

論文内容の要旨

申請者氏名 GIYANTO

2成分制御系は生育環境の変動に適応するためのシグナル伝達機構として、細菌において重要な機能を担っている。それは、様々なシグナルを認識し、多くの場合、遺伝子発現の制御を行っているという知見が数多く蓄積している。しかしながら、細菌のゲノム配列決定に伴い、機能未知の2成分制御系遺伝子が多数同定されてきており、その機能の全貌は未だ不明である。本論文では、そうした、ゲノム配列決定によって見出された、機能未知の2成分制御系遺伝子 *ytsAB*, *yvcPQ* 及び *yxdJK* 遺伝子の機能解析を行った。解析を行った2成分制御系遺伝子の産物のアミノ酸配列は高い相同性を持ち、遺伝子重複の結果生じたと考えられる。また、ABC トランスポーターをコードする *ytsCD*, *yvcRS* 及び *yxdLM* 遺伝子と、それぞれオペロンを形成すると考えられ、また、これらのABC トランスポーター遺伝子の配列も相同性が高い。

まず、2成分制御系のレスポンスレギュレータを枯草菌細胞内で人為的に発現させることにより、各レギュレーターはオペロンを形成しているトランスポーター遺伝子の発現を誘導することを見出した。さらに、そのプロモーター配列の欠失実験及び精製蛋白質を用いた、DNaseI フットプリンティング実験により、各レギュレーターがトランスポーター遺伝子のプロモーター領域に直接結合することを証明すると共に、その結合配列を明らかにした。

次に、これらの2成分制御系及びトランスポーター遺伝子の機能について、枯草菌の近縁菌のある種のもので産生する抗生物質である bacitracin への感受性が、*ytsABCD* 遺伝子、各々の欠失により増加することを見出した。そして、培地への bacitracin の添加により、YtsAB 2成分制御系に依存して、YtsCD トランスポーターの発現が誘導されることを明らかにした。この結果は、YtsAB が bacitracin を感知し、その排出ポンプである YtsCD を発現させることを示している。枯草菌の bacitracin 耐性に関与する遺伝子として、ECF シグマ因子、 σX 、に依存して発現する YwoA が同定されていたが、申請者らが新たに見出した YtsABCD は、それと独立して機能することも明らかにした。

YtsABCD オペロンに関する知見は、他のオペロンも抗生物質耐性に関与していることを強く示唆する。そこで、申請者は、グラム陽性細菌が生産する種々の抗生物質について、各トランスポーター遺伝子の発現を誘導するか検定を行った。その結果、enduracidine が、YvcPQ に依存して YvcRS の発現を誘導することを見出した。しかしながら、*yvcPQRS* 遺伝子の破壊は枯草菌の enduracidine 耐性度を変化させなかった。そこで、ECF シグマ因子遺伝子の破壊株について enduracidine 耐性度を調べた結果、 σI 遺伝子の制御下に枯草菌の enduracidine 耐性に関与する遺伝子があることを見出した。

以上の結果より、細胞壁合成を阻害する抗生物質に対して、枯草菌は2成分制御系とそれによって制御される排出系と、その特異的な機能は現在不明であるが、ECF シグマ因子を介した抵抗システムという、複数のシステムを有していることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 GIYANTO

生物では細胞内外のストレスに対応するための、遺伝子セットとその制御システムを備えている。細菌では、そうしたシステムとして、2成分制御系が重要な役割を果たしていると考えられている。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。申請者らは、機能未知の2成分制御系遺伝子の機能解明を目指して、各々ABCトランスポーター遺伝子とオペロンを形成しており、また、その配列の相同性から、遺伝子重複の結果形成されたと考えられる、3組のオペロン、*ytsABCD*, *yvcPQRS* 及び *yxdJKLM*、の研究に取り組んだ。

その結果、申請者は、各レギュレーターがオペロンを形成しているトランスポーター遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、その発現を誘導することを、まず、明らかにした。さらに、YtsAB 2成分制御系は、細胞壁の合成阻害剤である bacitracin を感知し、YtsCD はその排出ポンプとして働くと考えられることを明らかにした。このことを手がかりとして、種々の抗生物質のトランスポーター遺伝子の発現誘導能を調べた結果、YvcPQ は、これも細胞壁阻害剤である enduracidine に反応することを見出した。枯草菌の Bacitracin 耐性には、ECF シグマ因子、 σX 、に制御される YwoA も関与する。同様に enduracidine に対する耐性には、 σI が重要な役割を果たすことも見出した。

申請者が得た結果は、細菌の環境適応システムについて、重要な新たな知見を与えている。まず、2成分制御系とそれに制御され薬剤排出ポンプの存在は、抗生物質産生菌の自己防御システムとして知られていたが、抗生物質非産生菌でも、同様なシステムが存在することを始めて明らかにした。興味深いことに、その構造は、生産菌のものとは異なっていた。また、同様な2成分制御系とABCトランスポーターのオペロンは、抗生物質を生産しない低GCグラム陽性細菌のゲノムにも広く分布しており、抗生物質産生菌と非産生菌の環境中での拮抗に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、申請者は、細胞壁の合成を阻害する抗生物質は ECF シグマ因子も活性化すること、そして、それは2成分制御系とは独立して機能していることも明らかにした。このことは、枯草菌では、少なくとも細胞壁合成阻害というストレスには、それに対応するための複数のシステムを備えていることを明確にした。こうした事実は今まで明確に示されておらず、細菌のストレス適応システムを考えると、重要な、新たなコンセプトを提示したと評価できる。

以上のように、本論文は枯草菌、さらに、細菌における環境ストレスに対する対応システムの研究に新たな展開をもたらし、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。