

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成9年度博士過程 進学

氏名 芳賀 恒基

指導教官 高橋 秀夫

論文題目 ゲノム情報を用いた枯草菌ストレス応答機構の解析

枯草菌その他のバクテリアは熱・酸化ストレス・栄養飢餓・pH変化・浸透圧変化など、環境中の様々なストレスに迅速に応答して細胞を守る機構を発達させており、その制御は非常に多くの因子が複雑に関与しあって成り立っている。枯草菌のストレス応答機構の研究は、ゲノム生物学の発達及び枯草菌におけるゲノムプロジェクトの進行によって、近年急速な進展を見ているが、個々の遺伝子の機能については大腸菌などにくらべて未だ不明な点が多く残されている。例えば、大腸菌においてよく研究が進められている Hsp70 及び 40 のホモログである DnaK 及び DnaJ、Hsp60 ホモログ GroE 等について、発現制御に関する研究は行われているものの、遺伝子産物の特異的機能については、枯草菌においてはほとんど知られていない。

本研究では、枯草菌におけるストレス応答の分子機序の解明を目的とし、そのために当研究室が参加したゲノム解析計画の結果として得られるゲノム情報およびゲノム解析手法を用いることにした。したがってまず日欧共同プロジェクトの一環として行われた枯草菌ゲノム配列決定と遺伝子破壊株コレクション作製について述べる。そしてこれらの過程で得られた全ゲノム情報を用いて、

熱ショック遺伝子 *dnaK* 及び *dnaJ* 産物と相互作用する遺伝子産物を検索する目的で酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、同定された相互作用の細胞機能における意味を調べる実験を行った。

1、全ゲノム塩基配列決定と遺伝子破壊株コレクション作製

日欧共同プロジェクトとして進行している枯草菌ゲノム解析プロジェクトの初期段階として、ゲノム配列決定と遺伝子破壊株作製に参加した。まず染色体 360 度マップ上の約 19°-23° に存在する、連続した 45kb の領域の塩基配列を決定した。次に決定配列上に存在するコーディング領域をコンピュータ上で予測し、それらの産物のアミノ酸配列を、データベースに登録されている他の生物の遺伝子産物と比較することによって、その機能を推定した。その結果、申請者が解析を行った領域からは、数多くの膜輸送タンパク質、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の薬剤耐性関連遺伝子や、真核生物の間で広く保存されている、がん関連遺伝子 (ECA39) などをはじめ、他の生物の遺伝子産物と類似する遺伝子が多数見出された。

次に、配列決定を行った領域とその上流 100kb を合わせた約 150kb の領域 (当研究室の配列決定領域の全体) 上に存在する機能未知遺伝子 43 個と EU の研究グループの担当領域から選択された 48 個、合計 91 個の遺伝子の破壊株を、相同組換え現象を利用した遺伝子分断操作によって作製した。さらに前者 43 個について、発現時期測定などの解析を行った結果、少なくとも 4 個の遺伝子が生育に必須であることが分かり、また 7 個が対数増殖期特異的な発現を示し、7 個が定常期への移行期に特異的な発現を示し、3 個が定常期特異的な発現を示した。

これらの結果は、全遺伝子の発現パターン解析として進行中である他の研究グループの結果と合わせて、トランスクリプトーム解析の結果と共に順次データベース上で公開している。ゲノム情報解析から、70 にのぼる遺伝子が分子シャペロン及びストレス関連遺伝子であると推測され、その多くが機能未知である。

2、酵母 two-hybrid スクリーニングによる、DnaK/J 分子シャペロンと相互作用する遺伝子産物の探索

熱ショックタンパク質の中でもよく研究が進んでいる DnaK/J (Hsp70/40) シャペロンマシンの枯草菌における特異的機能を調べる手掛かりを得るため、これらの分子シャペロンと相互作用するタンパク質を酵母 two-hybrid system を用いて、フランス INRA 研究所の持つ枯草菌ゲノムライブラリーからスクリーニングを行った。5.4x10⁷ のクローンをスクリーニングした結果、DnaJ との相互作用のスクリーニングから DnaJ 自身の部分タンパク質をコードする 5 種類のクローンを単離した。これらクローンのアラインメントから、DnaJ タンパクのホモ多量体形成は C 末端領域を介していることが強く示唆された。

