

氏 名	大 坂 夏 木		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (バイオサイエンス)		
学位記番号	甲 第 782 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 20 日		
学位論文題目	<b>枯草菌における GTP 生合成を中心とした増殖制御ネットワークの解析</b>		
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農学)	朝 井	計
	教 授・農 学 博 士	千 葉 櫻	拓
	教 授・博士 (農学)	川 崎 信 治	
	博士 (農学)	戸 澤	譲*

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

Guanosine-tri-phosphate (GTP) はあらゆる生体反応・細胞増殖過程に利用される生体分子である。他のヌクレオチド三リン酸と同様に、DNA 複製、転写における基質として利用される他、細胞分裂においては Z-ring 形成に關与する FtsZ の活性、翻訳においては、リボソーム形成、翻訳開始、伸長、終結の各段階に利用される。このようにあらゆる生体反応への關与に加え、細菌においてはその細胞内における量の変化が、rRNA の転写量の調節、胞子形成開始に關与することも報告されており、細胞の増殖・分化を制御する上でも重要な生体分子であるといえる(Lopez *et al.* J. bacteriol, 1981, Krasny and Guarse, EMBO J., 2004)。

細菌は外界の栄養状態に応じて細胞内の代謝を変化させ、増殖・分化を制御しており、環境中の様々なストレスに対する適応を可能としている。細菌一般において保存される環境適応機構の一つとして、緊縮応答が知られている。緊縮応答ではアミノ酸飢餓等のストレスによって GTP(GDP)から警告物質(p)ppGpp が合成・蓄積し、環境変化、抗生物質への適応性の他、病原性の發揮に寄与していることが知られている。アミノ酸飢餓等のストレス条件において、(p)ppGpp は rRNA 合成、DNA 複製、翻訳などのあらゆる生体反応に關わる機構を阻害し、生体分子の無駄な消費を抑制する一方で、アミノ酸生合成を促進することで細胞の生存を可能とする。(p)ppGpp の標的因子は複数存在するが、その中でも環境変化に応じた代謝切り替えに關わる主たる標的は、枯草菌を始めとするグラム陽性細菌の多くでは、GTP 生合成経路の酵素であるとされている(Kriel *et al.*, Mol. Cell, 2012)。グラム陽性細菌として代表される枯草菌は、(p)ppGpp の合成に關与する酵素を 3 つ保有している。これらを全て欠失させた株 [(p)ppGpp<sup>0</sup> 株] は、アミノ酸飢餓条件において、細胞内 GTP 量が上

\*埼玉大学大学院 理工学研究科 教授

昇し、生育阻害を示す。この生育阻害は GTP 量の減少によって相補されることから、(p)ppGpp の合成・蓄積がもたらす細胞内 GTP 量の低下が、アミノ酸飢餓への適応に重要であることが示唆されている(Kriel *et al.*, Mol. Cell, 2012)。しかし、このようなアミノ酸飢餓への適応に必須な役割を担う GTP 量変化の本質が何であるかについては、未だ研究の余地がある(Tojo *et al.*, J. Bacteriol., 2008; Kriel *et al.*, J. Bacteriol., 2014)。さらに、GTP 量は栄養状態に応じて厳密に制御されている故に、その生合成が細胞における他の代謝と共役的に制御されていることは想像できるが、これまでの GTP 量の制御に関わる研究は、主に前述した(p)ppGpp による制御と、*de novo* 生合成経路上流の酵素に対するフィードバック制御等に焦点が当てられており、他の代謝経路上にある因子との関連性については未検証である。

