

	きむら あかね
氏名（本籍地）	木村 明音
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第229号
学位授与年月日	平成24年3月27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	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	土壌細菌 <i>Burkholderia multivorans</i> の鉄応答転写因子 Fur と過酸化水素応答転写因子 OxyR の遺伝学的関連性の解明
博士論文審査委員	（主査） 教授 津田 雅孝 教授 南澤 究 教授 草野 友延

はじめに

自然環境に棲息する環境細菌は、地球規模の各種物質循環に深く関与している重要な研究対象である。しかしこれまでの細菌研究はモデル細菌や医学的に重要な病原細菌に関するものが多く、環境細菌に関する知見は少ない。病原細菌とは異なる環境に棲息する環境細菌は、それぞれの環境に適応するために独自の適応機構を進化させていると考えられ、実際、環境細菌は一般にゲノムサイズが大きく、独特の発現制御遺伝子を多く有している。従って、環境細菌の環境適応機構を明らかにするためには、研究が先行しているモデル細菌や病原細菌の知見の適用のみだけでなく、環境細菌固有の適応機構を解析する必要がある。そこで本研究では土壌に棲息する環境細菌の環境適応機構の解明を目的として、多様な物質代謝能を有してゲノム全塩基配列が解明している土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株を対象にし、鉄がほとんど全ての細菌で必須な栄養素であることを踏まえ、ATCC 17616 株を含む多くの細菌において鉄環境応答のみならず他の多面的応答機能を転写レベルで統括的に制御している因子 Fur (ferric uptake regulator) に着目した研究を実施した。

当研究室での先行研究で、ATCC 17616株のFurの機能解析が進められてきたが、*fur*遺伝子破壊株(Δfur 株)は、(i)多くの炭素源の資化能を失う、(ii)活性酸素種(ROS)である過酸化水素(H_2O_2)やスーパーオキシド (O_2^-)、活性窒素種である一酸化窒素(NO)、細胞内遊離鉄イオンにより活性化する抗生物質ストレプトニグリンに高感受性である、(iii)抗酸化酵素であるsuperoxide dismutaseやcatalaseの活性が低下する、という性質が認められていた。更なるFurの機能解析をめざし、 Δfur 株のNO高感受性を抑圧する自然サプレッサー突然変異株(SOF株)が複数取得され、これらSOF株は Δfur 株の示した他の多くの表現型も抑圧されていた。本研究ではこれらの研究をもとに、ATCC 17616株におけるFurとサプレッサー変異の野生型遺伝子産物OxyR (H_2O_2 ストレスレギュロンの転写制御因子)の関連性、及びこれらの多面的な機能の解析を目的とした。

第1章 SOF株のサプレッサー変異箇所同定と $\Delta fur\Delta oxyR$ 株の取得と解析

2株のSOF株のタイリングアレイ解析によりいずれの株でもサプレッサー変異箇所は*oxyR*内であることが判明し、更なるシーケンス解析でこれら2株のSOF株でのサプレッサー変異はいずれも*oxyR*内の同一箇所の2塩基欠失変異であることが明らかになった。本変異によりSOF株のOxyRは機能を失っていることが推測されたため、新たに $\Delta fur\Delta oxyR$ 株と $\Delta oxyR$ 株を作製後、解析を行った。 $\Delta fur\Delta oxyR$ 株では Δfur 株のNO高感受性が抑圧され、SOF株でのNO高感受性抑圧はOxyRの機能喪失に起因することを明示した。さらに $\Delta fur\Delta oxyR$ 株

では、 Δfur 株のROSとストレプトニグリンへの高感受性や炭素源資化能低下も抑圧されていた。これにより、上記表現型を規定する多面的機能におけるFurとOxyRの遺伝学的関連性が示された。Fur及びOxyRは共に多くの細菌に存在する発現制御因子であり、両因子の関連についていくつかの報告例はあるものの、本研究で示したような多種の表現型における報告は初めてである。また、鉄環境応答と酸化ストレス環境応答が密接に関与することを示すとともに、酸化ストレスに対して重要な機能を有することで知られているOxyRがNOストレス及び炭素源資化能に密接に関与するという新たな知見も示すことができた。

