

氏名	矢野 晃一
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 824 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 23 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	膜局在型アンチシグマ因子の機能発現に関わる機構の解析
論文審査委員	委員長 准教授 朝井 計 委員 教授 大西 純一 委員 教授 高橋 康弘 委員 准教授 原 弘志

論文の内容の要旨

近年、数多くのバクテリアゲノム情報が解読され、そのバクテリアにユニークなタンパク質をコードする遺伝子が多数発見されてきた。その内の一つとして ECF σ 因子が挙げられる。また、ECF σ 因子は細菌間でかなり多様化が進んでいることも明らかとなってきた。ゲノム情報が解読された細菌のほとんどが形質転換系が確立していない。したがって、その細菌の持つタンパク質の機能について調べることは手法上限界がある。そこで有用な手法となるのが、形質転換系の確立された細菌においてそのタンパク質を発現させる異種発現系である。ECF σ 因子には通常アンチ σ 因子も対になって存在するが、特に ECF σ 因子よりもアンチ σ 因子の方が多様化が進んでいる。以上のことから、ECF σ 因子とアンチ σ 因子を題材に解析することでこれまで知られていない新たな知見が得られる可能性が高い。本研究はそのような観点のもと、枯草菌と近縁で形質転換系の確立されていない *Bacillus* 関連細菌のもつ ECF σ 因子を枯草菌において発現させることで、それらの持つ ECF σ 因子の機能を調べることを試みた。

1) 枯草菌における *Bacillus* 関連細菌の持つ SigW-RsiW 系の異種発現 (投稿論文 1)

枯草菌において SigW-RsiW 系の解析は進んでおり、SigW のアンチ σ 因子は RsiW である。枯草菌と近縁な *Bacillus* 関連細菌にも枯草菌 SigW-RsiW に相当する遺伝子がコードされており、本研究ではそれらを推定上 SigW-RsiW 系として解析を行った。*Oceanobacillus iheyensis* の持つ *sigW-rsiW* (以下、*OlsigW-OlrsiW*) 遺伝子を枯草菌に導入すると、導入株はコロニー形成能が非常に悪く、枯草菌細胞に対して増殖を阻害する毒性を示すことが示唆された。また、*OISigW* のアンチ σ 因子と予想される *OIRsiW* を *OISigW* と共発現したが毒性は抑制されなかった。*OISigW* と同時に枯草菌 RsiW (以下 *BSRsiW*) を発現させると *OISigW* の毒性は抑えられたことから、*OIRsiW* は枯草菌において機能を発現することが出来ていないことが考えられた。*OlsigW-OlrsiW* 導入株は生育が回復するリバータントが得られるので導入した領域をシーケンシングすると、*OIRsiW* の膜貫通領域と推定される領域に疎水性アミノ酸からなる 6 アミノ酸残基の挿入 (*ins6* 変異) が見出された。したがって、*OIRsiW* の枯草菌における機能には細胞膜と何らかの関係があることが示唆された。そこで *OIRsiW* と *OIRsiWins6* タンパク質の N 末端に FLAG タグを付加し、局在を超遠心分離によって調べると、*OIRsiWins6* タンパク質のほうが *OIRsiW* タンパク質よりも細胞膜画分に

多く検出された。したがって野生型 OIRsiW は枯草菌において細胞膜に十分局在することが出来ないので OISigW の活性を抑制することが出来ないと考えられる。また、人工的に OIRsiW の膜貫通領域の挿入アミノ酸の数を増減させると、疎水性の 3 アミノ酸残基の挿入でも十分 OISigW の活性を抑制することが出来た。以上のことから、OIRsiW の膜貫通領域にとって枯草菌細胞膜は厚すぎるので十分細胞膜に局在することが出来ず、OISigW の活性を抑制することが出来ないと考えられる。

2) DIG-UTP を用いた non-RI の *in vitro* transcription system の構築 (投稿論文 2)

ECF σ 因子は非常に類似しているプロモーターを認識し分けており、その特異性を決定付けるアミノ酸残基やプロモーター配列上の塩基は現在のところ明らかではない。また、アンチ σ 因子は直接 ECF σ 因子と相互作用するが、アンチ σ 因子の相互作用ドメインの相同性は低く、(ECF σ 因子は保存性が高い) どのように ECF σ 因子と結合しているのかについて普遍的な説明は出来ない。そこで、ECF σ 因子やアンチ σ 因子、プロモーター領域に様々な変異を導入し、*in vitro* transcription によって上記の疑問を解決することを考えた。しかし、多くの変異体が構築され、実験が大規模になることが予想されたので RI を用いた系で実験が煩雑になることが予想された。そこで DIG を用いて non-RI の系を構築することを考えた。

枯草菌 RNA ポリメラーゼと σ^A タンパク質を精製し、DIG-UTP を基質に加え、*in vitro* で転写反応を行うと DIG ラベルされた RNA が合成された。また、GmuR リプレッサーを用いて転写に対する影響を確認したところ、GmuR によって転写が阻害されることが分かった。したがって、DIG-UTP を用いることで RI に代わる non-RI の *in vitro* transcription の系を構築することが出来た。

論文の審査結果の要旨

矢野晃一氏(申請者)の提出した学位論文について、審査委員会は、平成23年2月22日(火)15:00~16:00に埼玉大学理学部3号館第3会議室において公開で研究発表会を開催し、詳細な質疑応答を行った内容を審査した。審査結果の概要は以下の通りである。