さらにこれらの *dnaJ* クローンを、いくつかのストレス関連タンパク質との組み合わせで酵母 two-hybrid 検定したところ、ストレスシグマ因子 SigB との弱い相互作用が検出された。SigB と相互作用した DnaJ 部分断片のアラインメントから、相互作用部位は N 末端近くの Gly/Phe-rich 領域であることが示唆された。

また、大腸菌における DnaK-DnaJ 間の相互作用は良く知られているにも関わらず two-hybrid system では検出されないことが見い出されているが、枯草菌においては検出することが出来た。

3、SigB 依存的 (class II) ストレス応答における DnaK/J 分子シャペロンの役割

枯草菌のストレス応答レギュロンは、その発現制御メカニズムによって現在 4 つのクラスに分類されている。

Class I：主要シグマ因子 SigA によって転写され、リプレッサー HrcA の活性によって転写調節されるもの。*dnaK* オペロン・*groESL* オペロンの 2 つのみがこれに属する。熱ショックによって誘導される。

Class II：ストレスシグマ因子 SigB の活性によって転写調節されるもの。枯草菌が持つ大部分のストレス関連遺伝子はこのレギュロンに属する。熱ショック・栄養飢餓ストレス・酸ストレス・浸透圧ショック・エタノールストレスなど、様々なストレスによって誘導される。

Class III：リプレッサー CtsR の活性によって転写調節されるもの。ATP 依

存性プロテアーゼ ClpC、ClpE、ClpX、ClpP、LonA などがこれに属する。熱ショックその他のストレスによって誘導される。

Class IV：上記の他、制御メカニズムが不明なもの、Hsp90 ホモログ HtpG などがこれに含まれる。

この中で、*dnaK/J* (class I) と *sigB* (class II) はそれぞれ異なるレギュロンを構成しており、それらは独立していると今まで考えられてきたが、前項の結果によって、この 2 つのクラスのストレス応答機構のネットワークの間に関連性のあることが示唆された。そこで、SigB 依存的ストレス応答における DnaK/J 分子シャペロンの関与を調べるために、ストレスによる *sigB* レギュロンの発現誘導への DnaK または DnaJ 欠損の影響を解析した。*sigB* promoter-*lacZ* レポーター融合遺伝子を用いたβ-ガラクトシダーゼアッセイを行った結果、それぞれ別の経路から SigB レギュロンを誘導すると考えられている 2 種類のストレス、すなわちエタノールストレス及び栄養飢餓ストレスのどちらの場合においても、SigB の活性化に DnaK 及び DnaJ が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

考察

sigB の転写活性調節は、通常状態でアンチシグマ因子 RsbW と結合している SigB を、ストレスシグナルによって活性化されたアンチ・アンチシグマ RsbV が解離して転写を誘導するメカニズムとして知られている。RsbV の活性化は、飢餓ストレスの場合は YvfP、その他のストレスでは RsbU の、いずれかのフォスファターゼによる脱リン酸によることから、ストレスを感知する経路はこの 2 つのフォスファターゼを介していると現在は考えられている。

本研究の結果は、このような SigB 活性の調節機構の中で、DnaK/J シャペロンシステムが SigB/RsbW/RsbV の間の結合・解離の仲介、あるいは SigB との直接的な相互作用による、新規の調節経路を構成していることを示唆する。

DnaK/J との相互作用によるシグマ因子の活性調節の例は、大腸菌において、非ストレス条件下で DnaK/J が sigma 32 に結合して不安定化させるメカニズムが良く知られているが、本研究により示した、枯草菌における DnaK/J と SigB との相互作用は、明らかにこれとは異なった調節機構であると考えられる。