第2章 $\Delta fur\Delta oxyR$ 株と $\Delta oxyR$ 株での発現解析

$\Delta fur\Delta oxyR$ 株が上記表現型を示す原因を発現レベルで明らかにするために、野生株と各種変異株での網羅的な発現解析をSDS-PAGE及びマイクロアレイを用いて行った。まずSDS-PAGE解析で野生株や Δfur 株と比較して $\Delta fur\Delta oxyR$ 株と $\Delta oxyR$ 株で高発現していた3つのタンパク質バンドを検出した。これら3つのバンドは、KatG(catalase/peroxidase)、AhpC1(alkyl hydroperoxidoreductase subunit C)及びAhpD(alkyl hydroperoxidoreductase subunit D)という抗酸化能を有することが予想される酵素タンパク質であった。一方マイクロアレイ解析では、野生株と $\Delta oxyR$ 株で各々 H_2O_2 添加時に誘導された遺伝子群を比較することで、 H_2O_2 添加時にOxyRが抗酸化能を有すると予想される酵素遺伝子を転写誘導させることを示した。また、 H_2O_2 非添加時に野生株と比較して $\Delta oxyR$ 株で誘導される上位3遺伝子は、SDS-PAGE解析で高発現されていた3つのタンパク質をコードする遺伝子(*ahpD*と*katG*, *ahpC1*)であったことから、3種タンパク質の顕著な高発現は主に転写レベルでの高発現に起因することが判明した。さらなるマイクロアレイ解析やqRT-PCR解析により、これらの遺伝子は野生株において H_2O_2 添加時に転写誘導されること、そして、 H_2O_2 非添加時にはOxyRによる転写抑制を受けることが示唆された。一方、Furによる直接的な発現制御が明らかになっているFurレギュロン構成遺伝子群の多くが、 H_2O_2 非添加時に野生株と比較して $\Delta oxyR$ 株で転写誘導されていることが明らかとなり、遺伝子発現レベルにおける更なるFurとOxyRの関連が示された。

第3章 Δfur 株が示す各種表現型の $\Delta fur\Delta oxyR$ 株での抑圧機構の解析

上記で明らかになった KatG と AhpC1D の高発現が Δfur 株に及ぼす影響を検討した。 $\Delta fur\Delta oxyR$ 株や $\Delta oxyR$ 株では H_2O_2 除去能と耐性能が野生株や Δfur 株よりも上昇しており、また、KatGを高発現させた Δfur 株誘導体では H_2O_2 高感受性が抑圧されていた。一方、KatG高発現のみでは炭素源資化能の低下及びNO高感受性という Δfur 株表現型は抑圧されず、 Δfur 株で大量に生じると予想される強毒性のヒドロキシラジカルの発生源となる H_2O_2 の除去能の増大のみでは Δfur 株の示す各種表現型は抑圧されないことが明らかとなり、 Δfur 株の各種表現型の $\Delta fur\Delta oxyR$ 株での抑圧機構の複雑さが示された(図1)。AhpC1D高発現株は作製できず、今後、 Δfur 株背景下でのAhpC1D高発現株の作製とその解析やAhpC1Dの酵素学的解析が必要である。

第4章 炭素源資化能欠損の抑圧を指標に取得された Δfur 株の自然サプレッサー突然変異株の解析

クエン酸資化能欠損の抑圧を指標に取得された Δfur 株の自然サプレッサー突然変異株6株のうち3株では、SOF株とは異なる $oxyR$ 変異が認められ、当該変異株ではSOF株同様、KatGとAhpC1、AhpDが高発現しており、サプレッサー株でのこれら表現型抑圧も $oxyR$ 変異によると考えられた。一方、 $oxyR$ 変異がなかったクエン酸資化能欠損抑圧3株及びコハク酸資化能欠損抑圧6株のうち、2株ではグルコース、クエン酸及びコハク酸資化能欠損、そしてNOと H_2O_2 高感受性を抑圧し、7株ではグルコース資化能を除く上記表現型も抑圧されていた。従って、炭素源の中でも特にクエン酸とコハク酸の資化能、そして、NOと H_2O_2 の耐性能は密接に関与することが明らかになるとともに、これらの表現型に関与するFur及びOxyR以外の因子の存在が示唆された。今後これら自然サプレッサー突然変異株の変異箇所を明らかにし、その変異による表現型抑圧機構を解析することが課題である。

まとめ

以上、本研究によって、ATCC 17616株のFur及びOxyRの多面的な機能における関連性、及び一部の炭素源とNO及び H_2O_2 の耐性能が密接に関与するという新たな知見を提示することができた。Fur及びOxyRはグラム陰性細菌や一部のグラム陽性細菌を含む多くの細菌に保存されており、多くの研究が行われている。これらの因子の新たな関連性及び機能の提示は非常に重要な知見といえる。

