

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古賀 恵子

---

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。この過程には ppGpp や H-NS、cAMP、RpoS といった因子群の関与が示唆されているが、実際の分化過程がどのような制御のもとに、どのような順序で進められるのかについては殆ど判っていない。本論文は、増殖定常期への移行過程の初期に新たに見いだされたルシフェラーゼ活性の急激な低下に注目し、分子生物学的、遺伝学的な解析を進めた結果をまとめたもので、5章からなっている。

第一章の序論では、大腸菌のバッチ培養系における増殖相の定義について議論するとともに、増殖定常期への移行に伴って起こる様々な生理学的変化について、これまでの知見をまとめている。特に RNA ポリメラーゼの転写特異性の決定因子であるシグマサブユニットについては、定常期の移行に伴う RpoD と RpoS の置換。RpoS の発現調節、活性化機構について詳しく述べている。また、栄養飢餓応答因子として重要な ppGpp、核様体構造の変換に重要な H-NS、相転移により大きな影響を受ける主要代謝系などの背景についても述べられている。

第二章では、対数増殖期から定常期への移行期に起こるルシフェラーゼ活性の急速な低下について解析を行った。発光細菌 *Vibrio fischeri* のルシフェラーゼ遺伝子 (*luxCDABE*) 遺伝子を大腸菌のコンセンサス型プロモーター (*lacUV5*) の下流に連結し、大腸菌におけるルシフェラーゼ活性の増殖相の移行に伴う変化について経時的に観察した。その結果、増殖定常期の開始に伴う一時点 ( $T_0$ ) から急速にルシフェラーゼ活性が低下する現象を見だし、これを ADLA (Abrupt Decrease of Luciferase Activity) と命名した。ルシフェラーゼ活性には酵素蛋白質以外に、基質となる長鎖アルデヒド、酸素、還元型フラビンモノヌクレオチド ( $\text{FMN}_2$ ) が必要であることから、本論文では、これら因子について  $T_0$  前後での変化について検討を進めた。その結果、1)  $T_0$  の前後でルシフェラーゼ量が変わらないこと。2) ホタルルシフェラーゼでは反応に酸素を要求するにも拘わらず ADLA が起こらないこと。3) 培地への基質アルデヒドの添加で ADLA に影響が見られないことから、ADLA の原因は急速な  $\text{FMN}_2$  の濃度低下によることを結論した。細胞内でのフラビンモノヌクレオチドの還元は、還元型ピリジヌクレオチド ( $\text{NAD(P)H}$ ) からの電子転移により起こる。このことから、細胞内の  $\text{NAD(P)H}$  濃度を実際に測定した結果、 $T_0$  後の顕著な濃度低下を観察し、 $\text{NAD(P)H}$  濃度の低下が ADLA の原因であることを強く示唆している。

第三章では、相転移期の生理的变化に重要な役割を果たす核様体蛋白質である H-NS を中心に、核様体蛋白質欠損の ADLA への影響を解析している。その結果、H-NS、IHF、HU の  $\alpha$  サブユニット遺伝子を破壊した株において、ADLA が顕著に弱まる表現形質を見いだした。

そして、これら核様体蛋白質が何らかの特異的遺伝子発現の制御を介して、ADLA に関与しているものと考察している。

第四章では、ADLA に関与する因子の同定を遺伝学的に進めている。本論文では、ADLA による急速なルシフェラーゼの低下が、硝酸還元酵素をコードする *narG* 遺伝子の発現と逆相関にあることを発見し、*narG* 遺伝子の転写活性化の低下を指標に ADLA に関与する遺伝子のスクリーニングを行った。トランスポゾンミュータジェネシスにより得られた約 5,000 株のライブラリーからスクリーニングを行った結果、数種の候補変異株を得た。これらへのトランスポゾンの挿入位置のマッピングを行った結果、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、亜鉛イオントランスポーター遺伝子への挿入が確認された。本論文ではこれら変異株のうち、亜鉛トランスポーター (*znuC*) 変異株について更に解析を進めている。*znuC* 遺伝子は、亜鉛イオンの高親和性トランスポーターの ATPase サブユニットをコードする。*znuC* 変異株では *narG* 転写活性化が起こらないと同時に ADLA が起こらなくなっており、この表現形質は培地中に高濃度の亜鉛を添加することにより相補された。従ってこの結果より、細胞への亜鉛の取り込みが実際に ADLA に関与している可能性が強く示唆された。亜鉛は生体機能に必須な重金属であるが、過剰な亜鉛イオンは様々な酵素を阻害することにより毒性を示すことが知られている。そこで本論文では、細胞内の亜鉛濃度が実際に  $T_0$  において上昇しているかどうかを調べるために、亜鉛により活性化されるプロモーター (*zntA*) の活性を指標とした解析を行った。その結果、 $T_0$  における *zntA* プロモーターの一過的な活性化が観察され、 $T_0$  における亜鉛イオン濃度の一過的上昇が示唆された。

第五章では、第二章から第四章の結果を総合し、相転移期において特異的トランスポーターによる亜鉛イオンの取り込みが起こり、これが呼吸酵素を阻害することで NAD(P)H が低下することで ADLA を引き起こすという包括的モデルを構築し、その妥当性について考察を加えている。

以上本論文は、大腸菌の増殖相転移期に起こるこれまで全く未知であった現象 (ADLA) について、基本的な性質を決定するとともに、その原因について実験的にアプローチすることで亜鉛イオンの関与を明らかにしたものであり、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 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。