

氏 名	橋本 理尋
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 861 号
学位授与年月日	平成 24 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	枯草菌細胞表層の構造と機能 —表層変異株におけるシグマ因子の活性からの解析—
論文審査委員	委員長 教授 松本 幸次 委員 准教授 朝井 計 委員 准教授 仲本 準 委員 准教授 原 弘志

## 論文の内容の要旨

枯草菌の脂質は大腸菌に比べて多様である。phosphatidylglycerol (PG) 合成の律速段階を触媒する酵素をコードする *pgsA* は必須遺伝子であり、*pgsA* の発現を抑制した対数増殖期の細胞は致死性を示す。この致死性の直接的原因が PG の欠乏自体なのか、それとも PG の減少に伴う脂質組成やその他の変化に由来するのかは解っていない。glucolipids (GL) は細胞形態維持に重要な役割を果たしており、対数増殖期において GL 欠損株は膨張し、歪曲した細胞形態を示し、定常期では短く膨張した細胞形態を示す。Phosphatidylethanolamine は主要両性リン脂質であるにも関わらず、欠損株の表現型は見つかっていない。よって私は、各脂質欠乏ストレスにตอบสนองする ECF シグマ因子から、各脂質欠乏細胞がどのようなストレス状態にあるのかを推定し、各脂質の生理的機能を解明しようと考えた。

PG を減少させると、 $\sigma^M$  などの extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子が活性化した。活性化した ECF シグマ因子から、PG が細胞表層負電荷や細胞壁の恒常性維持に関わっていることが示唆された（発表論文 1）。また、GL 欠損による異常な細胞形態と  $\sigma^M$  の関連性について調べ、 $\sigma^M$  の支配下の遺伝子である *mreB* の発現上昇が原因のひとつであることを示唆した（発表論文 3）。これらの結果は、未だ解明されていない ECF シグマ因子の活性制御メカニズムの解明に寄与した。しかし、 $\sigma^M$  などの活性化レベルは致死性の原因を直接的に推定できる程高いものではなく、PG の必須性の解明には至らなかった。よって、私は、ストレス応答シグマ因子ではなく、ハウスキーピングシグマ因子  $\sigma^A$  に着目した。Real time RT-PCR を用いた解析により、PG 減少条件下では *sigA* の mRNA 量が減少していることを明らかにした。PG の必須性の原因が *sigA* の発現レベルの低下であるかどうかを現在検討中である（投稿準備中論文 5）。

PG 減少条件下で活性化した ECF シグマ因子は、GL の欠損細胞でも活性化した。一方で、phosphatidylethanolamine 欠損細胞ではすべての ECF シグマ因子が活性化しなかった。私は、これらの ECF シグマ因子が lipoteichoic acid (LTA) の減少にตอบสนองしているのではないかと考えた。LTA は膜アンカーである diglycosyldiacylglycerol に polyglycerol-1-phosphate が付加した構造で、PG が glycerol-1-phosphate を供給する基質となっている。LTA は負電荷を連ねた網目状のマトリックスを形成していて、イオン交換性を持つ高分子電解質ゲルとして働き、金属陽イオンの恒常性維持や制御だけでなく、栄養分、タンパク質、抗生

物質などの輸送にも関わっていて、細胞表層の重要な機能を担っている。本研究では、LTA 合成酵素をコードする *ltaS* と *yfnI* の破壊株における ECF シグマ因子遺伝子の mRNA 量を、real time RT-PCR により測定し、ECF シグマ因子の活性化が LTA の減少により誘導されるかどうかを検証した。PG 減少や GL 欠損にตอบสนองした ECF シグマ因子が、LTA の減少にตอบสนองしていることを明らかにした。SigM は *ltaS* 破壊により特異的に活性化され、SigX は *yfnI* 破壊により特異的に活性化されることを示した。枯草菌に LTA 合成酵素が複数あることの生理的意義は未解明であったが、本研究の発見により、長さの異なる LTA を使い分けることで、細胞表層の恒常性維持に主要な役割を果たす二つの ECF シグマ因子、SigM と SigX の活性レベルが制御されていることが示された（投稿準備中論文 4）。