今後はATCC 17616株におけるOxyRの更なる機能、発現制御機構の解析、及びFurとOxyRを介した発現制御機構の解析、そして、ATCC 17616株が実際の棲息環境である土壌でのFurやOxyRの機能に着目した研究が必要である。当研究室の別研究により、FurはATCC 17616株の土壌における生育に重要な因子であることが明らかになっている。このような実際の環境に着目した研究、そして、本研究のような実験室系における研究成果を統合することにより、環境での細菌の実際の挙動の解明が期待される。

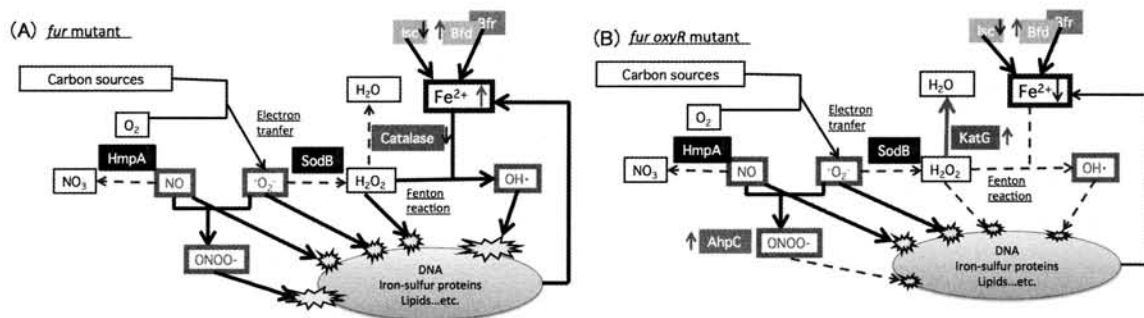


図1. Δfur 株(A)と $\Delta fur\Delta oxyR$ 株(B)細胞内における鉄と活性酸素種、活性窒素種発生の関連モデル

論文審査結果の要旨

自然環境に棲息する環境細菌は、地球レベルの物質循環に深く関与しており重要な研究対象である。本研究では土壌に棲息する細菌の環境適応機構の解明を目的として、多様な物質代謝能を有しゲノム全塩基配列が解明している土壌細菌*Burkholderia multivorans* ATCC 17616株を対象にして、本菌において、鉄応答を含む多面的な環境応答に必要な鉄応答転写制御因子Fur (ferric uptake regulator)に着目した研究を実施した。本研究以前に、ATCC 17616株のFurはNO (Nitric oxide) ストレスやROS (Reactive oxygen species) ストレス応答、炭素源資化能に関与すること、そして、*fur* 欠損株のNO高感受性が抑圧された自然サプレッサー突然変異株(SOF株)は*fur*欠損株の示した他の多くの表現型も抑圧されること、が判明していた。これら先行研究を踏まえ本研究では、ATCC 17616株におけるFurとサプレッサー変異の原因因子として同定したOxyR (H₂O₂ ストレスレギュロンの転写制御因子)の関連性、及びこれらの多面的機能の解明を目的とした。

まずタイリングアレイ解析及びシーケンス解析により、SOF株の変異箇所が *oxyR* 内に存在することを明示した。さらに、*fur* 並びに *oxyR* 遺伝子の完全欠損株の解析で、Fur 及び OxyR がこれまでに報告のない多面的機能に関連すること、及び、酸化ストレス応答で知られる OxyR が NO ストレスと炭素源資化能にも密接に関与すること、を明らかにした。また、SDS-PAGE 解析、マイクロアレイ解析、qRT-PCR 解析で OxyR が発現制御する遺伝子群を明らかにし、本菌における OxyR を介した環境応答機構を解明するための基盤を構築した。一方、*fur* 欠損株のサプレッサー株の更なる解析により、*fur* 欠損株が示す表現型に関して、クエン酸やコハク酸の資化能が欠損する機構と NO や ROS に高い感受性を示す機構が密接に関与するという新規かつ重要な知見を提示した。これらの知見は、*fur* 欠損で多様な表現型が引き起こされる機構を解明するための大きな手がかりを提示した。Fur 及び OxyR が多くの細菌属に存在していることを踏まえると、本研究でのこれら因子の新たな関連性及び機能の提示は非常に重要な知見といえる。

本研究の成果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、木村明音氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。