

氏名	えむでい しゃひぬる かびる MD. SHAHINUR KABIR
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲第394号
学位授与年月日	平成17年 9月22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	Involvement of σ^S regulon in cell survival and σ^E regulon in cell death in <i>Escherichia coli</i> early stationary phase (大腸菌定常期初期におけるシグマ S の生存への関与とシグマ E の細胞死への関与)
学位論文審査委員	(主査) 山田 守 (副査) 松下一信 川向 誠 森嶋伊佐夫 加藤 昭夫

学位論文の内容の要旨

大腸菌は様々なストレスに対して、個々のストレスに特異的な遺伝子セットを誘導することによって対処する。RNA ポリメラーゼの取り替え可能なサブユニットであるシグマ因子は、環境誘導因子やシグナルに応答して遺伝子群の転写を誘発する。大腸菌では7つのシグマ因子のうち、シグマ S (*rpoS* にコードされている) とシグマ E (*rpoE* にコードされている) はそれぞれ一般的なストレスと細胞質外ストレスに対処するために遺伝子群を発現制御する。本研究によって、シグマ S 遺伝子群 (レギュロン) が窒素源枯渇での生細胞維持に関与すること、およびシグマ E 遺伝子群が定常期初期のプログラム細胞死に関与することを示した。

シグマ S 遺伝子群が窒素源枯渇条件での CFU (コロニー形成細胞数) の維持に必要であることを *rpoS* 遺伝子破壊および相補実験によって示した。さらに、窒素源枯渇によって引き起こされる遺伝子発現変動を DNA マイクロアレーによって検討した。その解析の結果、窒素源枯渇が *rpoS* 変異株においてシグマ S 遺伝子群やシグマ H 遺伝子群を含む多くの遺伝子の発現に影響を及ぼすことを示した。3、7、10時間の窒素源枯渇によって、それぞれ318、189、165個の遺伝子の発現が誘導され、また、503、194、140個の遺伝子の発現が抑制された。*rpoS* 変異株において、シグマ H 遺伝子群のうちシャペロンをコードする遺伝子 *dnaK*, *ibpA*, *ibpB*, *dnaJ*, *htpG* などやシャペロニンをコードする遺伝子 *mopA*, *mopB* などの発現が減少していた。これらの遺伝子発現の減少は *rpoS* 変異株であっても通常の培養条件では起こらなかった。これら

のことから、*rpoS* 変異と窒素源枯渇の両方がシグマ H 遺伝子群の発現を減少させていると考えられる。従って、シグマ S は窒素源枯渇においてシグマ H 遺伝子群の発現を直接的にあるいは間接的に制御していると推測される。

窒素源が不足する条件下での生存には、シグマ S はおそらくその制御遺伝子群を発現させて、適切な代謝活動をすすめ、窒素枯渇によって引き起こされるストレスに対処し、核様体の構造を変える。これらの活動にシグマ H 遺伝子群が重要な機能を果たしていると思われる。加えて、上記の DNA マイクロアレーにおいて、多くの機能未知の γ 遺伝子の発現変動がみられたことから、窒素源枯渇での生存にこれらの遺伝子が関与している可能性がある。

これまで大腸菌のシグマ E 遺伝子群の生理学的役割は、細胞質外タンパク質の維持であるとされ、それに関する多くの実験が行われてきた。最近、新たな機能として定常期初期のシグマ E 依存性の溶菌が示された。しかし、その分子機構はほとんど明かになっていない。これを明らかにするために、*rpoE* 誘導発現系を用いた解析と DNA マイクロアレー解析を行った。*rpoE* 誘導発現系を用いた解析によって、シグマ E 依存性の溶菌が対数増殖期には起こらず、定常期初期に特異的に起こることを示した。また、DNA マイクロアレー解析によって、多くの γ 遺伝子を含む 230 個以上の遺伝子が *rpoE* 発現誘導によって発現が変動することが明らかになった。対数増殖期と定常期初期で発現が増大した遺伝子は、それぞれ 115 個と 83 個あり、減少した遺伝子は、44 個と 41 個あった。発現が増大した遺伝子の多くはシグマ E 遺伝子群であると予想される。遺伝子の並び、転写の方向、隣接する遺伝子との同調した発現誘導などに基づいて、既知のシグマ E 遺伝子群を含む 109 のオペロンを予測した。その中には、25 のポリシストロン性オペロンと 84 のモノシストロン性オペロンを含む。シグマ E 依存性の溶菌進行の分子的过程についてはほとんど不明であるが、その機構を明らかにするいくつかのヒントが得られた。