枯草菌の diacylglycerol (DG) kinase をコードする *dgkB* 遺伝子は必須である。*dgkB* の発現抑制条件下では、生育が停滞し、DG の過剰な蓄積がみられる。DG は主に、PG の glycerol-1-phosphate の重合による LTA の生合成に伴って生じる。LTA 合成酵素の破壊条件下では DG が蓄積しにくくなっており、*dgkB* の破壊が可能なのではないかと考えた。LTA 合成酵素の破壊条件下では、*dgkB* の破壊が可能であった。しかし、DG 含量の解析により、生育の回復している *ltaS* の破壊条件下で *dgkB* の発現を抑制した細胞でも DG が蓄積していることがわかり、DG の蓄積が *dgkB* の必須性の原因であるという理論のみでは説明できないことがわかった。脂質組成解析により、*dgkB* 発現を抑制し、DG が蓄積した条件下では、リン脂質組成の多様性が失われることを見出した（発表論文 2）。

## 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橋本理尋氏による発表とそれに続く質疑応答にもとづく論文内容の審査の結果を、以下に要約する。

枯草菌の主要なリン脂質である酸性リン脂質ホスファチジルグリセロール (PG) は生育に必須であり、PG 合成の律速段階を触媒する PGP 合成酵素をコードする *pgsA* の発現を抑制すると、細胞は致死性を示す。この致死性の直接的原因が何に依るのかは解っていない。ホスファチジルエタノールアミン (PE) は、量的に主要な両イオン性のリン脂質である。また糖脂質グルコリピド (GL) は細胞形態の維持に極めて重要な役割を果たしており、対数増殖期において GL 欠損細胞は膨張し、歪曲した形態を示し、定常期においては短く膨張した形態となる。また、両脂質を材料として合成される細胞表層のリポテイコ酸 (LTA) を欠損した細胞は、その増殖速度が低下する。

本論文は、細胞質外の様々なストレスに応答する ECF シグマ因子の活性化の有無から、上記の各脂質を欠損した細胞、また LTA を欠損した細胞がどのようなストレス状態にあるかを推定し、そこから各脂質が細胞表層においてどのような構造的役割をもち、どのような生理的機能を持つのかを解明することを目的としたものである。

第 1 章 第 1 節では、PG 含量を減少させた細胞、PE を欠損する細胞、また GL 欠損細胞における ECF シグマ因子の活性化を解析した結果を述べている。

枯草菌 *Pspac-pgsA* 株を構築し、発現誘導物質を除去することにより、細胞の PG 含量は 2 時間後には 1/2 に、3 時間後には 1/3 に減少し、このとき、 $\sigma^M$   $\sigma^V$  などの ECF シグマ因子が活性化することを見出した。膜のリン脂質として、最も主要な割合を占めている PE を欠損する細胞では、ECF シグマ因子の活性化は見られない。また、GL 欠損細胞においては、 $\sigma^M$   $\sigma^V$   $\sigma^X$  の ECF シグマ因子が活性化していることを見出した。PG 含量が減少した細胞では、総酸性リン脂質として見た場合にも顕著に減少していることから、細胞表層の負電荷の減少や、細胞壁における構造変化が、ECF シグマ因子を活性化させている可能性を示唆した。

さらに、橋本氏は、PG 減少細胞で活性化した ECF シグマ因子は、GL 欠損細胞でも活性化したことから、これらの両脂質を材料として合成される細胞表層のリポテイコ酸 (LTA) の減少、欠損に ECF シグマ因子が応答しているのではないかと考え、以下の節の実験をすすめた。

第 2 節では、LTA を欠損させた細胞における、ECF シグマ因子の活性化を解析した結果を述べている。

LTA は糖脂質ジグルコシルジアシルグリセロールを膜アンカーとして、グリセロール 1 リン酸 (G1P) のポリマーが付加した構造をもち、PG は G1P を供給する基質となっている。LTA はリン酸の負電荷を連ねた網目状のマトリックスを形成していて、イオン交換性を持つ高分子電解質ゲルとして働き、細胞表層の金属陽イオンの恒常性維持などに関わり、細胞表層の重要な機能を担っている。橋本氏は、LTA 合成酵素をコードする 2 つの主要遺伝子 *ltaS* と *yfnI* の各破壊株における各 ECF シグマ因子遺伝子の mRNA 量を real time RT-PCR により測定し、各 ECF シグマ因子の活性化が LTA 減少により誘導されるかを解析した。これより、PG 減少や GL 欠損に応答した ECF シグマ因子が、LTA の減少に同様に応答することを明らかにした。即ち、*sigM* は *ltaS* 破壊により特異的に誘導され、*sigX* は *yfnI* 破壊により特異的に誘導されること

