

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名	みな 皆 川 しゅう 周
学位の種類	博 士 (農学)
学位記番号	農 第 8 2 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 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	Molecular characterization of the Mg <sup>2+</sup> stimulon of <i>Escherichia coli</i> .
論文審査委員 (主 査)	教授 内 海 龍 太 郎
(副主査)	教授 岡 本 忠
(副主査)	教授 深 溝 慶

1. 大腸菌二成分制御系PhoQ-PhoPを介する情報伝達機構: Mg<sup>2+</sup> stimulonの発見 (主論文1)

Mg<sup>2+</sup>濃度依存的にPhoQ-PhoP系を介して制御される遺伝子群を探索するために、DNA microarrayを用いた網羅的なトランスクリプトーム解析と情報学的解析を行った。大腸菌野生株と野生株を高濃度Mg<sup>2+</sup> (30 mM)を含む培地で培養したものの、PhoQ欠損株、PhoP欠損株それぞれにおける条件で培養後total RNAを調製した。野生株から調製したtotal RNAはCy5、それ以外はCy3を用いて逆転写反応を行い、大腸菌の約4000 ORFがスポットされているDNAマイクロアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションさせ野生株における発現量と比較した結果、232遺伝子の発現が影響を受けていることが示唆された。これらの遺伝子の発現がPhoPにより直接的に制御されているかを調べるために、これまでの研究から予測したPhoP結合配列[(T/G)GTTTAnnnn(T/G)GTTTA]を持つプロモーターを解析した結果、26遺伝子のプロモーターがPhoP結合配列を保存していることが推測された。これら26遺伝子の発現がPhoQ-PhoP系を介して高濃度Mg<sup>2+</sup>により制御されているのかを調べるために、S1 nuclease assayを行った。その結果、9個の遺伝子 (*phoPQ*, *mgtA*, *mgrB*, *hemL*, *rstA*, *slyB*, *nagA*, *vboR*, *yrbL*) の発現がPhoQ-PhoPを介して高濃度Mg<sup>2+</sup>により抑制されていることが明らかとなった。さらに、DNaseI foot printingによりPhoPの結合領域を同定したところ、PhoP結合領域内に(T/G)GTTTAというシス配列(PhoP box)がそれぞれの転写開始点より-35付近に共通して保存されており、このPhoP boxにPhoPが結合し遺伝子発現制御を行っていることが明らかとなった。実際に、in vitro transcription実験においてこれらの遺伝子発現がPhoPにより正に制御されていた。以上の結果から、PhoQが細胞外Mg<sup>2+</sup>濃度を感知し、転写因子PhoPを活性化することにより9遺伝子 (*phoPQ*, *mgtA*, *mgrB*, *hemL*, *rstA*, *slyB*, *nagA*, *vboR*, *yrbL*) の発現を直接的に制御していることが明らかになった(Mg<sup>2+</sup> stimulon)。(Fig.1)

## 2. Mg<sup>2+</sup>センサーPhoQの機能解析(主論文2)

大腸菌膜タンパク質PhoQが細胞外Mg<sup>2+</sup>を感知していることを明らかにするために、膜タンパク質PhoQ(membrane PhoQ)とC末端側の細胞質内領域のみのタンパク質PhoQ(PhoQ-C)を調製し、PhoQの自己リン酸化反応におけるMg<sup>2+</sup>の影響を調べた。その結果、PhoQ-Cの自己リン酸化量は高濃度Mg<sup>2+</sup>により影響を受けなかったのに対して、membrane PhoQの自己リン酸化量は、高濃度Mg<sup>2+</sup>存在下で減少した。このことから、センサータンパク質PhoQはペリプラズム領域で細胞外Mg<sup>2+</sup>を感知していることが明らかになった。さらに、部位特異的変異導入法を用いてペリプラズム領域内に変異を持つ9種類のPhoQ変異体を作製した。PhoQのN末端から179番目のアスパラギン酸をロイシンに変異させたPhoQ変異体(PhoQD179L or A)を保持するPhoQ変異大腸菌では、細胞外Mg<sup>2+</sup>濃度を高くしても、Mg<sup>2+</sup> stimulonを構成する遺伝子の発現を抑制しなかった。in vitroのリン酸化実験の結果、高濃度Mg<sup>2+</sup>存在下では、membrane PhoQの自己リン酸化が抑制されたのに対して、membrane PhoQD179L(A)の自己リン酸化能は高濃度Mg<sup>2+</sup>により抑制されなかった。さらに、PhoQからPhoPへのリン酸基転移反応を調べた結果、membrane PhoQからPhoPへのリン酸基転移反応では、高濃度Mg<sup>2+</sup>存在下でPhoPのリン酸化が抑制されるのに対して、membrane PhoQD179L(A)を用いた場合にはMg<sup>2+</sup>濃度による抑制は見られなかった。これらの結果より、大腸菌PhoQは細胞外のMg<sup>2+</sup>濃度に応答してPhoQ自身の自己リン酸化能を調節し、さらにPhoPのリン酸化状態を制御することでPhoQ、PhoP間の情報伝達を制御していることが示唆された。また、PhoQD179L(A)は細胞外Mg<sup>2+</sup>に応答できないlocked-on変異体であることが明らかにされ、PhoQの179番目のアスパラギン酸はPhoQのMg<sup>2+</sup>応答領域とヒスチジンキナーゼ領域間の情報伝達において必須な役割を担っていることが明らかにされた。

