

氏 名 鶴 飼 英 樹

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第295号

学位授与の日付 平成9年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 大腸菌の細胞分裂機構欠損株 (ftsF^{ts}) の増殖停止機構
—K⁺ポンプの欠失

論文審査委員 主 査 教 授 嶋本 伸雄
教 授 石濱 明
助 教 授 藤山 秋佐夫
助 教 授 定家 義人
教 授 松澤 洋 (東京大学)

論文内容の要旨

大腸菌の多くの細胞分裂遺伝子の破壊株は、分裂だけでなく細胞成長（細胞質の増加）も停止させる。分裂と細胞成長の関係を研究するために、いくつかの細胞分裂遺伝子の破壊株の細胞成長を研究した。その結果、分裂遺伝子の一つftsE^{ts}変異株の成長停止のpH、カリウムイオン依存性から、カリウムイオンポンプの関与が示唆されたので、ftsE^{ts}変異株に注目し、細胞成長停止の分子生物学的にカリウムイオンポンプの関与を追求した。

大腸菌に存在する三種のカリウムイオンポンプの構成成分である4種の膜蛋白質、KdpA、KdpC、TrkH、Kupと、ポンプの発現に必要な膜蛋白質KdpDについて、PhoAとの融合蛋白質を構築し、これらのふるまいを調べた。抗PhoA抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、30°Cで培養したftsE^{ts}の膜画分からは、これらの5つの融合蛋白質が正常に検出された。一方、41°Cで培養したの膜画分からは、KdpA-PhoA、TrkH-PhoA、及びKup-PhoAがほぼ完全に欠失していた。また、ftsE⁺では温度に関係なく全ての融合蛋白質が検出された。KdpA-PhoA、TrkH-PhoA、及びKup-PhoAの3つをコードするプラスミドは、各々*kdpA*⁻、*trkH*⁻、及び*kup*⁻変異を相補した。ftsE^{ts}では、41°Cでカリウムイオンポンプがないという結論が得られた。

41°Cへの温度シフト後、KdpA-PhoAは、どの株の膜内でも分解されず3時間は安定であった。また、41°Cで3時間培養した両株から*kdpA-phoA* mRNAを定量した結果差は見られなかった。膜以外の画分にKdpA-PhoAが残存している可能性も、継時的に培養液全体のTCA非可溶画分についてウエスタンブロッティング解析を行なった結果否定された。以上の結果からftsE^{ts}を41°Cで培養すると、3種類の融合蛋白質KdpA-PhoA、Kup-PhoA、及びTrkH-PhoAは、(1)全く合成されない、または(2)合成されても直ぐに分解される、あるいは(3)真核生物で見られるような共翻訳輸送(cotranslational transport)系が存在し、FtsEがその構成成分である、の3つの可能性が示された。

また欠失していた3種の融合蛋白質は、ftsE⁺と30°CでのftsE^{ts}では、総膜蛋白質量に対する割合は常に一定であったが、ftsE^{ts}で培養温度を41°Cに切り換えると培養液濁度が2倍に増加するまではこの割合は変化しないが、その後培養液のOD₆₀₀値の増加に反比例してこの割合が減少した。このとき、ftsE^{ts}の細胞分裂は、培養液の濁度が1.8倍に増加した後停止した。つまり、ftsE^{ts}では分裂直後にこれらの融合蛋白質が新たに膜に組み込まれなくなった。一方ftsE⁺を栄養の異なる培地中で41°Cで培養するとOD₆₀₀の倍加時間は4.6倍の差があったが、培養時間に関係なくOD₆₀₀が32倍に増加すると細胞成長が停止し、カリウムイオンポンプ蛋白質量が野生型細胞の場合の1/16に減少した時に細胞成長が停止することが解った。

これらの結果から、カリウムイオンポンプの欠失がカリウムイオンの低下を招き、蛋白合成等が阻害され、ftsE^{ts}変異株の細胞成長を停止させるというモデルが提案できた。

論文の審査結果の要旨

鵜飼君は、大腸菌における細胞分裂と細胞成長（細胞質の増加）との関係を、追求することから研究を開始した。そして、細胞分裂遺伝子の一つftsE^s変異株の成長停止のpH、カリウムイオン依存性が、カリウムイオンポンプの関与を示唆したので、ftsE^s変異株に注目し、細胞成長停止の原因を分子生物学的に追求した。

大腸菌の三種のカリウムイオンポンプの構成成分である4種の膜蛋白質、KdpA、KdpC、TrkH、Kupと、ポンプの発現に必要な膜蛋白質KdpDについて、PhoAとの融合蛋白質を構築し、抗PhoA抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、膜画分内で定量した。30°Cで培養したftsE^sの膜画分からは、これらの5つの融合蛋白質が検出されたのに対し、41°Cで培養したの膜画分からは、KdpA-PhoA、TrkH-PhoA、及びKup-PhoAが欠失していた。また、ftsE^sでは温度に関係なく全ての融合蛋白質が検出された。また、KdpA-PhoA、TrkH-PhoA、及びKup-PhoAの3つをコードするプラスミドは、各々*kdpA*⁻、*trkH*⁻、及び*kup*⁻変異を相補したので、PhoAとの融合蛋白質の振る舞いは、KdpA、TrkH、Kup蛋白質の振る舞いと考えられた。これらの結果は、ftsE^sでは、41°Cでカリウムイオンポンプがないことを明らかにしていた。

41°Cへの温度シフト後、KdpA-PhoAは、どの株の膜内でも分解されず3時間は安定であった。また、41°Cで3時間培養した両株から*kdpA-phoA* mRNAを定量した結果、有意差はなかった。継時的に得られた培養液の酸不溶画分についてウエスタンブロッティング解析を行なった結果、膜以外の画分にもKdpA-PhoAは残存していなかった。以上の結果から、ftsE^sを41°Cで培養すると、3種類の融合蛋白KdpA-PhoA、Kup-PhoA、及びTrkH-PhoAは、(1)全く合成されない、(2)合成されても直ぐに分解される、(3)真核生物で見られるような共翻訳輸送(cotranslational transport)系が存在し、FtsEがその構成成分であるの3つの可能性が示された。

また欠失していた3種の融合蛋白質の総膜蛋白質量に対する割合は、ftsE^sと30°CでのftsE^sでは常に一定であったが、ftsE^sでは、培養温度を41°Cに切り換えると培養液濁度が2倍に増加した後培養液のOD₆₀₀値の増加に反比例してこの割合が減少した。また、ftsE^sの細胞分裂も同時期に停止したので、ftsE^sでは、分裂直後にこれらの融合蛋白質が新たに膜に組み込まれなくなったことが示された。一方ftsE^sを栄養の異なる培地中で41°Cで培養すると、OD₆₀₀の倍加時間に関係なくOD₆₀₀が32倍に増加すると細胞成長が停止し、カリウムイオンポンプ蛋白質量が野生型細胞の場合の1/16に減少した時に細胞成長が停止することが解った。

これらの結果から、カリウムイオンポンプの欠失がカリウムイオンの低下を招き、蛋白合成等が阻害され、ftsE^s変異株の細胞成長を停止させるというモデルが提案された。

提出された論文（和文）は、以上の研究に用いられた手法、得られた結果、それに基づく議論を明瞭に記述し、その内容は、学位の要件を満たすものであった。公開発表に続き、5名の審査委員と鵜飼君との間で質疑応答がなされた。その議論と提出された論文を元に、博士論文及び関連分野での知識、実験結果の解釈とその有効性について審査委員で審議し、学位にふさわしい知識と考察力、および英語による表現力を有していると判断した。