

## 論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成9年度博士課程 進学  
氏名 清水 久代  
指導教官名 徳田 元

論文題目 蛋白質膜透過反応の欠陥が遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析

### 序

蛋白質が遺伝情報に基づいて発現されるためには、転写・翻訳の過程を経て合成されたポリペプチドが機能するための場所に局在し正しい高次構造を取らなければならない。大腸菌の蛋白質は通常細胞質で合成されるが、大腸菌のゲノムにコードされている蛋白質のうち、30%以上が内膜、ペリプラズム、外膜などに局在する。蛋白質膜透過および蛋白質の膜挿入といった細胞表層のバイオジェネシスにおける欠陥は細胞にとって強いストレスであり、蛋白質膜透過反応が完全に阻害されると細胞は致死となる。蛋白質膜透過反応の不全により細胞が受ける影響については、SecMによるSecAの翻訳調節が明らかになっているが、細胞全体がどのような影響を受けるかはほとんど解析されていない。

本研究は分泌蛋白質膜透過不全が遺伝子発現に与える影響を詳細に解析することを目的として行った。

### 方法

secG遺伝子破壊による細胞への影響を調べるため、KTY培地を用いてベクターを導入したsecG遺伝子破壊株KN553と野生型株K003を20°Cまたは37°Cで培養し、全RNAを調製した。得られた全RNAを鋳型に蛍光標識したcDNAを合成し、大腸菌マイクロアレイにハイブリダイズさせた。発現率に特徴の見られた遺伝子について免疫ブロッティングによる解析を行った。リン脂質組成は、20°Cで4時間培養した菌体をクロロホルム抽出し、TLCで展

開し発色させた。GnsAの過剰発現によるsecG遺伝子破壊株の影響を調べるため、KN553株に*gnsA*を20°Cまたは37°Cで3時間過剰発現させて培養して全RNAを抽出し、マイクロアレイ実験を行った。高浸透圧培養は、標準KTY培地に終濃度0 Mから0.8 MのNaClを添加した培地を用い、低浸透圧培養は標準KTY培地に含まれるカリウム-リン酸緩衝液の濃度を1倍、1/10倍、0倍にした培地をそれぞれ用いて生育曲線を描いた。

## 結果

### 1. secG遺伝子破壊による細胞への影響の網羅的解析

secG遺伝子破壊による細胞への影響を調べるため、secG遺伝子破壊株KN553の遺伝子発現を野生型株K003株を対照にマイクロアレイで網羅的に解析した。蛋白質膜透過反応が不全となり前駆体蛋白質が蓄積する20°Cでは132遺伝子の誘導が見られた。蛋白質膜透過反応が阻害されているにもかかわらず、リボゾームサブユニット蛋白質など蛋白質合成系に関与する遺伝子群に大きな誘導が見られた。また、リボゾームサブユニット蛋白質とオペロンを形成するsecY遺伝子を除き、Sec装置構成因子には顕著な誘導は見られなかった。secG遺伝子破壊による膜透過不全を回復させるマルチコピーサプレッサーとしてリン脂質合成系に関与する*pgsA*と*gpsA*が報告されているが、これらは顕著な誘導は見られなかった。しかし、リン脂質合成の前駆物質であるグリセロール三リン酸を合成する経路の遺伝子群に誘導が見られた。また、膜脂質の脂肪酸の不飽和度はsecG遺伝子破壊による膜透過反応の回復に関与すると考えられているが、脂肪酸合成系の遺伝子群にも誘導が見られた。しかし、不飽和脂肪酸の合成に特化した誘導でなかった。secG以外のsec温度感受性変異のマルチコピーサプレッサーとして報告されている分子シャペロンDnaK、GroEL/ESの遺伝子発現に誘導が見られたが、これらは蛋白質レベルでは明らかな誘導は見られなかった。TCA回路は膜透過反応に必須であるATPと膜透過反応を促進するプロトン駆動力を供給するが、TCA回路の遺伝子群に大きな誘導が見られた。これらの一連の遺伝子発現の変化は、膜透過反応に大きな障害がみられない37°Cにおいても、発現率は低くなるが同様の傾向が認められた。また、SigmaSに関連する一連の遺伝子に誘導が見られた。しかし、SigmaSをコードする*rpoS*遺伝子には誘導は見られなかった。SigmaS蛋白質のレベルをイムノブロットティングで確認したところ、20°CにおいてsecG遺伝子破壊株では野生型株に対して7倍程度の蓄積が認められた。37°CにおいてはSigmaS蛋白質のレベルに差は見られなかった。

