

氏名(本籍)	小 黒 明 広 (新潟県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第1,636号
学位授与年月日	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Molecular and Biochemical Studies of the <i>Bacillus subtilis</i> <i>srb</i> Operon Consisting of Three Genes for RNase III, SMC Family Protein and a Homologue of the Mammalian SRP Receptor α-Subunit (枯草菌 RNase III, SMC ファミリータンパク質及び哺乳類 SRP 受容体 α -サブユニット相同遺伝子から構成される <i>srb</i> オペロンの分子生化学的研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 山根 國 男
副査	筑波大学教授 農学博士 田 仲 可 昌
副査	筑波大学教授 農学博士 酒 井 慎 吾
副査	筑波大学助教授 医学博士 中 山 和 久

論 文 の 内 容 の 要 旨

真核生物のタンパク質分泌の初期過程において、シグナル認識粒子 (SRP) とそのレセプターが重要な役割を担っている。一方、原核生物のタンパク質分泌は Sec タンパク質群によると考えられてきた。しかし、近年、原核生物である大腸菌や枯草菌において、SRP 構成成分の相同因子が見つかってきて、タンパク質分泌に関与していることが明らかになってきた。本研究では、原核生物の中でも高いタンパク質分泌能を持ち、胞子形成などの、より複雑な生命活動を営む枯草菌において、SRP-SRP レセプター系の存在とその機構をより詳細に解析するために、枯草菌の SRP レセプター相同因子の同定を行い、さらにその遺伝子構造と機能について解析した。

枯草菌の SRP レセプター α サブユニット (SR α) 相同遺伝子 (*srb*) をクローン化し、塩基配列を決定した。その配列及び転写開始点の解析から、*srb* は大腸菌 RNaseIII の相同遺伝子、酵母 SMC タンパク質の相同因子をコードしている遺伝子とオペロンを形成していることが分かった。枯草菌 S**r**b は 3 つの GTP 結合モチーフを有し、哺乳類 SR α と 26.6%、大腸菌 SR α 相同因子 FtsY と 47.9%、古細菌 *Sulfolobus* の SR α 相同因子 DP α と 36.2% の相同性を示した。S**r**b と他の SRP のレセプターのアミノ酸配列を比較すると、GTP 結合モチーフ I の約 100 アミノ酸上流に両親媒性を示す特徴的な α -ヘリックス構造をとることが分かった。

一方、枯草菌の SRP RNA である scRNA は、その前駆体の二次構造の特徴及び大腸菌 RNaseIII における解析より、枯草菌 RNaseIII 相同因子によりプロセッシングを行われていることが予想された。そこで、枯草菌 RNaseIII 相同因子を用いて、*in vitro* において scRNA 前駆体のプロセッシングを行わせた結果、scRNA 成熟体に相当する切断産物を得た。さらに、この切断産物の 5' 及び 3' 末端をプライマー伸長法で決定し、scRNA 前駆体のプロセッシングが枯草菌 RNaseIII 相同因子によって行われていることを明らかにした。

S**r**b の枯草菌内における機能を調べるために、IPTG 存在下のみで S**r**b が発現される条件欠損変異株 ISR 38 株を作成した。ISR38 株は、IPTG 存在下では野生株と同等の増殖を示したが、IPTG 非存在下では増殖に障害が見られた。また、IPTG 非存在下で培養した時の菌の形態は、伸長したり、螺旋状になるなど異常を示した。分泌タンパク質である大腸菌 β -ラクタマーゼ及び枯草菌アルカリ性プロテアーゼと好アルカリ性 *Bacillus* sp. #1011 CGTase のシグナルペプチドと β -ラクタマーゼの成熟体領域を融合させたタンパク質に対し、S**r**b 欠損がこれら

の分泌に与える影響について調べた。IPTG 非存在下では、いずれの場合においても前駆体タンパク質の蓄積が見られ、Srb がタンパク質の分泌過程に関与していることを明らかにした。

枯草菌の胞子形成時において、コルテックスの沈着に関与しているペニシリン結合タンパク質 (PBP5*) は、その前駆体において、枯草菌で見られる典型的なシグナルペプチドを持っており、母細胞で翻訳され、胞子へ移行すると考えられている。このPBP5* のシグナルペプチドと β -ラクタマーゼの成熟体領域を融合させたタンパク質をISR38株で発現させると、IPTG 非存在下ではその前駆体の蓄積が見られた。さらに、ISR38株のIPTG 非存在下においては、その胞子形成率が低下していること、また、一部の細胞で胞子殻の異常を示し、細胞内にうずまき状の構造を見出すことができた。この異常な構造は胞子形成変異株 (*spo IVA*) に見られる胞子殻タンパク質の局在に異常が起こった場合の構造と類似していた。これらのことより、枯草菌においてSRP-SRP レセプター系がタンパク質分泌だけでなく、胞子形成に関わるタンパク質の細胞内での局在化にも関与している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

タンパク質がその機能を発揮するためには、正しい場所に局在化することが必須であり、タンパク質局在化機構を解明することは生物学上非常に重要である。本論文はそのような立場から、原核生物の中でも胞子形成など複雑な生命活動を営む枯草菌を用いて、タンパク質分泌に関与する因子Srbの遺伝子構造及び機能に関して研究を行ったものである。

本研究では、枯草菌より新規のタンパク質分泌装置構成因子 (Srb) をコードする遺伝子をクローン化し、解析した。また、*srb* 遺伝子とオペロンを形成している遺伝子産物のRNase III 相同因子が、枯草菌のSRP RNAのプロセッシング酵素であることを明らかにしている。さらに、Srb が胞子タンパク質の局在、及び胞子の形態形成に影響を与えることを明らかにし、SRP-SRP レセプター系が、タンパク質分泌だけでなく形態形成に関与していることを考察している。このことは今までに他の生物種では報告されておらず、今後タンパク質の分泌・局在化の研究に新たな局面をもたらす、先駆的な研究となっている。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。