

東邦大学審査学位論文(博士)の要旨

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

2015年入学	研究分野 分子生物学	氏名 川上 直輝
審査委員	(主査) 理学研究科教授 藤崎 真吾 (副査) 理学研究科教授 内田 朗 (副査) 理学研究科教授 佐藤 浩之	
(論文題目) 黄色ブドウ球菌における脂質リン酸化・脱リン酸化のウンデカプレニルリン酸代謝および細胞壁合成への寄与の解析		
<p>(論文審査の要旨及び審査結果の要旨)</p> <p>ウンデカプレニルリン酸 (UP) は細菌の細胞壁合成に必須の物質である。新規生合成においては、鎖延長反応により細胞内で合成されたウンデカプレニルリン酸 (UPP) の脱リン酸化反応により生成する。細胞壁合成経路では、細胞膜内側において UP から生成する糖脂質中間体が特異的なフリッパーゼの作用により細胞膜外側に移動する。細胞膜外側で細胞壁多糖鎖の伸長とともに UPP が遊離し、この UPP の脱リン酸化により UP が再生する。大腸菌では BacA および Type2 phosphatidic acid phosphatase (PAP2) family に属する PgpB, YbjG が UPP 脱リン酸化に関わる。ウンデカプレノール (UOH) は、多くのグラム陽性菌に UP と同程度の量含まれている。UOH は DgkA ホモログにより UP に転換されることが知られているが、それ自体の機能について詳細は不明である。</p> <p>本論文は、黄色ブドウ球菌を材料にして DgkA ホモログ、BacA ホモログ、PAP2 family タンパク質の UP 生成、細胞壁合成への寄与を解明することを目的として、これらの遺伝子をクローニングし、大腸菌において発現させた遺伝子産物の酵素活性を明らかにするとともに、遺伝子欠損株を作成し性質を調べた結果をまとめたものである。</p> <p>黄色ブドウ球菌 ATCC29213 株のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い <i>dgkA</i>、<i>bacA</i>、<i>pptA</i>、<i>pptB</i> (大腸菌の PAP2 に相同性が高い方を <i>pptA</i> とした) をクローン化した。次に RN4220 株を親株として遺伝子交換用ベクター-pKOR1 を用いてこれら 4 遺伝子の単独および多重破壊株を順次作成した。<i>bacA</i> 欠損と <i>pptB</i> 欠損を共に持つ株を除いて単独破壊株 4 株、二重破壊株 5 株、三重破壊株 2 株が得られた。<i>bacA</i> 欠損と <i>pptB</i> 欠損の組み合わせが致死であることを証明するため <i>pptB</i> 破壊株に対しエリスロマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊された <i>bacA</i> を形質導入する実験を行った。Φ80αにより対照株には形質導入ができる条件においても <i>pptB</i> 破壊株には形質導入できず、さらにプラスミドに <i>bacA</i> 遺伝子をもつ条件で作成した二重破壊株からプラスミドを脱落させることはできなかった。こ</p>		

これらの結果より *bacA*, *pptB* の二重欠損は致死であるとした。

クローニングした各遺伝子を大腸菌で発現させ産物を精製して酵素活性を調べた。形質転換菌をイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) 存在下低温で培養することにより pColdI につないだ *dgkA* を発現させ、菌を破碎後、沈殿画分からヘキサヒスチジンタグ (His_6) 融合タンパク質を Triton X-100 で可溶化して Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose カラムクロマトグラフィーにかけて精製した。精製標品は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において 15 kDa に濃いバンド、20 kDa に薄いバンドをあたえ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とウンデカプレノールを基質としたとき脂質画分に放射能を取りこむリピドキナーゼ活性を示した。分子量、基質特異性、基質の K_m 値などが先行研究において黄色ブドウ球菌から酵素活性を指標に精製されたウンデカプレノールキナーゼと一致したので同一物とみなされるとした。

bacA は pBAD/HisA につなぎ、形質転換菌をアラビノース存在下培養して発現させた。菌を破碎後、 His_6 融合タンパク質を膜画分よりドデシルマルトピラノシドにより可溶化して Ni-NTA agarose カラムクロマトグラフィーにより精製した。電気泳動で 30 kDa のバンドを与える精製産物を用いて $[\text{C}^{14}]\text{UPP}$ を基質として活性測定を行い、 Mg^{2+} に依存して基質を脱リン酸化し $[\text{C}^{14}]\text{UP}$ を生成する活性を検出した。 $[\text{C}^{14}]\text{UP}$ を脱リン酸化し $[\text{C}^{14}]\text{UOH}$ を生成する活性は認められなかった。