### 2. 蛋白質膜透過反応と脂質合成系遺伝子の発現の影響

secG遺伝子破壊株の低温における膜透過不全に対する脂質合成系遺伝子の関与について調べた。*gpsA*はすべてのリン脂質の前駆体であるグリセロール三リン酸を合成し、過剰発現によりsecG遺伝子破壊株の生育および膜透過反応の低温感受性が回復する。*gpsA*の過剰発現の膜脂質への影響を調べるためリン脂質組成を調べた。secG遺伝子破壊株KN370において細胞中のGpsA活性はアラビノースプロモータの誘導により数百倍に上昇するが、

膜のリン脂質組成に大きな変動は見られなかった。細胞内のグリセロール三リン酸の合成は複雑な経路で厳密に制御されており、リン脂質組成はGnsAの過剰発現により大きな変動は見られなかったが、リン脂質の代謝速度等に影響を受けていた可能性が考えられる。

また、*gnsA*は過剰発現により膜リン脂質のアシル基の不飽和度を上昇させ、酸性リン脂質の割合を増加させることが明らかになっているが、その詳しい作用機構は不明である。GnsAの機能について詳しく調べるため、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。*secG*遺伝子破壊株KN553にpSRAを導入し、アラビノースの誘導により*gnsA*を過剰発現させた株の遺伝子発現の変化をKN553にベクターを導入した株を対照として調べた。*gnsA*を20°Cにおいて180分誘導したところ、172遺伝子に誘導が見られた。一方、37°C180分間の条件では14遺伝子しか誘導が見られず、GnsAは低温でのみ大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。また*gnsA*を過剰発現させた株ではトレハロース合成遺伝子やグリシンベタイン-プロリン輸送系遺伝子など、高浸透圧応答に関与する遺伝子が多数誘導されていた。高浸透圧応答はSigmaSの支配を受けるが、*rpoS*遺伝子そのものに強い誘導は見られず、SigmaSの制御や代謝回転に関わる遺伝子に誘導が見られた。SigmaSの蛋白質レベルを調べたところ、蛋白質膜透過反応が回復しているにも関わらず3倍以上の誘導が見られた。また、高浸透圧応答の遺伝子が多数誘導されているにも関わらず、低浸透圧応答に関与する機械刺激感受性チャンネル*mscL*、*yggB*の遺伝子にも誘導が見られた。GnsAの過剰発現により浸透圧ストレスに対する耐性の変化を確かめるため、20°CでKTY培地に塩を添加し浸透圧を高めた培地とリン酸塩を減少させて浸透圧を低めた培地の両方で培養を行い、生育速度を比較した。その結果、GnsAの過剰発現により高浸透圧と低浸透圧のどちらの培地でも生育速度は減少していた。GnsAは細胞膜組成に影響を与え、その結果膜の機械的性質が大きく変化して浸透圧等の物理的ストレスへの耐性が低下したと考えられる。また、GnsAを過剰発現させた株ではペプチドグリカン合成系遺伝子の抑制も検出された。GnsAの過剰発現はこれら細胞表層の生合成全体に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

## 考察

*secG*遺伝子破壊により多数の遺伝子に誘導がみられ、特に蛋白質合成系の誘導が著しかった。またリン脂質前駆体を合成する遺伝子群、脂肪酸合成遺伝子群など膜脂質合成に関与する一連の遺伝子の誘導が見られた。また膜透過反応に必須であるATPと膜透過反応の効率を大きく上昇させるプロトン駆動力を形成するTCA回路の一連の遺伝子が大きく誘導されていた。また、これらの遺伝子と同時にSigmaSに誘導される遺伝子やSigmaSの代謝に関わる因子も誘導されていた。低温下においてSigmaS蛋白質は*secG*遺伝子破壊株では野生株に比べ7倍程度誘導されていた。SigmaSは異種蛋白質の過剰発現により誘導されるという報告があるが、蛋白質膜透過反応が阻害された株においても前駆体蛋白質の蓄積がこれに近い影響を与えている可能性が考えられる。

いくつかの脂質合成系遺伝子の誘導により *secG* 遺伝子破壊株の膜透過反応が回復することが知られているが、*gpsA* を過剰発現させても、細胞質 GpsA 活性は大きく上昇するにも関わらず膜リン脂質の組成に大きな変化は見られなかった。また、GnsA を過剰発現させると膜の不飽和脂肪酸の割合が増加し酸性リン脂質の割合が上昇することが知られているが、同時に浸透圧など機械的なストレスに弱くなり、圧カストレス応答遺伝子群が誘導されていることが明らかになった。膜の性質の大幅な変化は膜透過反応を促進させる一方で、細胞に非常に高い負荷を与えていると考えられる。GpsA の過剰発現では膜脂質組成に大きな変動は見られなかったが、膜透過反応は回復する。膜透過反応はリン脂質組成のごく軽微な変動で回復する可能性が考えられ、*secG* 遺伝子破壊株の膜透過反応を回復させるのに必要な膜脂質組成の変動の程度を考える上で興味深い。