

論文内容の要旨

申請者氏名 桑名 利津子

枯草菌の孢子（スポア）形成は逐次的・空間的に制御された遺伝子発現と非可逆的な形態変化を伴うことから、原核生物における細胞分化のモデルとされている。本研究では、スポアを構成するタンパク質の同定とスポアコートの形成機構を明らかにすることを目的とした。

まず、枯草菌の成熟スポアに含まれるタンパク質を、SDS とメルカプトエタノール存在下で抽出し、SDS-PAGE により分離した後、LC-MS/MS を用いた解析を行った。その結果、85 種類の機能未知タンパク質を含む、総計 186 種類のタンパク質を同定した。さらに、DNA マイクロアレーを用いたトランスクリプトーム解析により、スポア形成期に発現すると推定された機能未知遺伝子も加え、663 機能未知タンパク質について、コードする遺伝子の発現プロファイルを LacZ アッセイにより検討し、175 種類の遺伝子がスポア形成期特異的に発現することを新たに明らかにした。こうして同定した、スポア形成期特異的に発現する新たな遺伝子の破壊株について、スポアタンパク質の組成を解析し、*yjcC*, *yibO* 遺伝子がスポア形成に重要な役割を果たすことを見出した。

YibO は Myb ファミリーに属する HTH 型 DNA 結合のチーフを持つタンパク質である。*YibO* のパラログ *RsfA* は *SigF* に依存して発現し、プレスポア内で転写因子として機能すると報告されている。*yibO* 遺伝変異株スポアはリゾチームに対して感受性であり、透過型電子顕微鏡観察によりスポアコートのほとんどが失われていた。スポアコートタンパク質は、*SigE* と転写因子 *SpoIIID* により発現する初期タンパク質、*SigK* 依存の中期タンパク質、*SigK* と転写因子 *GerE* に依存する後期コートタンパク質に分類されるが、*yibO* 遺伝子変異は後期コートタンパク質遺伝子 *cgeA*, *cotG*, *cotY* の転写を著しく抑制した。そして興味深いことに、*YibO*-GFP は DAPI 染色した染色体 DNA と重なった位置に、複数のスポットとして観察された。また *yibO* 変異により、母細胞における染色体 DNA の構造に異常が認められた。これらの結果は、*YibO* は染色体 DNA の高次構造を変化させることにより、母細胞における *SigK* 依存の遺伝子発現を制御している可能性が示唆している。

yjcC 遺伝子変異株スポアもリゾチームに対して感受性であり、スポアコートのほとんどが失われていたことから、*yjcC* を *spoVIF* 遺伝子と改名した。GFP 融合コートタンパク質を用いた解析で、*spoVIF* 変異により中後期コートタンパク質のコートへの局在に異常が認められた。しかし、ウェスタン解析及びノーザンブロッティング解析では、中期タンパク質の転写量及びタンパク質の量には変化がなかった。一方、*GerE* の発現には異常が認められないにもかかわらず、後期コートタンパク質の発現は転写レベルで抑制されていた。これらのことから、*GerE* の活性を抑制する阻害因子が存在し、それが *SpoVIF* に依存してコートに組込まれることより *GerE* の機能抑制が解除され、後期コートタンパク質が発現し始めることが示唆された。すなわち、*SpoVIF* は中期コートタンパク質のアセンブリーをモニターし、後期コートタンパク質を適切なタイミングで発現させる役割も持つと考えられる。このような機能は、既知のアセンブリー因子や転写因子と異なる、チューニングファクターとも呼べるものである。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 桑名 利津子

枯草菌の内在性孢子（スポア）は、4種の孢子形成シグマ因子の逐次的な活性化を骨格として、数百の遺伝子が、時間的・空間的に制御されて、発現することにより形成される。このプロセスは、細胞分化のモデルシステムとして、古くから研究されているが、その全貌は不明である。申請者は、スポアを構成するタンパク質の同定とスポアコートの形成機構を明らかにすることを目的として研究を行い、以下の知見を得た。

- 1) 今までに、119 遺伝子がスポア形成期に特異的に発現することが報告されている。プロテオーム解析、DNA マイクロアレー解析により、孢子形成期に発現することが示唆された遺伝子のうち、実験的に解析されていなかった 663 遺伝子について、独自に考案したハイスループットなレポーターアッセイ法を適用し、新たに 175 遺伝子がスポア形成期に特異的に発現することを明らかにした。
- 2) 新たに同定した 175 遺伝子の破壊株について、スポアタンパク質の組成を解析し、*yjcC* (*spoVIF*)、*yibO* の破壊により、スポアタンパク質の組成が大きく変化し、それらが正常なスポア形成に必須であることを明らかにした。
- 3) *yibO* 遺伝子破壊株では染色体の分布に異常が生じており、後期スポアコートタンパク質の転写が抑制されること、また、その GFP 融合タンパク質は DAPI 染色した染色体 DNA と重なった位置に複数のスポットとして観察されたことから、YibO は染色体の高次構造の形成を制御する、新しい種類の制御因子であることを示唆する結果を得た。
- 4) スポア形成に関与するシグマ因子はまず不活性型として生産され、孢子形成がある一定の段階に達すると活性型に変換される。*spoVIF* 遺伝子破壊株では、中期コートタンパク質の発現は転写レベル、翻訳レベルでは異常が生じていないにも関わらず、コートへの局在が異常となり、その結果、転写因子 GerE が発現しているにも関わらず、後期コートタンパク質の転写が抑制された。このことは、GerE についても不活性型から活性型への転換によるチェックポイントシステムが存在し、それは SpoVIF の活性に依存していることが示唆された。

以上のように、本論文は枯草菌スポア（孢子）の形成機構に新たな知見を与えるもので、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。