

氏名	つねどみ りょういち 恒 富 亮 一
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第337号
学位授与年月日	平成16年 3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Molecular Biological Study of Mechanism of Cross-regulated expression between Gnt I and Gnt II Systems Involved in Gluconate Uptake and Catabolism in <i>Escherichia Coli</i> (大腸菌におけるグルコン酸取り込み及び異化に関わる Gnt I系と Gnt II系との相互発現調節機構の分子生物学的 的研究)
学位論文審査委員	(主査) 山田 守 (副査) 松下一信 川向 誠 松田英幸 森嶋伊佐夫

## 学位論文の内容の要旨

大腸菌はグルコン酸を輸送体によって細胞内に取り込み、リン酸化後、エントナー・ドウドロフ経路やペントースリン酸経路によって代謝する。グルコン酸の取り込み及び異化 (GNT) 系はマウス大腸内での大腸菌のコロニー形成や迅速なエネルギー獲得に必要である。GNT系酵素は、ゲノム上77分にコードされる主として働く GntI系と97分にコードされる補助的な GntII系とに分けられる。GntI系は *gntRku* オペロンと *gntT* 遺伝子により構成され、GntII系はダイバージェントに配置する *gntV* と *idnD0-gntWH* オペロンから構成される。遺伝学的解析から GntI系遺伝子は GntRによって負に、GntII系遺伝子は GntHによって正に制御されることが示唆されているが、両制御因子の DNA 結合モチーフが極めて類似していることから、GntI系と GntII系は両制御因子を介して相互制御を受けていることを推測した。そのため、GntI系と GntII系の発現調節機構の解明と両系間での相互制御機構の有無についての解析を通じて、それら制御機構の生理学的重要性を明らかにすることを目的とした。

解析の結果、GntI系遺伝子 (*gntK* や *gntT*) は GntRによって負に制御されるだけでなく、GntII系の正の制御因子 GntHによっても負に制御されることを示した。また、GntR結合配列を同定し、GntHも同じ DNA 配列に結合することも示した。GntI系の発現は生育初期に上昇してその後減少するのに対して、GntII系の発現は生育後期に上昇する。GntHによる GntI系遺伝子の発現抑制は、生育に沿った両系の切り替え時に働いていることが示唆された。GntII系遺伝子 (*gntV* や *idnD*) の発現は GntH依存的にグルコン酸よりもその代謝産物である5ケトグルコン酸やイドン酸によって強く誘導されることを示した。さらに、GntII系遺伝子が GntI系の負の制御因子 GntRによって正と負の両方の制御を受けていることを示した。また、GntII系遺伝子の発現誘導にも GntI系遺伝子と同様、cAMP-CRP複合体のオペレーターへの結合が必要であることを示した。*gntV-idnD* プロモーター・オペレーター領域

における cAMP-CRP 複合体、GntR 及び GntH の結合が観察され、GntR については GntI 系遺伝子と同様、グルコン酸の存在により解離しやすい部位、それとは異なりグルコン酸存在下でも解離しにくく、さらに cAMP-CRP 複合体の存在下で結合が強まる部位とがあることを示した。GntH についても cAMP-CRP と共に結合している状態が示された。以上の結果から、GntR と GntH を介した GntI 系と GntII 系との相互制御機構の存在を明らかにした。

微生物の転写調節はオペロンやレギュロンに特異的な制御因子と、cAMP-CRP 複合体や IHF などのように多くの遺伝子に作用するグローバルな制御因子によって成されると考えられてきたが、本研究によって特異的な制御因子を介した代謝ユニット間の相互制御機構の存在が初めて明らかとなった。このようなオペロンやレギュロン間の特異的な制御因子による相互制御は、ある代謝系から別の代謝系への迅速な切り替えを可能にしていると考えられ、環境変化や生育に沿って代謝活性を円滑に適応するために重要であると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

大腸菌のグルコン酸取り込み異化は比較的複雑で生理的にも重要であると思われる。この代謝には少なくとも 5 個の輸送体と 2 個のリン酸化酵素が関与する。この多様性はおそらく異なる種々の環境条件に適応するためと考えられ、その 1 つとしてマウス大腸内でのコロニー形成に不可欠であることが分かっている。それらの輸送体や酵素は主として働く GntI 系と予備的に働く GntII 系とに分類される。遺伝学的解析から GntI 系遺伝子は GntR によって負に、GntII 系遺伝子は GntH によって正に制御されることが示唆されている。本研究では両制御因子の DNA 結合モチーフの高い類似性から GntI 系と GntII 系が両制御因子によって相互制御を受けていることを予測し、実験的に証明している。この研究によって、増殖過程にそった発現調節や代謝ユニット間の相互制御あるいはダイバージェントに配位した遺伝子の発現調節機構の存在やその生理的役割など多くの新しい知見が見出されている。その詳細を以下に概略する。

- 1) レポーター遺伝子融合体や RT-PCR 法による解析および種々のオペレーター変異等の解析から、GntI 系遺伝子 (*gntK* や *gntT*) は GntR による負の制御に加えて、GntII 系の正の制御因子 GntH によっても負に制御されることを示している。また、GntR 結合配列を同定し、GntH も同じ DNA 配列に結合することを見出している。
- 2) 同様な解析から、GntI 系の発現は生育初期に上昇してその後減少するのに対して、GntII 系の発現は生育後期に上昇する。GntH による GntI 系遺伝子の発現抑制は、生育に沿った両系の切り替えに寄与していることを示唆している。
- 3) GntII 系遺伝子 (*gntV* や *idnD*) の発現は GntH 依存的にグルコン酸の代謝産物である 5 ケトグルコン酸やイドン酸によって強く誘導されることを明らかにし、さらに、GntII 系遺伝子が GntI 系の負の制御因子 GntR によって正と負の両方の制御を受けていることを示唆している。
- 4) ゲルシフト解析等から、GntII 系遺伝子の発現誘導にも GntI 系遺伝子と同様、cAMP-CRP 複合体のオペレーターへの結合が必要であることを示している。*gntV-idnD* プロモーター・オペレーター領域における cAMP-CRP 複合体、GntR 及び GntH の結合が観察され、GntR については GntI 系遺伝子と同様、グルコン酸の存在により解離しやすい部位、それとは異なりグルコン酸存在下でも解離しにくく、さらに cAMP-CRP 複合体の存在下で結合が強まる部位とがあることを示している。

GntH についても cAMP-CRP と共に結合している状態の存在を見出している。

微生物の転写調節はオペロンやレギュロンに特異的な制御因子と、cAMP-CRP 複合体や IHF などのように多くの遺伝子に作用するグローバルな制御因子によって成されると考えられてきたが、本研究によって特異的な制御因子を介した代謝ユニット間の相互制御機構の存在が初めて明らかにされた。このような相互制御は、ある代謝系から別の代謝系への迅速な切り替えを可能にしていると考えられ、環境変化や生育に沿って代謝活性を円滑に適応するために重要であると思われる。また、*gntV-idnD* のダイバージェントプロモーターの複雑な発現調節機構を明らかにしている。

以上のように本研究は、大腸菌のグルコン酸の取り込み異化系について分子生物学的解析を行い多くの新規で重要な知見を明らかにしている。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。