以上の課題を解明していくためには、GTP 量を制御する主要な因子として知られる(p)ppGpp を排した株において、どういった遺伝子変異がアミノ酸飢餓への適応性を回復させるのか、また、そうした抑圧変異株においてもアミノ酸飢餓への適応性、細胞内 GTP 量に影響を与える因子はあるのかを解析していくことが重要であると考えられる。過去に枯草菌(p)ppGpp<sup>0</sup>株の最少培地において生育回復する抑圧変異株が取得され、*de novo* GTP 生合成経路関連遺伝子に抑圧変異が同定されていた(Kriel *et al.*, Mol. Cell 2012)。この結果は、枯草菌がアミノ酸飢餓条件に適応する上で、(p)ppGpp が GTP 生合成を制御することの重要性を裏付けるものであった。しかし、これらの抑圧変異株のスクリーニングには、メチオニン要求性を持つ株が用いられており、最少培地にメチオニンを添加した条件でスクリーニングが行われていた。メチオニンは緊縮応答時に生合成が促進されるアミノ酸の一つであることから、過去のスクリーニングでは(p)ppGpp による制御機構、アミノ酸飢餓への適応において GTP 量の変化が持つ生理的意義について、見落とされている側面が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では、栄養状態の変化に適応する上で重要な細胞内 GTP の量的制御の体像を解明することを目指し、メチオニン要求性を持たない(p)ppGpp<sup>0</sup>株を用いて、最少培地において生育回復に関わる遺伝子解析を行うこととした。

## 【方法・結果】

### 1. (p)ppGpp<sup>0</sup>株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異株の取得と解析

まず最少培地から(p)ppGpp<sup>0</sup>株がコロニー形成できるようになった抑圧変異株を約 70 株取得した。それらの中から、既知の抑圧変異である *de novo* GTP 生合成関連遺伝子に変異が落ちていた株を除外した 21 株の抑圧変異株について、次世代シーケンサーを用いたマッピング解析を行った。その結果、GTP 生合成経路上流に位置するプリンヌクレオチド生合成経路の酵素遺伝子(*prs*, *purF*)、RNA ポリメラーゼ(RNAP)コア酵素をコードする *rpoB/C* といった、GTP 生合成には直接関与しない新規な抑圧変異を多数同定した。

## 2. 新規抑圧変異(*prs*, *rpoB/C*)による(p)ppGpp<sup>0</sup>株の生育阻害抑圧メカニズムの解析

新規抑圧変異株のうち、プリンヌクレオチド生合成経路初発酵素遺伝子 *prs*, 及び RNAP コア酵素をコードする *rpoB/C* に抑圧変異を同定した株について、アミノ酸飢餓への適応性と細胞内 GTP 量との関連性について解析を行った。過去の報告において、GTP 生合成に直接関与する遺伝子に抑圧変異が生じた株では、細胞内 GTP/ATP 量比の低下度合いがアミノ酸飢餓誘導条件での生菌率と比例することが示されている(Kriel *et al.*, Mol. Cell, 2012; Kriel *et al.*, J. Bacteriol, 2014)。本研究で取得された新規抑圧変異株も、過去に取得された GTP 生合成に直接関与する遺伝子の抑圧変異株について行われたのと同様のアミノ酸飢餓誘導条件において、(p)ppGpp<sup>0</sup> 株と比較して有意に生菌率の回復が見られた。このうち抑圧変異株 *prs* では、正味の細胞内 GTP 量の低下が見られた。一方で、抑圧変異株 *rpoB/C* では、細胞内 GTP 量の有意な低下は見られなかった。また、*rpoB* の ORF 内に抑圧変異を同定した株(以下 *rpoB1*(p)ppGpp<sup>0</sup>) における遺伝子発現の変化を、RNA-seq を用いて網羅的に解析したところ、アミノ酸飢餓誘導条件・非誘導条件、いずれにおいても、緊縮応答時に生じる遺伝子発現の変化を部分的に模倣する傾向の転写プロファイルが見られた。以上の結果を踏まえると、まず抑圧変異 *prs* は、プリンヌクレオチド上流の変異によって、既知の GTP 生合成経路の抑圧変異と同様、GTP 量の低下によって(p)ppGpp<sup>0</sup> 株の生育阻害を抑圧したと考えられる。対して抑圧変異 *rpoB/C* は、GTP 生合成自体には直接的に影響せず、その一方で、RNAP の質的变化を引き起こす結果、本来、緊縮応答時の GTP/ATP 量変化がもたらす遺伝子発現の変化を、部分的に模倣したことで生育阻害を抑圧しているものと考えられる。

