

報告番号 ※ 甲乙第 3342号

主論文の要旨

題名

蛋白質生産菌 Bacillus brevis 47
における細胞壁構造及び細胞壁
蛋白質遺伝子の解析

氏名 坪井 昭夫

主論文の要旨

報告番号 ※ 報第 号 氏名 坪井昭夫

細菌の中には、最外層に蛋白質分子が規則的に配列した層状の分子集合体を有するものがみられ、このような擬結晶状の表層構造体は S-layer (surface layer) と称されている。S-layer は一般的に、一種類の蛋白質或は糖蛋白質より構成され、S-layer から解離させたプロトマーはペプチドグリカンの様な適当な支持体の上に、熱力学的な安定性に基づいて二次元的な規則配列にアッセンブリーする能力を有する。

S-layer に関する形態学的な解析は、古細菌を含めた多くの細菌において詳細に行われており、それらの中には S-layer を構成する蛋白質が分離され、蛋白質化学的に解析されているものもあるが、S-layer 蛋白質をコードする遺伝子をクローン化し、解析したのは *B. brevis* 47 が最初の例である。

筆者は本研究において、蛋白質生産菌 *Bacillus brevis* 47 の 2 層から成る S-layer の分子構築を明らかにすると共に、S-layer 蛋白質遺伝子の全構造及び発現様式を解明した。

第 1 章 *B. brevis* 47 細胞壁構造の再構成系による解析

B. brevis 47 の 3 層から成る細胞壁 (特に 2 層から成る S-layer) の分子構築を解明する為に、細胞壁の構成成分を分離・精製して再構成系により解析し、更に S-layer に関しては光回折・濾過法による微細構造の解析を行った。また、本菌からファージ耐性株 47-57 を単離し、同様な解析を行うことにより、以下のことを明らかにした。

(1) *B. brevis* 47の細胞壁は多くのグラム陽性菌のそれと異なり、特徴的な3層、即ち分子量13万蛋白質(OWP)から構成されるOW層、分子量15万蛋白質(MWP)から構成されるMW層、及びペプチドグリカンであるIW層から成ることが示された。

(2) *B. brevis* 47のS-layer(OW, MW層)には格子定数14.5 nmの六角格子構造が存在し、また、OW層を欠失した変異株47-57のS-layer(親株のMW層に相当する層)にも同じ格子定数の六角格子構造が存在することが明らかになった。

(3) *B. brevis* 47のS-layerの構築様式に関して 2つのモデルが提示され、OW・MW層において2種の蛋白質サブユニット(OWP・MWP)がtrimer、或はhexamerの構造単位を形成し、それらが更に六角格子状に配列していることが示された。

(4) 本菌のS-layerの形態形成はペプチドグリカン層並びに2種の蛋白質(MWP・OWP)分子間の特異的な相互作用-疎水結合、水素結合及び2価カチオンを介する塩架橋結合-に基づく“自己集合”に依ると結論された。

第2章 *B. brevis* 47 細胞壁蛋白質及びその遺伝子の構造解析

本菌のS-layerを構成する2種の蛋白質MWP・OWPを分離、精製し、蛋白質化学的な解析を行うと共に、MWP・OWP遺伝子をクローン化し、その構造を解析することにより、以下のことを明らかにした。

(1) 遺伝子構造の解析から、MWP・OWP遺伝子はMWP遺伝子を上流としてタンデムに存在し、且つその転写方向は同じであることが判明した。MWP遺伝子の翻訳開始にはUUGコドン

(SD1) 或はAUGコドン(SD2)が、また、OWP遺伝子の場合にはGUGコドン(SD)が関与することを明らかにした。但し、括弧内はそれぞれのコドンの上流に存在するリボゾーム結合部位を示す。

(2) MWPはAUG(SD2)から翻訳された場合には23個の、またOWPは24個の、アミノ酸残基より成るシグナル配列を有する前駆体として合成されることが示された。

(3) MWP・OWP遺伝子において、各アミノ酸に対する同義語コドンの使用頻度に著しい偏りがみられ、大腸菌の場合と同様に、このコドンの使用パターンが本菌における2種のS-layer蛋白質遺伝子の効率良い発現に翻訳段階で関与していることが示唆された。

(4) MWPとOWPは共に、ほぼ類似したアミノ酸組成を示し、ほぼ同じ等電点を有するが、1次構造(電荷アミノ酸の分布及びハイドロパシー)は非常に異なり、S-layerの内側を構成するMWPは外側を構成するOWPと比較して、量的にも質的にも親水性領域に富むことが示された。また、1次構造から予測される2次構造についても、その組成自体は両蛋白質において似ているが、そのパターンは著しい相違を示すことが判明した。

(5) MWP・OWPは他のS-layer蛋白質に共通する特徴、即ち、(i)非極性アミノ酸を多く含み、また塩基性アミノ酸に比べて酸性アミノ酸に富む、(ii)含硫アミノ酸は少量しか存在しなく、システインは多くの場合全く含まれない、(iii)等電点から判断して酸性蛋白質である、(iv)CDスペクトル解析から推測して β -シート構造に富む、などを有することが明らかになった。

(6) MWP及びOWPの間には有意なホモロジーを示す領域は認められず、両蛋白質遺伝子は共通の祖先遺伝子から分化したものであることが示唆された。また、OWPと *Deinococcus radiodurans* の S-layer蛋白質の間には、それらのC末端領域に有意なホモロジーを示す配列が見い出され、S-layer蛋白質の中で進化上保存された重要なドメインであることが示唆された。

第3章 細胞壁蛋白質遺伝子の発現に関する解析

B. brevis 47におけるS-layer蛋白質遺伝子の高効率発現、並びに発現調節の機構を解明する為に、そのプロモーターの構造及び発現に関する解析を行った。また、本菌のS-layer蛋白質遺伝子を有する枯草菌が合成する蛋白質について解析を行い、以下のことを明らかにした。

(1) MWP-OWP遺伝子はMWP遺伝子上流300bpの範囲に存在する5つの転写開始部位から、一つの転写単位として読まれ、協調的に発現することを明らかにした。

(2) MWP-OWP遺伝子オペロンの5つの転写開始点はアデニン、またはウリジンであることを明らかにした。また、それらの上流には大腸菌の σ^{70} 並びに枯草菌の σ^{43} RNAポリメラーゼにより認識される配列と相同性の高いプロモーター配列が各々見い出され、個々のプロモーターが固有の強度と調節様式を持ち、全体として複雑な調節を受けていることが示唆された。

(3) MWP-OWP遺伝子の転写終結には、大腸菌と同様に、 ρ 因子非依存性の転写終結シグナルが関与していることが示された。

(4) B. brevis 47における細胞からのS-layer (MW・OW層)の離脱並びに菌体外への蛋白質 (MWP・OWP) 分泌は Mg^{2+} 添加により抑えられるが、この際に、MWP・OWP 遺伝子の発現は転写レベルでは抑制されないことが示された。

(5) MWP 或はOWP 遺伝子を保持する枯草菌は主として細胞内に B. brevis 47由来のMWP 或はOWP と分子量的に並びに免疫学的に同一のポリペプチドを合成することが示された。また、枯草菌において合成されたMWPは、本菌のMWPと同様に、ペプチドグリカン上にアッセンブリーし、六角格子構造を形成することが判明した。