近年、数多くのバクテリアゲノム情報が解読され、そのバクテリアにユニークなタンパク質をコードする遺伝子が多数発見されてきた。その内の一つとしてECF σ 因子が挙げられる。また、ECF σ 因子は細菌間でかなり多様化が進んでいることも明らかとなってきた。ゲノム情報が解読された細菌のほとんどが形質転換系が確立していない。したがって、その細菌の持つタンパク質の機能について調べることは手法上限界がある。そこで有用な手法となるのが、形質転換系の確立された細菌においてそのタンパク質を発現させる異種発現系である。ECF σ 因子には通常アンチ σ 因子も対になって存在するが、特にECF σ 因子よりもアンチ σ 因子の方が多様化が進んでいる。以上のことから、ECF σ 因子とアンチ σ 因子を題材に解析することでこれまで知られていない新たな知見が得られる可能性が高い。本研究はそのような観点のもと、枯草菌と近縁で形質転換系の確立されていない*Bacillus* 関連細菌のもつECF σ 因子を枯草菌において発現させることで、それらの持つECF σ 因子の機能を調べることを試みた。本論文の研究は大きくは以下の二つよりなる。

1) DIG-UTPを用いた non-RI の *in vitro* transcription system の構築

ECF σ 因子は非常に類似しているプロモーターを認識し分けており、その特異性を決定付けるアミノ酸残基やプロモーター配列上の塩基は現在のところ明らかではない。また、アンチ σ 因子は直接ECF σ 因子と相互作用するが、アンチ σ 因子の相互作用ドメインの相同性は低く、(ECF σ 因子は保存性が高い)どのようにECF σ 因子と結合しているのかについて普遍的な説明は出来ない。そこで、ECF σ 因子やアンチ σ 因子、プロモーター領域に様々な変異を導入し、*in vitro* transcriptionによって上記の疑問を解決することを考えた。しかし、多くの変異体が構築され、実験が大規模になることが予想されたのでRIを用いた系で実験が煩雑になることが予想された。そこでDIGを用いて non-RI の系を構築することを考えた。

枯草菌 RNA ポリメラーゼと σ^A タンパク質を精製し、DIG-UTPを基質に加え、*in vitro*で転写反応を行うとDIGラベルされたRNAが合成された。また、GmuRリプレッサーを用いて転写に対する影響を確認したところ、GmuRによって転写が阻害されることが分かった。したがって、DIG-UTPを用いることでRIに代わる non-RI の *in vitro* transcription の系を構築することが出来た。

2) 枯草菌における *Bacillus* 関連細菌の持つ SigW-RsiW 系の異種発現

枯草菌においてSigW-RsiW系の解析は進んでおり、SigWのアンチ σ 因子はRsiWである。枯草菌と近縁な*Bacillus* 関連細菌にも枯草菌SigW-RsiWに相当する遺伝子がコードされており、本研究ではそれらを推定上SigW-RsiW系として解析を行った。*Oceanobacillus iheyensis*の持つ*sigW-rsiW*(以下、*OlsigW-OlrsiW*)遺伝子を枯草菌に導入すると、導入株はコロニー形成能が非常に悪く、枯草菌細胞に対して増殖を阻害する毒性を示すことが示唆された。また、*OISigW*のアンチ σ 因子と予想される*OIRsiW*を*OISigW*と共発現したが毒性は抑制されなかった。*OISigW*と同時に枯草菌RsiW(以下BSRsiW)を発現させると*OISigW*の毒性は抑えられたことから、*OIRsiW*は枯草菌において機能を発現することが出来ていないことが考えられた。*OlsigW-OlrsiW*導入株は生育が回復するリバータントが得られるので導入した領域をシーケンシングすると、*OIRsiW*の膜貫通領域と推定される領域に疎水性アミノ酸からなる6アミノ酸残基の挿

入 (ins6 変異) が見出された。したがって、OIRsiW の枯草菌における機能には細胞膜と何らかの関係があることが示唆された。そこで OIRsiW と OIRsiWins6 タンパク質の N 末端に FLAG タグを付加し、局在を超遠心分離によって調べると、OIRsiWins6 タンパク質のほうが OIRsiW タンパク質よりも細胞膜画分に多く検出された。したがって野生型 OIRsiW は枯草菌において細胞膜に十分局在することが出来ないので OISigW の活性を抑制することが出来ないと考えられる。また、人工的に OIRsiW の膜貫通領域の挿入アミノ酸の数を増減させると、疎水性の 3 アミノ酸残基の挿入でも十分 OISigW の活性を抑制することが出来た。以上のことから、OIRsiW の膜貫通領域にとって枯草菌細胞膜は厚すぎるので十分細胞膜に局在することが出来ず、OISigW の活性を抑制することが出来ないと考えられる。

以上をまとめると、本論文で得られた新たな知見は、以下の 2 点である (1) 安全で効果的な非アイソトープ標識による機能未知シグマ因子の網羅的な *in vitro* 解析系を構築した。(2) 膜タンパク質の機能発現に重要な細胞膜への組み込みには、生物種に応じて異なる最適な膜貫通領域のアミノ酸長を調節する必要がある。これらの研究成果は、ゲノムシーケンシング解析から得られる未解析シグマ因子や膜タンパク質の機能解析に寄与する新しい知見であり、高い意義を有すると判断する。なおこれらの結果は筆頭著者として 2 報の論文が査読付き国際専門誌に発表または発表予定になっている。これらの成果から、本審査委員会は、本学位論文を博士論文として十分に価値があり、学位論文の審査に「合格」と判断した。