

氏名	こばやしげんご 小林元悟
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2536号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	<i>Escherichia coli</i> の染色体分配に關与する生育必須因子ObgEの機能解析
論文調査委員	(主査) 教授 上村 匡 教授 井口 八郎 教授 宮田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

GTP結合タンパク質は細胞増殖、分化、シグナル伝達、ポリペプチド合成の伸長反応等に關与し生命活動の要となる機能を持っている。また、これらは原核生物から真核生物まで広く保存された構造及び配列モチーフ(G-1~G-5)を持つGTP結合タンパク質スーパーファミリーを形成している。*Bacillus subtilis*でObgタンパク質は最初に発見されたが、その他のバクテリアにおいてもObg相同体(以下、バクテリアObgファミリー)が存在していることがわかった。これらは、これまでに生育に必須であることが明らかにされ、バクテリアにおける分化または細胞内GTPレベルのモニタリングに關与していること等が示唆されている。しかし、バクテリア、真核生物においてもObgファミリーの機能の詳細は明らかにされていない。我々は*Escherichia coli*におけるYhbZがObg相同体であることを見つけ、ObgEと名付け*E. coli*では初めてその性質についての詳細な解析を行った。

obgE遺伝子及びObgEタンパク質が*Escherichia coli*の生育に必須であったことから、ObgEの発現が調節可能な株や高温感受性変異型ObgEをもつ株を作製し、これらの株のObgEの欠損時における細胞や核様体の形態を野生型株と比較観察すると、核様体の分配が阻害されていることがわかった。この時、染色体DNA複製開始伸長反応は阻害されていなかったというフローサイトメトリー等の実験結果、また、ObgEタンパク質の過剰生産が異常な染色体分配を引き起こすという結果から*Escherichia coli*においてObgEタンパク質が染色体分配に何らかの關与をしていることを示した。そして、変異体の表現型等の比較から既存の染色体分配因子とは異なる役割を担う可能性が示唆された。

一方で、RFHR-2D-PAGE法、MALDI-TOFMS等を利用したプロテオーム解析からObgEの欠損時にリボソームタンパク質のS6とS18に翻訳後修飾異常がおこることを明らかにし、ObgEの欠損時に16S rRNAのプロセッシングも阻害されることが分かった。これらのことから、ObgEがリボソームの成熟過程に直接・間接的に關与していることが示唆された。

さらにObgEが欠乏している時としていない時でトランスクリプトーム解析を行った結果、ObgEの枯渇が非常に多くの遺伝子の転写活性の増減を引き起こすことが分かった。

ObgEタンパク質の精製法を初めて確立し、ObgEタンパク質がGTP結合能、GTP加水分解能そしてDNA結合能を持つこと、細胞内分子数がリボソームや核様体タンパク質並みに多いこと、その細胞内濃度と生育速度とは相関性があり、対数期に発現が誘導されること、細胞膜に部分的に相互作用するが成熟したりボソームとは強い結合をしていないこと等の生化学的データを得た。

これら一連の実験結果を、野生型株をクロラムフェニコールで処理した場合におこるリボソーム前駆体の蓄積や、核様体の凝縮による染色体の分配阻害に着目して考察し、ObgEは*E. coli*の染色体分配に必須な核様体の高次構造を保持し、その欠損は染色体分配のみならず、転写や翻訳、リボソームの成熟過程に影響を及ぼすという説を提言する。

論文審査の結果の要旨

生物の基本要素である GTP 結合タンパク質は細胞増殖、分化、シグナル伝達、ポリペプチド合成の伸長反応等に関与し、生命活動の要となる機能を担っている。これらは GTP 結合タンパク質スーパーファミリーを形成し、GTPase 活性を持ち、タンパク質構造及び配列モチーフが原核細胞から真核細胞まで広く保存されている。このファミリーの一つ Obg タンパク質は枯草菌で最初に見つけられた。申請者は大腸菌を宿主とする F プラスミドの複製開始タンパク質に特異的に結合するタンパク質を探索中に大腸菌抽出液から YhbZ タンパク質を分離した。この機能は未知であったが GTPase ドメインを持つ大腸菌の Obg 相同体であり、N 末、G-1~G-5 のモチーフがバクテリアから真核細胞まで高く保存されていることがコンピュータ検索からわかった。しかしバクテリア、真核細胞のいずれの系においてもこの機能は明らかにされていなかった。申請者は大腸菌の YhbZ タンパク質を ObgE と命名し、詳細な機能解析を行った。

この遺伝子の欠失変異を持つプラスミドと大腸菌染色体との二重交差法を用いた遺伝学的研究から、この遺伝子産物は、大腸菌の生育に必須であることを明らかにした。次に、申請者が分離した高温感受性の ObgE 遺伝子変異体を用いて、細胞形態及び核様体の顕微鏡観察を行ない、正常な ObgE が欠損する条件では正常な染色体分配が観察されなかったことから、ObgE が染色体の分配に関与することをこの系で始めて明らかにした。染色体分配阻害はいくつかの要因があることが知られていたが、そのひとつとして DNA 複製阻害による可能性が考えられた。フローサイトメータ、サザンハイブリダイゼーション方法を用い、調べた結果、DNA 複製開始、伸長には関与していないこと、さらに既存の染色体分配に関与する因子とも異なることがわかり、申請者は ObgE は新たな染色体分配に関与するタンパク質であることを示唆した。

続いて申請者は ObgE の生化学的性質を調べるために、ObgE の精製法を始めて確立した。精製 ObgE を用いた実験から、GTPase 活性を持つこと、GTP によって促進される DNA 結合能を持つことを明らかにした。又、細胞内では単量体で存在すること、二価イオンを介して膜に結合していることも明らかにした。ObgE の細胞内の存在量は多く、リボソームタンパク質やヒストン様タンパク質の存在量に相当する。大腸菌の生育速度と細胞内 ObgE 量は相関しており、定常期に比べて対数期に多く発現されていることもわかった。

細胞内 ObgE の欠乏状態におけるトランスクリプトーム解析の結果から、多くの遺伝子(約10%)の転写活性に正又は負の効果をもたらすことを観察した。さらに ObgE の欠乏状態におけるプロテオーム解析を行ない、核様体タンパク質量の変化やリボソームタンパク質の修飾異常が見られた。16SRNA の蓄積も観察されたが、生成リボソームとの相互作用は観察されなかったことから、リボソームの成熟過程に関与している可能性が示唆された。以上の結果から ObgE は核様体の高次構造保持に関与するタンパク質であり、この核様体構造が転写、翻訳、染色体分配異常をもたらすという作業仮説を提示した。この研究は大腸菌での ObgE の機能解析としては始めてであるが、DNA 結合能や染色体分配に関与すること等他の系では観察されなかった多くの新しい成果があった。これらは論文に公表した。これらの成果は他の生物の類似タンパク質の機能を理解するうえで有効な知見を与える意味でも寄与が大きい。

よって、申請者の学位論文は博士(理学)の学位論文として価値があるものと認められる。なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、申請者の高い学識と研究能力を十分評価することができ、合格と認めた。