



Molecular and biochemical studies of the Bacillus subtilis FtsY protein, a homologue of the subunit of mammalian signal recognition particle

著者	Kakeshita Hiroshi
内容記述	Thesis (Ph. D. in Sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 1714, 2001.3.23 Includes bibliographical references
発行年	2001
URL	http://hdl.handle.net/2241/6823

氏名(本籍)	かけしたひろし 掛下大視(静岡県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1714号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2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> FtsY Protein, a Homologue of the α subunit of Mammalian Signal Recognition Particle (枯草菌蛋白質分泌経路で作用するヒトSRPレセプターSR α 相同因子, FtsY, の機能解析)
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 理学博士 林純一
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

細胞質内のリボソーム上で遺伝情報に基づいて合成された蛋白質は、細胞内外の適所に輸送されることで初めて十分な生物活性を発揮する。そのため、蛋白質の局在化は細胞機能維持の上で必須の過程である。細胞は膜系によって他の細胞や外界と区別されており、細胞内も様々な膜系によって区画され、特異的な機能を持つ部位やオルガネラを形成している。したがって、蛋白質が細胞内外の目的地に到達するには、これらの膜系を透過したり、一つの膜から他の膜へと輸送されなくてはならない。細胞膜透過を行う分泌蛋白質は、プラスの電荷を持つアミノ酸からなる荷電領域および疎水性に富むアミノ酸からなる疎水領域で構成されるシグナル配列を持つ。蛋白質輸送装置は、このシグナルペプチドを認識し蛋白質の局在化を行っている。真核生物において、蛋白質分泌の初期過程である小胞体への輸送はシグナル認識粒子(SRP)とその受容体が主要な働きをしている。一方、原核細胞、特に大腸菌においては、Sec系による膜透過系モデルが提唱されてきた。このように真核生物と原核生物の蛋白質膜透過機構は異なるものとされてきたが、近年、大腸菌や枯草菌などの原核生物においても、SRP相同因子が同定されSRP-SRP受容体系による膜透過系の存在が示唆されてきた。枯草菌においては、SRP構成成分である7SRNAの相同因子としてscRNAが、SRP54相同因子としてFfhがそれぞれ同定されており、両者は細胞内で複合体を形成し、蛋白質分泌に関与することが示唆されている。

枯草菌におけるSRP-SRP受容体系を解析するためにヒトSRP受容体(SR α)相同因子の遺伝子をクローン化し、その遺伝子産物をSrb(SRP receptor of *Bacillus subtilis*)とした。1997年、枯草菌ゲノムプロジェクトによる枯草菌全塩基配列の決定が完了、その際にFtsYと名称を変更した。枯草菌FtsYは、大腸菌FtsYと47.9%、ヒトSR α とは27.3%の相同性を持つ329アミノ酸からなり、一次構造上、種々な生物に由来するSRP受容体において高度に保存されている3ヶ所のGTP結合モチーフが存在していた。ftsY遺伝子は上流に存在する大腸菌RNaseIIIと酵母SMC1と相同性のある2つの遺伝子(nrsS2, smc)とオペロン構造を形成し、細胞増殖期に σ^A プロモーターにより転写される。

枯草菌FtsYの菌体内での機能を調べるため、IPTGによりftsY遺伝子の発現制御を可能とするFtsY条件欠損変異株ISR38を作成した。FtsY欠損時には、生育の阻害が見られた。さらに、FtsY欠損時には各種シグナル配列融合蛋白質前駆体の蓄積が見られた。このことからFtsYは正常な生育及び蛋白質分泌に必要であることが示された。

FtsY欠損時に、枯草菌に特有な孢子形成に必要な蛋白質であるペニシリン結合蛋白質5*のシグナル配列と β ラクタマーゼ成熟体との融合蛋白質の蓄積が見られた。そこで、ノーザン解析により孢子形成過程における*ftsY*遺伝子の発現時期を調べたところ、孢子形成後期(T8)に特異的に発現していることがわかった。さらに、プライマーエクステンション法により転写開始点を決定したところ、*ftsY*遺伝子は σ^K , GerEに依存して転写されていることが予想された。次に、FtsYが細胞増殖期には発現し、孢子形成時には発現しない株、ISR39株を使用し、孢子形成率及び熱耐性、リゾチーム耐性ならびにクロロフォルム耐性を測定した結果、リゾチーム耐性だけが、18%まで低下した。ISR39株の孢子を電子顕微鏡下で観察したところ、外殻が非常に薄かった。孢子殻を精製し、構成蛋白質を調べたところ、野生株にくらべて65kDa, 61kDaおよび21kDaの蛋白質が減少していたため、各蛋白質のアミノ酸配列を決定したところ、それぞれCotA, CotB, CotEと同定され、いずれも孢子殻を形成する蛋白質であった。各コート蛋白質の発現する孢子形成後期(T8)の蛋白量をウエスタンブロッティング法により検出した結果、いずれも母細胞側では減少が認められなかった。また、孢子形成時のFtsYの局在を免疫電顕法により観察した結果、FtsYは内生孢子外側の細胞膜に存在していたことから、母細胞の細胞質内で発現したFtsYが、分泌蛋白質とともに内生孢子に局在したことが示唆された。

以上の結果から、FtsYは、対数増殖期だけでなく孢子形成時にも必要であり、その役割は、孢子と母細胞間の蛋白質の輸送にも関与していることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

蛋白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、蛋白質局在化機構の解明は、生物学上非常に重要である。本論文ではそのような立場から、原核生物の中でも有用な酵素や化合物を高濃度を分泌し、工業的に重要な細菌である枯草菌を用いて、分泌装置に関与する因子FtsYの遺伝子構造ならびに機能に関して研究を行った物である。

本研究では、枯草菌より新規の蛋白質分泌装置を構成する因子としてFtsYをコードする遺伝子をクローン化し、菌体外分泌への影響を調べた。また、FtsYが最も単純な分化の能力と位置付けられる孢子形成に特異的に関与していることを明らかにした。これまで、孢子形成に関する因子は、孢子形成時のみに発現するもので栄養増殖期に発現する因子は関与しないと考えられており、また、孢子形成時の蛋白質輸送については今まで報告がなされていなかったことから、蛋白質輸送の普遍性を示した重要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。