsY をターゲットとする新規薬剤のスクリーニングを試みた結果を述べている。

PlsY-PlsX 系は、真核生物にはこれまでに見出されていない脂質合成初期過程を触媒する酵素系であり、病原性を持つグラム陽性菌などに広く保存されている。このため新規薬剤のターゲットとなるものとして注目された。原氏は、枯草菌で PlsB が PlsY に代わり機能できることを見出していたため、*plsB* の発現の有無を対照としてスクリーニングに利用できることを考え、PlsY に特異的な薬剤のスクリーニングを行った。目的とする薬剤の発見に至っていないが、今後の PlsX をも含めたスクリーニング法の開発に展望を与えたものとして評価できる。

引き続き2つの小さな章を設けて、G3PATの細菌界における分布と、その多様性について、より広範な解析をおこなった結果を述べ、PlsYタイプの分布、PlsBタイプの分布とPlsXとの相関を解析し、考察をすすめた。また、PlsXの機能解析をおこなった結果についても述べており、PlsXが多量体を形成することから、その機能に関与する酵素タンパク上の機能領域を推定した。

これまで述べたように、本研究は細菌の脂質合成初期過程について、大腸菌と枯草菌の双方をもちいて詳細な遺伝学的解析を行ったものであり、これらの研究の一部は既に権威のある国際誌に掲載され、博士論文として十分な成果を得ているものと判断した。