

氏名(本籍)	鈴木典子(静岡県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4315号		
学位授与年月日	平成19年3月23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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	枯草菌光受容体 YtvA の遺伝・生化学的研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	星野 貴行
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	中村 顕
副査	筑波大学助教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学講師	博士(農学)	高谷 直樹

## 論文の内容の要旨

枯草菌ゲノム内には、 $\sigma^B$  活性調節因子の1つである RsbR のパラログタンパク質が計8種 (RsbR, RsbS, IspU, YojH, YqhA, YetI, YezB, YtvA) 存在しており、そのうちの6種の欠損変異が  $\sigma^B$  活性に影響を与え、環境ストレスによる  $\sigma^B$  活性化に関与することが示されている。また、当研究室で同様の変異が  $\sigma^H$  活性にも影響を与えることが示され、2つの異なる  $\sigma$  因子の活性調節に RsbR パラログタンパク質が関与することが推定されていた。本研究では、RsbR パラログタンパク質の機能の詳細を明らかにするために、RsbR パラログ遺伝子の欠損変異が  $\sigma^H$  活性に与える影響をより詳細に解析した。さらに、パラログタンパク質の中で特徴的なドメインを有する YtvA に着目し、遺伝学的及び生化学的な機能解析を行った。

### (1) RsbR パラログ遺伝子の欠損変異が $\sigma^H$ 活性に与える影響に関する解析

RsbR パラログ遺伝子の各単独変異および様々な組み合わせの二重欠損変異が  $\sigma^H$  活性に与える影響を検討するために、異なる抗生物質耐性遺伝子の挿入により *ytvA*, *yezB*, *ispU* および *yojH* 欠損変異を再構築し、これらの変異を組み合わせた変異株を用いて  $\sigma^H$  依存の *kinA-lacZ* 遺伝子の発現を検討した。その結果、IspU と YezB は正の、YtvA と YojH は負の調節因子として  $\sigma^H$  活性を調節していることを明らかにした。また二重欠損変異の解析結果より、YojH は IspU を通じて  $\sigma^H$  活性を調節していること、ならびに IspU, YezB, YtvA はそれぞれ独立して  $\sigma^H$  活性の調節を行っていることが示唆された。

### (2) YtvA の光受容体としての機能解析

RsbR パラログタンパク質は互いに C 末端側の STAS (sulfate transporter and anti-sigma antagonist) ドメインで相同性を示すが、その中で YtvA は N 末端側に LOV (light, oxygen or voltage) ドメインを有し、植物の光受容体と相同性を示す特徴的なタンパク質である。植物の光受容体では LOV ドメインは光受容のキードメインであり、保存された Cys 残基 (YtvA では Cys62) が光によりドメイン内の1分子の FMN (flavin mononucleotide) と結合し (photoadduct formation)、暗条件下でこの結合が自然に解離する (dark reversion) ことが知られている。また、YtvA は  $\sigma^B$  因子の活性調節に関与することも示されている。そこ

で YtvA が光を受容し、 $\sigma^B$  の活性調節に影響を与えるのではないかと推定し、組換え YtvA を用いた生化学的な解析と各種 *ytvA* 変異を持つ枯草菌を用いた遺伝学的な解析を行った。

### 生化学的な解析

大腸菌による大量発現系を利用して、全長型 (YtvA)、LOV ドメインのみ (YtvA-LOV)、更にそれらの Cys62 を Ala に置換した変異型 (YtvA-C62A, YtvA-C62A-LOV) の 4 種類の YtvA タンパク質を精製した。これらのタンパク質の紫外可視吸収スペクトルを検討した結果、YtvA は植物の光受容体と同様のメカニズムで青色光を感知し、光の受容には Cys62 が必須であることが明らかとなった。次に YtvA の分子量をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した結果、YtvA も植物の光受容体と同様に LOV ドメインを介してホモダイマーを形成し、ダイマー形成は光条件に依存しないことが示唆された。また、YtvA および YtvA-LOV の photoadduct formation および dark reversion の反応速度定数を解析した結果、C 末端側の STAS ドメインが LOV ドメインの dark reversion に影響を与えることが示唆された。

### 遺伝学的解析

枯草菌ゲノム上の *ytvA* 遺伝子を、*ytvA-C62A*、*ytvA-LOV*、*ytvA-C62A-LOV* および STAS ドメインのみの *ytvA* 遺伝子 (*ytvA-STAS*) に置換した変異株を作製し、これらの変異が  $\sigma^B$  活性に与える影響を検討した。最初に光がストレスとして  $\sigma^B$  活性化を引き起こすか否かを検討したが、 $\sigma^B$  活性は光による直接的な誘導を受けなかった。同様に *ytvA* 遺伝子の発現も光により誘導されなかった。次に、環境ストレスによる  $\sigma^B$  活性化への光の影響を検討するため、明暗条件下で塩ストレスを加えた場合の  $\sigma^B$  活性化を比較した結果、光により  $\sigma^B$  活性化が約 2 倍に増幅され、光受容に Cys62 が必須であることが *in vivo* でも示された。また、受容した光シグナルを  $\sigma^B$  活性調節機構に伝達するために STAS ドメインが必要であることが示唆された。

以上の結果より、YtvA が LOV ドメインを介して光受容とダイマー形成を行い、枯草菌の光受容体として  $\sigma^B$  活性を増幅させることを明らかにした。さらに、YtvA の光受容には FMN と Cys62 の結合が必須であり、STAS ドメインが LOV ドメインによる光受容と光シグナルの伝達に関与することが示唆された。

ところで、 $\sigma^B$  因子の活性調節では、エネルギーストレスと環境ストレスは独立した経路で感知される。RsbR パラログタンパク質は環境ストレスの感知・伝達の調節因子であり、本経路のキーとなる調節因子 RsbT を制御することが報告されている。YtvA は RsbR パラログタンパク質が形成する複合体 (RsbR, RsbS, YtvA, IspU, YqhA, YojH) を構成しており、YqhA および RsbR と相互作用することが示されている。これらの知見を総合すると、YtvA が受容した光シグナルは、YtvA の STAS ドメインを経由して RsbR パラログタンパク質複合体に伝達され、他の環境ストレスシグナルと統合されて  $\sigma^B$  の活性化を引き起こすと考えられる。

## 審査の結果の要旨

本論文は枯草菌 RsbR パラログタンパク質の機能解析に関するものであるが、IspU, YojH, YezB 及び YtvA が  $\sigma^H$  因子の活性化に関与することは新奇の知見である上、これら調節因子の相互関係を明らかにした点は、学術上非常に価値がある。また、YtvA が光受容体として機能することは他の研究グループにより近年明らかにされていたが、その生理機能として、環境ストレスによる  $\sigma^B$  活性化を光依存的に増幅させることを明らかにした点は、新しい知見である。これらの成果は、微生物遺伝学上、大きな貢献をするものと判断した。

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