## 3. 抑圧変異による(p)ppGpp<sup>0</sup>株の生育回復をメチオニンが阻害する効果とその原因の解析

本研究において(p)ppGpp<sup>0</sup>株の生育阻害を抑圧する変異を同定した *prs*, *rpoB/C* は、過去の研究においては全く同定されなかった。本研究と過去の抑圧変異株のスクリーニング条件の違いとして、メチオニンの有無が挙げられる。このことから、メチオニン存在下では新規抑圧変異による生育回復効果が阻害されるのではないかと考え、最少培地メチオニン添加・非添加条件(MM±Met)における新規抑圧変異株の生育を比較した。その結果、抑圧変異株 *rpoB/C* は、いずれも MM+Met 条件において顕著な生育阻害を示した(メチオニン感受性)。一方で過去に同定されていた GTP 生合成に直接関与する遺伝子に抑圧変異を持つ株、及び抑圧変異株 *prs* においてはメチオニンの有無による生育への影響は殆ど見られなかった。以上の結果から、メチオニンは *rpoB/C* 変異による生育回復効果を打ち消すことが示唆された。抑圧変異株 *rpoB/C* とその他の抑圧変異株の相違点として、抑圧変異株 *rpoB/C* では細胞内 GTP 量の有意な低下は見られないことが挙げられる。このことから、抑圧変異株 *rpoB/C* は細胞内 GTP 量の上昇する要因に対し、他の抑圧変異株と比較して感受性が高いことが考

えられた。実際に、最少培地における抑圧変異株 *rpoB/C* の生育は、GTP salvage 合成の基質である guanosine の添加により阻害されたため、細胞内 GTP 量を上昇させることで、抑圧変異株 *rpoB/C* の生育回復効果を打ち消していたのではないかと考えた。GMP 合成酵素 GuaA の阻害剤 decoyinine を MM+Met 条件に添加したところ、*rpoB1 (p)ppGpp<sup>0</sup>* 株のメチオニン感受性は部分的に回復した。また、MM±Met 条件における細胞内 GTP 量を、HPLC を用いて解析したところ、野生株においてはメチオニンの添加・非添加で細胞内 GTP 量に殆ど変化が見られなかったのに対し、*rpoB1 (p)ppGpp<sup>0</sup>* 株においては、メチオニン添加条件で細胞内 GTP 量の顕著な上昇が見られた。以上の結果から、抑圧変異株 *rpoB/C* が示すメチオニン感受性は細胞内 GTP 量の上昇に起因することが示唆された。

#### 4. GTP 生合成と Methionine 代謝とを結びつける制御機構の解析

これまでの研究において、メチオニン感受性は *de novo* GTP 生合成に直接関与する遺伝子の抑圧変異株は示さなかったこと、一方で *rpoB1 (p)ppGpp<sup>0</sup>* 株が示したメチオニン感受性は、GMP 合成酵素 GuaA の阻害剤 decoyinine の添加により部分的に相補されたことを踏まえ、メチオニン添加による細胞内 GTP 量の上昇は、メチオニン、またはその代謝産物が、*de novo* GTP 生合成のいずれかの律速段階を(少なくとも GuaA より上流の律速段階で)促進していると推察した。そこで *de novo* GTP 生合成経路の各酵素のドメイン構造について調べたところ、本研究では IMP dehydrogenase(GuaB)に着目するに至った。GuaB は ATP と GTP の生合成の分岐点にある IMP から XMP を合成する反応を触媒する GTP 生合成の律速酵素である。GuaB には CBS domain (bateman domain) と呼ばれる機能未知な subdomain が進化的に保存されている。CBS domain は多くの生物に、IMP dehydrogenase に限らず保存されており、主に Adenine base を持つ化合物がリガンドとして作用することが知られている。しかし、IMP dehydrogenase の CBS domain に対して何がリガンドとして作用し、酵素の機能に対してどのように関与しているのかについてはあまり理解されていない。IMP dehydrogenase 以外の CBS domain を持つ酵素において、メチオニン代謝に関与する因子がリガンドとして作用する例を調べたところ、超高温性細菌 *Methanocaldococcus jannaschii* の持つ機能未知酵素 Mj0100 の CBS domain にメチオニンの代謝産物である S-Adenosyl Methionine(SAM), 及び Methylthio adenosine(MTA)がリガンドとして作用することが報告されていた(Lucas M *et al.*, J. Mol. Biol. 2010)。Mj0100 と SAM, MTA との共結晶構造解析の結果から、CBS domain において SAM, MTA との結合に関与するアミノ酸残基も同定されており、枯草菌 GuaB と Mj0100 との CBS domain のアミノ酸配列比較を行ったところ、枯草菌 GuaB CBS domain において SAM との結合に関与するアミノ酸残基がいくつも保存されていることが分かった(GuaB Leu114, Ile120, Val123, Ile137, Thr139, Val163, and Leu198)。このうち枯草菌 *guaB* のアミノ酸残基の変

