



Studies on Inner Membrane Proteins in E. coli; Characterization of Two Proteins Interacting with RodZ Important for The Cell Shape Maintenance

李, 高馳

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2012-09-25

(Date of Publication)

2013-03-22

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5643

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005643>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 李 高馳

専 攻 生物学専攻

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on Inner Membrane Proteins in *E. coli*; Characterization of Two
Proteins Interacting with RodZ Important for The Cell Shape Maintenance
(大腸菌内膜蛋白質の研究:細胞の形態維持に重要な RodZ と相互作用
する二つの蛋白質の解析)

指導教員 坂本 博

要旨

大腸菌はモデル生物として多くの研究がなされてきたが、未だにその半数近い遺伝子の詳細な機能は解明されていない。そうした遺伝子には膜蛋白質をコードしているものが多く含まれていると考えられる。細胞膜は生命を維持し細胞の形を決定するのに無くてはならないが、膜蛋白質はその合成や維持、さらに細胞の増殖分裂の制御に働いている。大腸菌においては、1,000 種ほどの存在が予測されていて、ゲノムにコードされている全蛋白質の 1/4 近くにも及ぶ。これら膜蛋白質の中には、その機能が全く不明なものも多くある。

当研究室におけるこれまでの研究で、欠損するとバイオフィルムの形成を減少させる遺伝子として、機能不明ないくつかの膜タンパク質が同定されたが、その中の一つ *yfgA* (*rodZ* と命名された) は、最近の研究により、細胞伸長に機能し、桿菌の細胞形態維持に重要であることが明らかとなった。また、同じくバイオフィルムの形成に関与する遺伝子として同定された *yhcB*、*yciB* は P1 トランスダクションを用いた実験で、遺伝子の欠失が *rodZ* と合成致死となることが示唆され、*rodZ* の機能に関わっていることが考えられた。そこで本研究では、*yhcB* および *yciB* の機能を明らかにすることを目的として、*rodZ* との相互作用を中心に、*yhcB*、*yciB* の解析を行った。

まず *yhcB* は、遺伝子の過剰発現によって、ある程度の生育阻害が見られるが、欠損による影響は見られないことがわかった。そこで、*yhcB* は *rodZ* と実際に合成致死を示すのかを調べるために、アラビノース遺伝子のプロモーターによって発現される *yhcB* を持った二重遺伝子欠失株 $\Delta yhcB \Delta rodZ$ を作製した。この株が *yhcB* の発現抑制により、生育が出来なくなってしまうことを示し、 $\Delta yhcB \Delta rodZ$ は合成致死であることを明らかにした。次に、YhcB は細胞内膜に局在することがその一次構造から予測されていたが、細胞分画法により確かめ、よって、YhcB 蛋白質は大きなコイルドコイル領域を持つ C 末端を細胞質側に、N 末端をペリプラズム側に露出した 1 回膜貫通型蛋白質であることを明らかとした。そこで、この YhcB の局在とトポロジーの情報を考え、Bacterial Two-Hybrid System (BACTH) 法を使って、*in vivo* で YhcB が RodZ 蛋白質と相互作用しているかどうか調べることを試みた。 β -ガラクトシダーゼ活性の測定結果は、YhcB と RodZ が強く相互作用していることを示し、YhcB が RodZ と蛋白質レベルで相互作用することにより、その機能に関わっていることを示唆した。また、YhcB の部分欠失クローンを作製し調べたところ、N 末端の膜貫通領域あるいは C 末端のコイルドコイル領域が無いと RodZ との相互作用が見られないことがわかった。しかし、これらの領域の欠失は YhcB 蛋白質の発現あるいは安定性に重要であるが明らかとなり、RodZ との相互作用が見られなかったのはこのためかもしれない。次に、RodZ が細胞形態の維持に重要な働きを担っていることを考慮し、YhcB が他の既知の細胞形態形成に関わっている蛋白質、MreB (バクテリアのアクチン様蛋白質)、MreC、MreD、RodA 及びペプチドグリカン生合成の最後段階の酵素、MurG と相互作用して