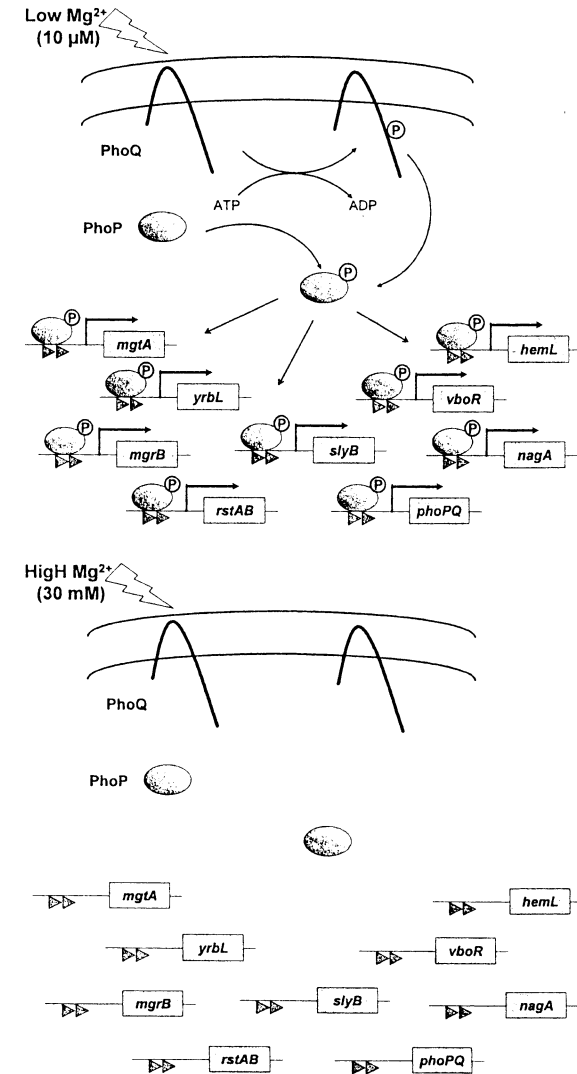


Fig.1 Mg<sup>2+</sup> stimulonの分子機構

論文審査結果の要旨

Mg<sup>2+</sup>は細胞が正常に増殖・生育するための必須な微量元素の一つである。その働きは主として、酵素の補助因子として知られている。しかしながら、近年、*Salmonella enterica* serovar Typhimuriumにおいて、細胞外Mg<sup>2+</sup>センサーPhoQが発見された。Mg<sup>2+</sup>センサーPhoQは細胞外Mg<sup>2+</sup>濃度を感知し、転写因子PhoPのリン酸化を調節し、種々の遺伝子発現を制御している。このように、細菌細胞においてMg<sup>2+</sup>は細胞の恒常性保持のために、種々の遺伝子発現制御を行う重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

本研究では、大腸菌において細胞外Mg<sup>2+</sup>により制御される遺伝子群(Mg<sup>2+</sup> stimulon)を明らかにするために、DNAマイクロアレイ解析を用いた。さらに、それらの遺伝子発現がPhoQ-PhoP二成分情報伝達機構により制御されていることをS1 nuclease assay、DNaseI footprinting assay、in vitro transcription analysisを用いて明らかにした。(主論文1)

次に大腸菌PhoQのペリプラズム領域に種々の変異を導入し、それら変異体のMg<sup>2+</sup>センサーとしての機能解析を行い、大腸菌PhoQが実際に細胞外Mg<sup>2+</sup>を感知しているセンサーであることを明らかにした。(主論文2)

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成17年 2月22日、農学研究科委員会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏 名	おがさわら ひろし 小笠原 寛
学位の種類	博 士(農学)
学位記番号	農 第 8 3 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 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	Transcriptional regulation of DNA repair gene expressions by bacterial signal transduction system
論文審査委員 (主 査)	教授 内 海 龍 太 郎
(副主査)	教授 河 村 幸 雄
(副主査)	教授 重 岡 成