

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 13 年度博士課程進学  
氏名 古賀恵子  
指導教官 田中寛

### 論文題目

大腸菌増殖定常期の開始機構に関する研究

#### 1、はじめに

大腸菌は枯草菌のような耐久胞子を形成しないが、外界栄養源の枯渇に伴い、増殖を停止し、DNA や蛋白質、膜などの細胞構成要素を守るために、様々なストレスに耐性の定常期細胞へと分化する。本研究では、増殖細胞が栄養飢餓応答等を経て耐久細胞へと分化する過程(相転移)について、モデル微生物である大腸菌を用いて解析を行った。

大腸菌増殖相転移の研究は、定常期特異的なシグマ因子 RpoS の活性化機構を中心に解析されてきた。そして、このプロセスには ppGpp や H-NS、cAMP などの関与が報告されているが、未だ完全に解明されたとは言えない。また、RpoS を欠損した大腸菌でも増殖相の転移は起こることから、相転移を制御するシステムにはこれまで未知の分子機構が多く存在するに違いない。本研究は、遺伝学的解析の結果、RpoS や ppGpp とは無関係に相転移期に起こることが分かっている現象を解析することにより得られた、大腸菌相転移に関する新しい知見を報告する。

## 2、ADLA の発見とその実体

当研究室では大腸菌相転移期における遺伝子発現についての解析を *Vibrio fischeri* ルシフェラーゼを用いて行ってきた。その過程で、コンセンサス型プロモーター *lacUV5* とルシフェラーゼの融合遺伝子 (*PlacUV5-lux*) に由来するルシフェラーゼ活性 (Lux 活性) が、栄養増殖期から増殖定常期への相転移のある時点から急激に低下することを見出した。この現象は、LB 培地や最少培地など培養条件によらず、相転移期において認められることから相転移期における基本的な分子機構を反映したものと考えられた。そこで、この時点を増殖相転移の基準点 ( $T_0$ ) と定義し、さらに、Lux 活性が  $T_0$  から急激に低下する現象を ADLA (abrupt-decrease of luciferase activity) と呼ぶことにした。

まず、ADLA が *PlacUV5-lux* の遺伝子発現レベルで起こっている可能性を検討するため、ルシフェラーゼ LuxB 抗体を作製し、 $T_0$  前後の蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。その結果、Lux 活性が  $T_0$  前後で約 100 分の 1 に減少するにも関わらず、蛋白質量はほとんど変化しないことを見出した。従って、ADLA はレポーターの発現レベルで起こっている現象ではない。*Vibrio fischeri* ルシフェラーゼの発光反応は、補酵素 FMNH<sub>2</sub> と、基質が酸素により酸化されるときに起こる。また、Lux 活性の測定は、細胞破碎を行うことなく培養液をサンプルとして行っているため、検出される活性は細胞内生理状態の影響を受けやすい。もし、ADLA が発光反応レベルで起こっているとするならば、リミットとなりうる要素は、酸素、ルシフェラーゼ自体の酵素活性、細胞内 FMNH<sub>2</sub> 濃度、基質濃度、の4つが考えられる。そこで、まず、過剰量の基質添加実験を行ったところ、基質添加の有無に関わらず、ADLA は認められた。つまり、基質が ADLA のリミットになっているのではない。次に、細胞破碎したサンプルの活性を、発光に必要な基質を過剰添加した状態で測定したところ、 $T_0$  前後で同レベルの活性が認められた。つまり、ルシフェラーゼの酵素活性が  $T_0$  で急激に低下する訳ではない。さらに、レポーター遺伝子に、FMNH<sub>2</sub> の代わりに ATP を必要とするホタルルシフェラーゼを用いたところ、ADLA は認められなかった。以上のことから、ADLA のリミットは、酸素、基質、酵素活性ではなく、FMNH<sub>2</sub> であることが分かった。

## 3、ADLA に関する因子のターゲット・スクリーニング

FMNH<sub>2</sub> の細胞内レベルは、酸化型 FMN が NAD(P)H から電子を受け取って還元される段階で規定されると予想される。その場合、ADLA の原因は、細胞内の NAD(P)H 濃度の低下である可能性が高く、その制御機構は相転移期におけるエネルギー代謝の切り換えシステムであると考えられる。大腸菌は実際の環境に最も効率的な代謝システムを選択することが知られており、その調節機構は ArcAB 二成分制御系と転写因子 FNR が主に司っている。このことから、これら因子の変異株を用いて解析を行ったところ、FNR、ArcAB は ADLA に関与しないことが分かった。

さらなる解析の結果、バクテリア型核様体蛋白質 *hns* と *hupA*、*himA* の変異株において、ADLA が

認められなくなることが分かった。核様態蛋白質は染色体のコンパクト化機能を有するだけでなく、複製・転写・組み換え等の染色体プロセスにグローバルに関わることが知られている。現在のところ、これらの蛋白質が何らかの遺伝子発現を介して ADLA に影響を与えていると考えている。

