

論文内容の要旨

申請者氏名 田中 耕生

2成分制御系は、環境の変化を感知し、一群の遺伝子の発現を制御するシステムである。枯草菌では36の2成分制御系センサー遺伝子が同定されており、5つのクラスに分類されている。その1つに*citS*, *ydbF*, *yufL* ファミリーがあり、*citS* 遺伝子はクエン酸の、*ydbF* 遺伝子はコハク酸とフマル酸の利用に関わることが解明されている。リンゴ酸もこれらの糖と同じくクエン酸サイクルの中間生成物であることから、機能未解析の*yufL* 遺伝子（センサー遺伝子）と*yufM* 遺伝子（調節蛋白質遺伝子）がリンゴ酸の利用に関わると推定し、解析を行った。

予想通り、*yufM* 破壊株は、炭素源としてリンゴ酸を添加した最少培地では生育できなかった。一方、意外なことに、*yufL* 破壊株は野生株と同様の増殖を示した。次に、枯草菌ゲノム中に存在するリンゴ酸取り込みに関わると考えられる遺伝子を探索した。得られた4候補遺伝子について、各種の炭素源を添加した培地での転写レベルを比較した結果、リンゴ酸を添加した培地での*maeN*, *yflS* 遺伝子の転写の誘導が確認された。そして、*yufM* 破壊株では、それらの転写は誘導されなくなった。そこで、調節蛋白質 YufM の結合配列を、プロモーター領域のデリーション解析とフットプリント解析により明らかにした。その結果、調節蛋白質 YufM は*maeN*, *yflS* 遺伝子の開始コドンから上流約90bpの領域に結合し、リンゴ酸存在下で転写の誘導を行うことが示された。また、*maeN* 破壊株はリンゴ酸を唯一の炭素源とする培地では生育しなかった。これらの結果から、用いた最小培地では、MaeN が培地中のリンゴ酸によって転写が誘導される主要なリンゴ酸トランスポーターであることが明らかとなった。

リンゴ酸培地で増殖に影響がなかったセンサーキナーゼ *yufL* 遺伝子の破壊株について、*maeN*, *yflS* 遺伝子の転写を調べると、それらは恒常的に発現していた。さらに、この株に YufL 蛋白質を供給すると、リンゴ酸特異的な *maeN*, *yflS* 遺伝子の転写誘導が確認された。これらの結果から、YufL 蛋白質はリンゴ酸の認識だけでなく、調節蛋白質 YufM の不活性化（脱リン酸化）にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に、センサー蛋白質が基質を認識しシグナルを伝達する分子機構を明らかにするために、*yufL* 遺伝子にランダムな変異を導入し、リンゴ酸存在下でも調節蛋白質 YufM を活性化できない変異を同定した。その結果、一アミノ酸変異を持つ株が18種同定できた。そして、まず、シグナル伝達の第一段階であるセンサー蛋白質と基質との結合を解析した。そのために、YufL の細胞膜外領域を精製し、RI でラベルされたリンゴ酸との結合を、野生株と細胞膜外ドメインに変異の入った7株について比較した。その結果、リンゴ酸と結合できない変異株が4株、野生株と同レベルの結合能を持つ変異株が3株同定された。さらに、YufL の細胞膜外領域をゲルろ過により分離したところ、野生株ではリンゴ酸の有無で精製画分が変化するのに対して、リンゴ酸と結合できない変異株ではリンゴ酸の有無に関わらず同じ画分に回収された。これらのことから、YufL の細胞膜外領域はリンゴ酸との結合により構造変化を起こし、その構造変化をシグナルとして伝達すると考えられた。今後、本研究で単離した18種の変異株を用いて、2成分制御系のシグナル伝達がどのような機構で行われているかを明らかにできることが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 田中 耕生

2成分制御系は、細菌における情報伝達システムとして、その機能と構造の研究が進んでいる。様々な細菌のゲノム配列決定によって、各細菌が有している2成分制御系の全体像が明らかにされているが、その多くのものの機能は不明である。グラム陽性細菌を代表する枯草菌のゲノムには、31対の2成分制御系センサーとレギュレーターのパアと、孤立した6個のセンサー、4個のレギュレーターがコードされているが、特異的な機能が報告されているものは40%強である。申請者は、機能未知の2成分制御系遺伝子の機能解明を目指して、*citS*, *ydbF*, *yufL* ファミリーに属する、*yufL* 遺伝子（センサー遺伝子）と *yufM* 遺伝子（調節蛋白質遺伝子）の研究を行った。

まず、YufLM は、枯草菌で未知であった、リンゴ酸の利用に関わると推定し、培地中のリンゴ酸によって発現誘導される膜輸送遺伝子を同定した。そして、その発現が YufM 制御蛋白質により直接的に誘導されること、その系が最小培地中でリンゴ酸を炭素源として枯草菌が生育するために必須であることを、遺伝学的・生化学的に明らかにした。

次に、センサー遺伝子 *yufL* の破壊株が、リンゴ酸を炭素源として生育できるという意外な結果に着目し、その原因を解析した。その結果、*yufL* 破壊株では、YufM 制御蛋白質が恒常的に活性化されていること、YufL センサーの細胞内ドメインを発現させると、その活性化が抑制されることを明らかにした。この結果は、YufM は YufL 以外のセンサーキナーゼにより非特異的にリン酸化されること、リンゴ酸非存在下では、YufL の脱リン酸化活性が YufM の非特異的活性化を抑制していることを示唆しており、2成分制御系の情報伝達機構について、新たな知見を与えるものである。

さらに、申請者は情報伝達に以上が生ずる *yufL* 変異の単離を試み、18種の点突然変異株の取得に成功した。興味深いことに、それらの変異部位は遺伝子全長に分布しており、変異形質も様々であった。さらに、細胞膜外ドメインに変異の入った7株について、生化学的に解析し、4株はリンゴ酸と結合できないこと、3株は野性株と同様の結合能を持つが、YufM の活性化が起こらないことを明らかにした。また、YufL の細胞膜外領域はリンゴ酸との結合により構造変化を起こし、その構造変化をシグナルとして伝達すると考えられることも見出した。また、脱リン酸化活性が低下すると考えられる変異株では恒常的な YufM の活性化が起こり、リン酸化活性に必須な ATP 結合能が低下すると考えられる変異株では YufM 活性化が低下することも見出した。この結果は、上述の YufL センサーの働きに関するモデルを支持するものである。

以上のように、本論分は細菌における2成分制御系の機能及び情報伝達機構に新たな知見を与えるものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。