を見出した。枯草菌において LTA 合成酵素が複数あることの生理的意義は未解明であったが、本研究は、2つの酵素により合成される異なる LTA の欠損に応答することで、細胞表層の恒常性維持に主要な役割を果たす2つの ECF シグマ因子、 $\sigma^M$  と  $\sigma^X$  の活性レベルがそれぞれ制御されている可能性を示し、加えてこれら ECF シグマ因子に各 LTA 合成酵素の遺伝子の発現が制御されている可能性を示した。

*ltaS* と *yfnI* の2重破壊細胞では、ともに酸化ストレスに応答する新たなシグマ因子  $\sigma^W$  と  $\sigma^{YlaC}$  が誘導されることを見出し、大部分の LTA が失われたと推定されるこの細胞表層は、新たなストレスが発生している状態にあることを示唆した。橋本氏は、この2重破壊細胞に *Pspac-pgsA* を導入し、PG 含量を減少させることにより、 $\sigma^M$  と  $\sigma^W$  の顕著な誘導が新たに起こることを見出し、細胞の表層には、更に新たなストレスが発生していることを示唆した。また一方では、PG 含量を減少させることにより、主要シグマ因子である *sigA* 遺伝子の転写量が顕著に減少することを見出し、実際に  $\sigma^A$  タンパク質が減少傾向にあることを Western 法により示しており、必須の脂質である PG は、細胞表層の構造維持に留まらず、細胞の中核的機能においても不可欠な役割を果たしている可能性を示した。

第2章では、ジアシルグリセロールキナーゼ (DG kinase) の構造遺伝子 *dgkB* の必須性を解析した。即ち、LTA 生合成の際に G1P ポリマーを形成するための基質として用いられる PG から、DG が放出されるが、この DG をリン酸化し、ホスファチジン酸に戻して通常のリン脂質合成経路に回収するための酵素 DG kinase の構造遺伝子 *dgkB* の必須性の原因を解析した。

*Pspac-dgkB* 株の発現を抑制した条件下では、生育が停滞し、DG の過剰な蓄積がみられる。DG は主に LTA の生合成に伴って生じるため、LTA 合成酵素遺伝子を破壊した条件下では DG が蓄積しにくくなっており、*dgkB* の破壊が可能であろうと推定し、LTA 合成酵素遺伝子を破壊した条件下では、実際に *dgkB* を破壊することが可能であることを示した。

しかし、DG 含量の解析により、生育の回復している LTA 合成酵素遺伝子の一方である *ltaS* の破壊条件下で *dgkB* の発現を抑制した細胞でも DG が蓄積していることが見出され、DG の蓄積が *dgkB* の必須性の原因であるという理由のみでは説明できないことがわかった。即ち、DG の蓄積そのものは、枯草菌細胞にとっては有害で、生育停滞を必ずもたらすという訳ではないことが示された。これら細胞の脂質組成を解析することにより、*dgkB* 発現を抑制し、DG が蓄積した条件下では、PG 含量は維持されるが、PE、カルジオリピン、リジル PG などの他のリン脂質の顕著な減少が見出され、このリン脂質組成の多様性が失われることが、生育停滞の一因となっている可能性を指摘した。

総合討論では、細胞表層の様々なリン脂質の減少、欠損、および LTA の欠損状態の違いがもたらす細胞表層上のストレスを、各 ECF シグマ因子の活性化の状況から様々な考察し、それによりそれぞれの細胞表層の構成要素の、構造・機能上の役割を理解するための幅広い議論を展開している。各シグマ因子の活性制御機構が感知するシグナルとして、細胞表層の電荷状態、脂質組成、特定蛋白質の活性状態などがある可能性を指摘し、それら各ストレスに対する応答により ECF シグマ因子を分類できる可能性を示した。

橋本氏の研究は、枯草菌の細胞表層構造を理解するうえで、これまでにない新たな方法論を展開し、細胞表層構造とその機能の理解に新たな一歩を与えたものとして、大いに評価できるものであることを認めた。