シグマ S は増殖定常期へ移行するために重要な役割を果たし、シグマ E は定常期初期の細胞死を引き起こす。そこで、シグマ E 依存性の溶菌におけるシグマ S の影響を *rpoS* 変異株を用いて検討した。*rpoS* 変異株ではシグマ E の発現によって培養液濁度が大きく減少した。一方、野生株では濁度の減少は *rpoS* 変異株と比べて大幅に遅れて起こった。これは、シグマ S がシグマ E 依存性の溶菌を抑制していることを示唆する。増殖が進むにつれて、細胞は酸化ストレスを含む様々なストレスに曝されるが、それらに対してシグマ S レギュロンによって対処する。そこで、酸化試薬の過酸化水素の影響を検討した。過酸化水素処理によって *rpoS* 変異株ではシグマ E 依存性の溶菌が野生株に比べて非常に強まった。これらの実験結果に基づいて、*rpoS* 変異株では何らかのストレスによって生きていたがコロニーを形成できない細胞を生じ、そのような細胞はシグマ E レギュロンによって溶菌へ導かれると推測される。すなわち、シグマ S レギュロンはストレスを解消し、一方、傷付いた細胞はシグマ E レギュロンによって細胞死へと導かれると思われる。

論文審査の結果の要旨

大腸菌は様々なストレスに対して特異的な遺伝子セットを発現することによって対処する。こ

の遺伝子セットの選択に RNA ポリメラーゼのサブユニットであるシグマ因子が関与し、環境誘導因子やシグナルに応答する。大腸菌では7つのシグマ因子のうち、シグマ S (*rpoS* 遺伝子産物) とシグマ E (*rpoE* 遺伝子産物) はそれぞれ一般的なストレスと細胞質外ストレスに対処するために遺伝子群を発現制御する。本研究によって、シグマ S 遺伝子群 (レギュロン) が窒素源枯渇での生存に関与すること、並びにシグマ E 遺伝子群が定常期初期のプログラム細胞死に関与することを明らかにしている。

シグマ S 遺伝子群が窒素源枯渇条件下での CFU (コロニー形成細胞数) の維持に必要であることを *rpoS* 遺伝子破壊および相補実験によって示し、さらに、窒素源枯渇によって引き起こされる遺伝子発現変動を DNA マイクロアレーによって検討している。その解析の結果、窒素源枯渇が *rpoS* 変異株においてシグマ S 遺伝子群やシグマ H 遺伝子群を含む多くの遺伝子の発現に影響を及ぼすことを示している。*rpoS* 変異株において、シグマ H 遺伝子群のうちシャペロンをコードする遺伝子 *dnaK*, *ibpA*, *ibpB*, *dnaJ*, *htpG* などやシャペロニンをコードする遺伝子 *mopA*, *mopB* などの発現が減少するが、これらの遺伝子発現の減少は *rpoS* 変異株であっても通常の培養条件下では起こらないことから、*rpoS* 変異と窒素源枯渇の両方がシグマ H 遺伝子群の発現を減少させると予想している。

また、シグマ S の窒素源欠乏条件下での役割を以下のように推測している。おそらくシグマ S 遺伝子群を発現させて、適切な代謝活動をすすめ、窒素枯渇によって引き起こされるストレスに対処し、核様体等の構造を変える。これらの活動にシグマ H 遺伝子群が重要な機能を果たしていると思われる。加えて、上記の DNA マイクロアレーにおいて、多くの機能未知遺伝子の発現変動がみられたことから、窒素源枯渇での生存にこれらの遺伝子が関与する可能性を示唆している。

これまで大腸菌のシグマ E 遺伝子群の生理学的役割は、細胞質外タンパク質の維持であるとされ、それに関する多くの研究が成されてきた。最近、新たな機能としてシグマ E によって引き起こされる溶菌機構の存在が示唆された。本研究ではその分子機構を明らかにするために、*rpoE* 誘導発現系を用いた解析と DNA マイクロアレー解析を行っている。*rpoE* 誘導発現系を用いた解析によって、シグマ E 依存性の溶菌が定常期初期に特異的に起こることを示している。また、DNA マイクロアレー解析によって、*rpoE* 発現誘導に伴って230個以上の遺伝子の発現が変動することを明らかにし、既知のシグマ E 遺伝子群を含む109のオペロンを予測している。シグマ E 依存性の溶菌に関わる遺伝子の同定には至っていないが、いくつかの可能性のある遺伝子を見出している。

シグマ S は定常期へ移行するために重要な役割を果たし、シグマ E は定常期初期の細胞死を引き起こすと考えられる。シグマ E 依存性の溶菌におけるシグマ S の影響を *rpoS* 変異株を用いて検討し、シグマ S がシグマ E 依存性の溶菌を抑制することを示唆している。一方、*rpoS* 変異株への過酸化水素の影響を検討し、*rpoS* 変異株ではシグマ E 依存性の溶菌が野生株に比べて強まることを示している。これらの実験結果に基づいて、シグマ S 遺伝子群はストレスを解消し、一方、傷付いた細胞はシグマ E 遺伝子群によって細胞死へと導かれると推測している。

以上のように本研究は、大腸菌の定常期初期でのストレス応答の1つを分子生物学的に解析す

ることによって、シグマ S 遺伝子群とシグマ E 遺伝子群の役割を示唆し、定常期環境への適応に関して多くの重要な情報を提供している。よって学位論文として十分に相応しいと評価した。