いるかどうかを、同じく BACTH を用いて調べた。結果は、YhcB は明らかに MreC、MreD、RodA 及び MurG と相互作用するが MreB とは、RodZ と異なり相互作用しないことが示された。また、RodZ は MurG と相互作用しないことが報告されているので、YhcB はペプチドグリカン合成と RodZ を繋ぎ、その細胞伸長機能を助けていることが考えられる。さらに、YhcB とこれらの蛋白質との相互作用は RodZ を介していないことも明らかとした。

yciB 遺伝子は、欠損すると細胞の生育が遅くなること、また過剰発現によって細胞の増殖が阻害されることがわかった。また、こうした *yciB* 欠損株及び過剰発現によって巨大な細胞や、細胞の死骸と思われる空の細胞壁が電子顕微鏡観察で多数見られた。YciB 蛋白質は YhcB と同様に内膜蛋白質であるが、5 個の膜貫通領域を持つ蛋白質であることが *in silico* 解析で予測されていた。そこで、PhoA-LacZ と融合蛋白質を作る *yciB* の段階的欠失クローンを作成し、その C 末端が細胞のどこに局在するかを調べることにより、YciB は実際に 5 回膜貫通型蛋白質であり、その C 末は細胞質にあることを確認した。この結果に基づき、YciB と RodZ が細胞内において相互作用しているかどうかを BACTH 実験によって調べた。その結果、YciB は RodZ と相互作用することが示唆されたが、YhcB と RodZ のような強い相互作用は見られなかった。これは、上に述べたように YciB の過剰発現は細胞の生育に悪いので、高レベルで安定に YciB を発現する株ができないことによると考えられる。一方、YciB の C 末を欠如した蛋白質（アミノ酸 1-120）は RodZ と強い結合を示したので、YciB と RodZ は細胞内において実際に相互作用していること、C 末が YciB の機能に重要であることが示唆された。

以上の結果により、新規遺伝子 *yhcB* および *yciB* は *rodZ* と蛋白質レベルで相互作用し、桿菌型細胞形態形成の機能に何らかの関わりを持っていることを明らかにした。これまで、*yhcB* 欠失株に生育や形態の異常が全く認められず、その機能は不明であったが、ペプチドグリカン合成酵素及び形態形成に必要な蛋白質との強い結合を考え、YhcB はペプチドグリカン前駆体の膜貫通輸送に RodZ とともに関わっているのではないかと考える。一方、*yciB* は、赤痢菌のホムログ遺伝子の変異株の解析から、細胞分裂に関わっていることが示唆されている。この蛋白質が RodZ と相互作用することは、RodZ や YciB がバクテリアの細胞伸長と細胞分裂の両方に関与する可能性を示しているかもしれない。今後さらに、これらと機能的あるいは蛋白質レベルで相互作用する遺伝子を同定し、その機能を解析して行くことにより、未だに明らかでないバクテリアの細胞伸長と細胞分裂の制御、形態形成の詳細を知る手がかりが得られると期待する。

