

報告番号

* 甲乙第 3016 号

主論文の要旨

題名

大腸菌外膜タンパク質の生合成調節
機構の分子遺伝学的解析

氏名 松山伸一

主論文の要旨

報告番号	※ 第	号	氏名	松山伸一
大腸菌主要外膜タンパク質 <i>OmpF</i> , <i>OmpC</i> の合成は、培地 浸透圧変化によって全く逆の影響を受ける。浸透圧の低い培地 で生育させた菌の外膜には <i>OmpF</i> タンパク質のみが存在している。 が、ショ糖や食塩を加えて培地浸透圧を高めると <i>OmpF</i> の合 成は抑制され、 <i>OmpC</i> タンパク質の合成が促進される。このように 培地浸透圧変化によって外膜中に見られるタンパク質の量が変化 する現象は、浸透圧変化による遺伝子発現の調節という意味で <i>osmoregulation</i> と呼ばれている。 <i>osmoregulation</i> に関する遺 伝子として、 <i>OmpF</i> , <i>OmpC</i> タンパク質の構造遺伝子である <i>ompF</i> , <i>ompC</i> 遺伝子、および <u><i>ompF</i></u> , <u><i>ompC</i></u> の発現を調節する <u><i>ompR</i></u> , <u><i>envZ</i></u> 遺 伝子が知られている。筆者が <i>osmoregulation</i> の研究を始めた時 点では、 <u><i>ompF</i></u> , <u><i>ompR</i></u> , および <u><i>envZ</i></u> 遺伝子がクローニングされており、 DNA の全塩基配列も決定されていた。 このような背景のもとに、筆者はまず <i>osmoregulation</i> の生理 的意義について研究するために、 <u><i>ompC</i></u> 遺伝子をクローニングし、 次いで、 <u><i>ompF</i></u> と <u><i>ompC</i></u> のプロモーター領域を相互に交換した融合 遺伝子を作成した。 <u><i>ompF</i></u> , <u><i>ompC</i></u> の発現がプロモーター依存性で あるならば、作成した融合遺伝子からは、低浸透圧下で <i>OmpC</i> が、 高浸透圧下で <i>OmpF</i> が優先的に合成されるはずである。 実際、作成した融合遺伝子によると、培地浸透圧変化に対する				

応答が野生型遺伝子の場合とは全く逆に OmpF, OmpC タンパク質が合成された。しかしながら、この融合遺伝子を保持する菌の生育は、野生株と較べて全く正常であったことから、通常用いられている試験管内培養条件下では、OmpF, OmpC 合成の培地浸透圧変化に応答する切換えは大腸菌にとって必須ではないことが示唆された。

また、遺伝子発現の調節機構に関しては、ompR, envZ による発現調節について、ompF, ompC のプロモーター領域が重要であり、かつ、ompF, ompC 遺伝子間には相互に発現を調節し合う機構が存在することが示唆された。

筆者は、上述の研究の過程で、ompC プロモーター、およびその上流領域を含む約1kbのDNA断片がクローニングされた多コピー数プラスミドを保持する菌について、ompF 遺伝子の発現が完全に抑制されることを見出した。この現象は Mizunoらによって詳しく解析された。この抑制因子は、ompC プロモーターの上流にコードされる約170塩基のRNA分子で、ompF mRNA の翻訳開始領域と安定な二本鎖構造を形成しうる相補的配列をもつており、ompF mRNA の翻訳を阻害すると考えられた。この低分子RNAは micF RNAと呼ばれ、その遺伝子は micF 遺伝子と名付けられた。さらに、micF の発現は、ompF の発現が抑制される高浸透圧下で誘導され、ompR, envZ によって調節されていた。これらの研究結果をもとに、Mizunoらは、micF が osmoregulation において中心的な役割を担っているというモデルを提唱した。

筆者は、osmoregulation に関して新しく見出された第三の調節遺伝子である micF の機能を詳しく調べるために、染色体上に存在する micF 遺伝子の欠失変異株を作成し、解析した。その結果、培地浸透圧を低浸透圧状態から高浸透圧状態にシフトさせた直後ににおける OmpF タンパク質の合成の抑制には micF RNA がわずかがらの寄与をしているが、浸透圧変化の定常状態では micF 欠失変異株における ompF の発現は野生株と同じであった。このことから、染色体上に存在する 1 コピーの micF 遺伝子は、osmoregulation において 中心的な役割をもつといふと結論された。また、多コピー数プラスミドにクローニングされた micF 遺伝子は、ompF 遺伝子の発現を抑制することができるが、少コピー数プラスミドにクローニングされた micF では ompF の発現を抑制できなかつたことから、micF による ompF の発現の抑制は遺伝子量に依存していることが明らかになつた。

ompF, ompC 遺伝子の発現は、OmpR, EnvZ タンパク質によって調節されている。OmpR タンパク質は ompF, ompC プロモーターの上流領域に結合し、転写を促進する。一方、EnvZ タンパク質は細胞質膜に存在していることから osmosensor であろうと考えられているが、その機能はほとんど明らかにされていなかつた。また、培地浸透圧変化という刺激がいかに認識され、どのような信号に変換されて遺伝子発現に影響を与えているのかという情報伝達の機構も全く未知であつた。

筆者は、envZ 変異を抑制する変異株を取得することによって、これ

らの問題に取り組んだ。envZ11変異株は OmpF⁻ OmpC constitutive の表現型を示す。この変異株の中から、OmpF⁺ OmpC⁺ の表現型を示すようになつた株を取得し、解析した。その結果、envZ11変異は保存されたままで抑制変異が ompR 遺伝子に生じていることを明らかにした。この変異型 ompR は野生型 envZ 遺伝子が存在している場合には特別な表現型を示さないこと、この変異型 ompR の機能は envZ 依存性であること、および、この変異型 ompR は envZ11 以外の envZ 変異を抑制したことから、OmpR と EnvZ タンパク質は直接相互作用して ompF, ompC 遺伝子の発現を調節していることが強く示唆された。

また、この抑制変異株の解析の過程で、ompR 変異による envZ 変異の抑制をせがける変異を見出し、その変異が RNAポリメラーゼの α サブユニットをコードする rpoA 遺伝子に存在することを明らかにした。これから、転写調節タンパク質と RNAポリメラーゼが相互作用していることが示唆された。また、RNAポリメラーゼの分子構造は詳しく解析されていてもかかわらず、その分子構造と転写の際の進行方向との関係は明らかにされていないかった。筆者の得た結果から、転写方向に対して β , β' サブユニットが前方に、 α サブユニットが後方に位置する状態で RNAポリメラーゼは進むということが強く示唆された。