

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤 島 博 史

本論文は、大腸菌の細胞分裂についての遺伝学的研究に関するもので二章及び総合討論からなる。

大腸菌の膜構造の変化と分裂装置蛋白群の機能的相関や、分裂装置蛋白質の膜への局在過程について、二つの遺伝子の解析することにより大腸菌細胞分裂の研究を行った。

第一章では、「広田の温度感受性変異体バンク」のうちの、41℃で細胞分裂が阻害されて多核フィラメントを形成する変異株430系統(fts)からリポ多糖の合成に関与する遺伝子、kdsAの変異株を単離し、膜の安定性と細胞分裂の共役のメカニズムを解析した結果について述べている。リポ多糖の合成に関与する遺伝子kdsAは3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)の前駆体であるKDO-8-リン酸の合成酵素をコードする。大腸菌においてはkdsA遺伝子の変異株が単離されたのは本研究が始めてのことである。このため、実際にKDOの合成量についてfts830変異株を用いて親株と比較検討している。fts830変異株では親株と比較してKDO合成量が低下していた。

一方リポ多糖は、リピドAと少糖鎖からなり、KDOは両者のリンカー部位を構成する。またリポ多糖は、外膜総重量の30%も占めている。従って、KDO合成が欠損するとリポ多糖が外膜から欠失するため、膜構造は非常に不安定になると予想し、外膜の安定性について各種疎水性薬剤を用いて解析した。その結果、ノボピオシン、SDS、エオシンYなどには感受性を示したがメチレンブルーに対しては逆に生育が回復することが判明した。リポ多糖の欠失は細胞外環境からのシグナル伝達に影響を与えているものと考えられる。

また、リポ多糖合成系の変異株では細胞増殖が阻害されることから、kdsA変異株の細胞分裂阻害が生じる原因について解析した。リピドAをペリプラズムに輸送するABCトランスポーターであるMsbAを過剰発現させるとkdsA変異株の細胞分裂欠損が回復した。さらに、リピドAの蓄積が生じないlpxA変異株においても細胞分裂の欠損が確認された。従ってリピドAの蓄積により細胞分裂の欠損が生じるのではなく、リポ多糖が外膜から欠失するために分裂が阻害されると考えられる。

kdsA変異株は細胞分裂の初期の過程で停止していると予想してFtsZに着目し、FtsZ蛋白量をウェスタンブロッティング法により測定したが、親株の場合と変わりなく合成されていた。また、間接蛍光抗体法を用いてFtsZの局在を観察したところ、41℃で培養した変異株では、FtsZはフィラメント細胞の多数の予定分裂部位のいずれにも殆ど検出されなかった。細胞分裂後期で機能する

FtsI の変異株では、全ての予定分裂部位に FtsZ が検出された。この結果は、外膜の安定性が細胞分裂装置構築過程に重要であることを示しており、外膜が不安定になることで、FtsZ の局在に必要な因子の転写が影響を受けていることが考えられる。

第二章では、大腸菌 *ftsX* 遺伝子破壊株を作製し、細胞分裂と、マルチスパン型  $K^+$ -ポンプ蛋白の膜局在に与える影響についての解析結果について述べている。*ftsX* 破壊株、 $\Delta ftsX::cat/P_{ara}(ftsX^+)$  はアラビノースを含む培地で培養すると正常に増殖するが、グルコースに置き換えると、FtsX の発現が抑制され、約 2 時間で培養液の濁度の増加が低下し始めた。この時、細胞分裂も停止し、*ftsE(ts)* 変異株と類似のフィラメント細胞となった。また、*ftsX* 破壊株において FtsZ リング形成について観察したところ、ほとんどのフィラメント細胞では FtsZ リングが形成されておらず細胞分裂装置蛋白質の膜局在に影響していることが考えられる。

FtsX が FtsE と同様にマルチスパン型の  $K^+$ -ポンプ蛋白の膜局在に関与しているかどうか検討するために、*ftsX* 破壊株をさらに形質転換した株  $\Delta ftsX::cat/P_{ara}(ftsX^+)P_{tac}(kdpA\text{-}phoA \text{ or } kdpD\text{-}phoA)$  を作製した。IPTG 存在下でグルコース培地で培養した後、膜画分を回収し、抗 PhoA 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、FtsX が減少すると、*ftsE(ts)* 株の場合と同様に、KdpA は膜画分から減少するが、KdpD は変化なく存在することがわかった。以上の結果から、*ftsX* は *ftsE* と共にマルチスパン型の蛋白の膜局在に関与していることが示唆された。

以上、本論文は大腸菌細胞分裂に関して分裂装置の構築過程という今まで研究例の少ない視点から解析した結果をまとめたものであり、細胞分裂機構を解明する上で、学術上寄与する部分が少なくない。

よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値のあるものであると認めた。