氏名	李 高馳		
論文 題目	Studies on Inner Membrane Proteins in <i>E. coli</i> ; Characterization of Two Proteins Interacting with RodZ Important for The Cell Shape Maintenance (大腸菌内膜蛋白質の研究: 細胞の形態維持に重要な RodZ と相互作用する二つの蛋白質の解析)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	坂本 博
	副 査	教授	井上 邦夫
	副 査	教授	三村 徹郎
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
大腸菌はこれまでに多くの研究、特に分子遺伝学の対象となってきたモデル生物であるが、約 4400 と推定されたその遺伝子の半数近くは、未だにその機能が明らかではない。これらの機能未知遺伝子(y-gene)の多くは細胞の生育に必須でなく、通常の生育条件で遺伝子欠損株の表現型が明らかでないことが、その機能解析を困難にしている。本研究では、遺伝子の欠損によってバイオフィーム形成が減少するという表現型を示す二つの y-gene、<i>yhcB</i> と <i>yciB</i> について分子遺伝学的解析を行い、その細胞における機能の解明を試みた。 本論文は、「要旨」、「序論」、「実験材料と実験方法」、「結果」、「考察」から構成されている。「要旨」では、研究全体の意義と実験の流れ、結果とその解釈についてまとめている。「序論」では、大腸菌の分子遺伝学的研究における重要性、歴史及び現状についてまとめ、その中で、本論文で対象としているような解析が困難である遺伝子の研究方法について展望を述べている。また、研究対象の遺伝子の機能と密接な関係があると考えられる細菌の細胞膜および細胞分裂について、これまで行われてきた研究の成果をまとめ、本研究の意義を示している。「実験材料と実験方法」では、実験に用いた大腸菌の変異株やプラスミドの構築方法、遺伝子機能の分子遺伝学的解析の方法について詳細に記述している。 「結果」では、①細胞の形態形成に重要であることが報告されている <i>rodZ(yfgA)</i> 遺伝子の欠損は、実際に細胞壁を形成するペプチドグリカンに異常をきたすことを明らかにした。そして、これまでの研究から、この <i>rodZ</i> と機能的に関連していると考えられた <i>yhcB</i> と <i>yciB</i> 遺伝子の変異株の解析を行い、②<i>yhcB</i> と <i>rodZ</i> の二重欠失変異は合成致死となること、さらに、この遺伝子による YhcB 蛋白質が RodZ 及び細胞形態形成に関わることが知られているいくつかの膜蛋白質と相互作用することを示し、<i>yhcB</i> が <i>rodZ</i> と同じく細胞形態形成に関わっていることを初めて明らかにした。③一方、<i>yciB</i> 遺伝子の過剰発現は細胞増殖を阻害し、巨大な異常細胞を出現させることから、細胞分裂に重篤な影響を与えることを示唆した。また、YhcB と同じく YciB 蛋白質も RodZ と相互作用することを示し、これらの遺伝子が機能的に関連していることを明らかにした。このことはまた、これまでほとんど解析がなされていない、細胞伸長と分裂を繋ぐ遺伝子の一つである可能性を示している。最後に、④<i>yhcB</i> と <i>yciB</i> 遺伝子の発現様式について解析を行い、これらの遺伝子が局在するゲノムの周辺の遺伝子と、どのようなオペロン構成を成しているかを調べた。これにより <i>yhcB</i> は、やはり膜蛋白質をコードする <i>degQS</i> 遺伝子とは異なるオペロンに存在し、その発現量がこれらとは大きく異なることを明らかにした。また、<i>yciB</i> は機能未知遺伝子 <i>yciC</i> と同じオペロンに存在すると考えられているが、<i>yciC</i> のプロモーターに加えて独自のプロモーターを遺伝子の上流に持つことを初めて実証した。「考察」では、本研究によって得られた実験結果をもとに、まず、<i>yhcB</i> 遺伝子の機能について論じ、この遺伝子が最初に提唱されたような、チトクローム酸化酵素			

氏名	李 高馳
の一構成蛋白質ではなく、<i>rodZ</i> とともにおそらくペプチドグリカンの生合成に関与することから、細胞の形態形成に働いていることを述べている。さらに、なぜ <i>yhcB</i> と <i>rodZ</i> の二重欠失変異は合成致死となるかについて考察している。また、YhcB 蛋白質が RodZ 及び細胞形態形成に関わる他の膜蛋白質と内膜においてどのような相互作用をし、複合体を形成しているかを考察し仮説を提唱している。<i>yciB</i> 遺伝子に関しては、その変異株の解析から、必須遺伝子ではないもののおそらく細胞分裂に関与し、その発現が厳密に制御されていないと細胞の生育と形態に大きな影響を与えることを論じ、またこのような性質故に、この遺伝子産物の解析が困難であることを指摘している。最後に、本研究で行うことができなかった生化学的解析について考察するとともに、<i>yhcB</i> や <i>yciB</i> のように新しく同定された膜蛋白質に関する知識を、新規な抗生物質の開発に生かす等、大腸菌の機能未知遺伝子解析の応用面での展望にも言及している。 以上のように、本研究は大腸菌の二つの未知遺伝子の分子遺伝学的解析から、これらが細胞形態形成および細胞分裂に関わっていることを初めて明らかにし、桿菌の細胞伸長と分裂についての重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者李高馳は博士(学術)の学位を得る資格があると認める。	