#### 4、 ADLA に関する因子のランダム・スクリーニング

バクテリア型核様体蛋白質はその生理作用が多面的であるため、それらの ADLA への作用を特定することは困難と考えられた。そこで、ADLA に関する新規因子の同定をトランスポゾン・ミュタジェネシスにより試みた。本研究を進める過程で、硝酸還元酵素 *narGHI* オペロンのプロモーター活性が、*PlacUV5-lux* の Lux 活性と逆相関的な活性を示めすことを見出した。すなわち、*PnarG-lacZ* の  $\beta$ -ガラクトシターゼ活性は  $T_0$  で活性化され、さらに、この活性化は ADLA と同様に *hns* や *himA* の変異株では認められない。そこで、*PnarG-lacZ* の活性化に影響の与える因子は ADLA にも影響を与えるのではないかと考え、*PnarG-lacZ* を指標に変異株のスクリーニングを行った。約 5000 コロニーのスクリーニングを行った結果、*PnarG-lacZ* の活性に影響のある新規変異株を 7 株選抜することに成功した。これらは、シグナル伝達に関わる因子ではなく、硫黄同化酵素、リポポリサッカライド合成酵素、ピリミジン合成酵素、重金属トランスポーターであった。

#### 5、 ADLA と亜鉛イオンの解析

次に、トランスポゾン・ミュタジェネシスにより同定された因子の中でも、亜鉛の高親和性取り込み装置の ATPase サブユニット *znuC* の変異株について解析を行った。この変異株は *PnarG-lacZ* の活性化が認められないだけでなく、野生株と比較して、増殖が遅く、ADLA も認められない。また、これらの表現型は、培地中の亜鉛濃度が低いときにのみ認められ、硫酸亜鉛を添加することにより回復した。従って、*znuC* 変異株では、低亜鉛条件下で細胞内の亜鉛が不足しているために、ADLA が起こらなくなったと考えられる。以上より、ADLA には亜鉛依存的な因子、もしくは亜鉛そのものが関与しているのではないかと考えた。

亜鉛は生体機能に必要な重金属であるが、過剰な亜鉛イオンが細胞質中にフリーで存在すると毒性を示す。また、亜鉛が様々なエネルギー代謝酵素を阻害することが報告されており、細胞内のフリーな亜鉛イオンの新たな機能が解明されつつある。もし、大腸菌相転移期において、亜鉛が直接的なシグナルであるなら、その時期に細胞内の亜鉛濃度が上昇しているはずである。そこで次の 2 つの方法を用いて細胞内の亜鉛イオン濃度の測定を行った。(1) 亜鉛のメタロセンサー ZntR は亜鉛と結合すると、亜鉛排出装置 *zntA* の転写を活性化する。このシステムを利用し、*zntA* の転写調節領域と  $\beta$ -ガラクトシターゼの転写融合遺伝子 *PzntA-lacZ* の  $\beta$ -ガラクトシターゼ活性を測定することによ

り、細胞内のフリー亜鉛濃度の相対的推移のプロファイルを行った。(2) 亜鉛との結合に依存して蛍光を発する FluoZn-AM により、細胞内の亜鉛濃度のプロファイルを行った。

その結果、どちらの測定方法においても、相転移期にフリーの亜鉛濃度が一過的に上昇することが示唆された。さらに、 $T_0$ において認められる *PzntA* プロモーター活性の一過的な上昇は、H-NS や ZnuC 破壊株では認められなかった。このことは、細胞内亜鉛の一過的な上昇と ADLA が深く関係していることを示唆している。

## 6、まとめ

本研究において、(1) 相転移期のある時点 ( $T_0$ ) から細胞内のルシフェラーゼ活性が急激に低下する現象 (ADLA) を見出した。また、(2) 生理学・生化学的解析の結果、ADLA は細胞内の  $FMNH_2$  濃度の減少が原因であることが分かった。さらに、(3) 遺伝学的解析の結果、ADLA はバクテリア型核様体蛋白質 H-NS、IHF、HU 及び亜鉛トランスポーター ZnuC の変異株において認められなくなることが分かった。一方で、(4) 細胞内の亜鉛濃度を *PzntA-lacZ* と FluoZn-AM によりプロファイルしたところ、 $T_0$  で濃度上昇することを見出し、さらに、(5) この現象は H-NS と ZnuC 変異株において認められなくなることが分かった。

以上の結果から、ADLA の起こるメカニズムは次のように考えることができる。細胞内生理状態から何らかのシグナルを感知した核様体蛋白質が遺伝子発現に影響を与えた結果、細胞内の亜鉛濃度の上昇が起きる。上昇したフリーな亜鉛イオンが解糖系や TCA サイクル等のエネルギー代謝酵素群を阻害するために細胞内の NAD(P)H 濃度が低下する。その結果、ルシフェラーゼに  $FMNH_2$  が供給されなくなり、ADLA が起こる。