異:T139I と, I120, V123 近傍のアミノ酸残基の変異: S121F は, 過去に(p)ppGpp<sup>0</sup>株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異として同定されていた(Krikel *et al.*, Mol. Cell, 2012)。さらに, 本研究においても(p)ppGpp<sup>0</sup>株の最少培地における生育阻害を抑圧する変異として, L198 の近傍に位置するアミノ酸残基の変異(K196E)を同定した。そこで, これらの変異をそれぞれ *rpoB1* (p)ppGpp<sup>0</sup>株に導入し, MM±Met 条件における生育を検証した。その結果, いずれの変異によっても, メチオニン感受性は完全に相補された。以上の結果から, メチオニンの代謝産物である SAM が, GuaB の酵素活性を CBS domain を介して正に制御し, GTP 生合成を活性化させる可能性が示唆された。

### 【総合討論】

細胞内における GTP 量の恒常性を維持することは, 全ての生物において重要である。合成酵素の保存性から, (p)ppGpp は細菌, 及び植物の葉緑体にまで保存されており, GTP 量の恒常性に必須な役割を担っているとされている(真核生物においては(p)ppGpp を合成する機構は未だ見つかっていない)。本研究における枯草菌(p)ppGpp<sup>0</sup>株を用いた解析から, 栄養状態に応じた代謝変化に重要な細胞内 GTP の量的制御に, メチオニン代謝が関与しているという新規な関係性が示唆された。その機構として, メチオニン代謝産物である SAM が GuaB の CBS domain を介して正に制御するモデルを提唱したが, SAM は必須な生体分子であるため, どの生物も持っているのに加え, GuaB(IMPDH)も CBS domain と共に, 細菌からヒトまで広く保存されている。このことから, 本研究で見出した機構は(p)ppGpp による制御との関連性に留まらず, 生物普遍的に適応されうることが考えられる。メチオニンは翻訳の開始に利用される重要なアミノ酸であり, その代謝産物である SAM も, 生体分子のメチル化におけるメチル基供与体であることや, 鉄硫黄タンパクの鉄硫黄クラスターの形成に関与するなど, あらゆる生体反応に必須な化合物である。このように GTP 生合成とメチオニン代謝は, いずれも細胞の増殖に重要な役割を担っていることから, これらが, 栄養状態に応じて共役的に制御されていることは, 理に適っていると考えられる。故にメチオニン代謝と細胞内 GTP の量的制御との関係性は, 生物が外界の栄養状態に応じて細胞内の代謝を変化させ, 増殖・分化を制御する機構の全体像の解明の一端に迫るものと考えられる。

## 審査報告概要

本研究では, 細菌のアミノ酸飢餓応答等の環境適応に密接に関与する細胞内 GTP 量の制御機構を, グラム陽性土壌細菌である枯草菌を用いて解析した。細胞内 GTP 量は核酸小分子

(p)ppGpp 合成により制御されているが, (p)ppGpp 合成能欠損から生じる増殖阻害を抑圧する変異を, RNA 合成酵素遺伝子 *rpoB/C* 等に, 新奇に多数同定した。これらの変異は転写様式を改変することで (p)ppGpp が無くても環境適応可能とする変異であることを, 網羅的な遺伝子発現解析を通じて明らかにした。また, この増殖阻害の抑圧効果はメチオニン添加によって細胞内 GTP 量が著しく上昇することで打ち消され, 再び増殖が阻害されることを見出した。以上の結果は, GTP 生合成がメチオニン異化システムによって正に制御される, これまで全く知られていない代謝リンクの存在を初めて明らかにした点で高く評価される。これらの研究成果を詳細に検針した結果, 審査員一同は博士 (バイオサイエンス) の学位を授与する価値があると判断した。