pptB は pColdI につなぎ、形質転換菌を IPTG 存在下低温で培養して発現させた。菌を破碎後、 His_6 融合タンパク質を膜画分よりドデシルマルトピラノシドにより可溶化して Ni-NTA agarose カラムクロマトグラフィーにより精製した。電気泳動で 26 kDa のバンドを与える精製産物を用い $[\text{C}^{14}]\text{UPP}$ を基質として活性測定を行ったが酵素活性は認められなかった。そこで、PAP2 ファミリーの遺伝子を全て欠く大腸菌を宿主として組換え遺伝子を発現させ、菌を破碎して超遠心分離により膜画分を得て $[\text{C}^{14}]\text{UPP}$ を基質として活性測定を行った。EDTA を加えて Mg^{2+} をマスクした条件において、 $[\text{C}^{14}]\text{UP}$ が生成し、さらに $[\text{C}^{14}]\text{UOH}$ が生成することを確認した。*pptA* を pColdI, pBAD/HisA につないだプラスミドを作成し大腸菌における発現を試みたが組換えタンパク質の生成を確認することはできなかった。

以上の結果、および、研究室の同僚による遺伝子破壊株の UP, UOH 含量の測定結果より、黄色ブドウ球菌において *in vivo* での UPP の UP への脱リン酸化は BacA または PptB のいずれかにより担われていること。PptB は UP から UOH の生成にも関わること、DgkA は UOH から UP の生成に関わることを明らかにした。

以上のように本論文提出者は、黄色ブドウ球菌におけるリピドホスファターゼおよびリピドキナーゼの役割を特定し UP 代謝への影響を明らかにした。特に PAP2 ファミリーの酵素が UOH 生成に関わるという知見は新規性が高い。また、作成した UP, UOH の含量に違いがある変異株は UOH の機能を解明していく強力なツールとなりうる。これらの知見の学問的価値は高く、審査委員は一致して本論文提出者が博士の学位を受けるのに十分な学力と資格があると認めた。

論文要旨

氏名 川上 直輝

論文題目

黄色ブドウ球菌における脂質リン酸化・脱リン酸化のウンデカプレニルリン酸代謝および細胞壁合成への寄与の解析

論文要旨

[序論] ウンデカプレニルリン酸 (UP) は細胞壁を含む細胞表面多糖の合成に関与する脂質である。UPは大腸菌においては *bacA* 産物および 2 型ホスファチジン酸ホスファターゼ (PAP2) ファミリーの酵素によりウンデカプレニルリン酸 (UPP) が脱リン酸化されて生成する。グラム陽性菌においては *dgkA* ホモログの産物によりウンデカプレノール (UOH) がリン酸化されて生成する経路が知られている。黄色ブドウ球菌においては特定の遺伝子産物の酵素活性を明らかにした研究はなかった。本研究では黄色ブドウ球菌に 2 個存在する PAP2 ファミリーの遺伝子 (*pptA*, *pptB*)、および、*bacA* ホモログ、*dgkA* ホモログそれぞれの脂質代謝および表現型への寄与を調べることを目的とした。遺伝子破壊株の系統的な作成、遺伝子産物のリピドキナーゼ活性、リピドホスファターゼ活性の測定および作成した破壊株の薬剤感受性の評価を行なった。

[方法] 対立遺伝子交換用ベクター pKOR1 にそれぞれの遺伝子の読み枠の大部分を除いた破壊遺伝子をサブクローニングしたプラスミドを用い遺伝子交換を行なった。*bacA* と *pptB* の二重欠損が致死であることを確認するために、エリスロマイシン耐性 (Em^r) トランスポゾン変異株 NE480 (*bacA::Em^r*) をドナーとし、形質導入用ファージ ϕ 80 α を用いて RN4220 株と RN4220 由来の *pptB* 破壊株 RN4220 Δ *pptB* への形質導入を行なった。*dgkA*, *bacA*, *pptB* を大腸菌で発現し、遺伝子産物の酵素活性を調べた。得られた破壊株のシリーズの薬剤感受性を Clinical & Laboratory Standards Institute の方法に基づき寒天平板希釈法で評価した。

[結果] 共同研究者が作成した二重破壊株 RN4220 Δ *bacA* Δ *pptA*、RN4220 Δ *pptA* Δ *pptB* を pKOR-*dgkA* により形質転換し、三重破壊株 RN4220 Δ *bacA* Δ *pptA* Δ *dgkA*、RN4220 Δ *pptA* Δ *pptB* Δ *dgkA* を作成した。*pptB* 欠損株への Em^r 挿入変異型 *bacA* の形質導入は薬剤耐性コロニーが得られず、*bacA* と *pptB* の欠損は合成致死であることがわかった。大腸菌で発現した DgkA は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で 15 kDa および 20 kDa の位置に泳動され、ATP と UOH を基質に UP を生成する活性を示した。大腸菌で発現した BacA は SDS-PAGE で 30 kDa の位置に泳動され、UPP を UP まで脱リン酸化する活性を示した。大腸菌で発現した PptB は SDS-PAGE で 26 kDa の位置に泳動されたが、精製により失活していた。PptB を含む大腸菌膜画分は UPP を UP、さらに UOH まで脱リン酸化する活性を示した。薬剤感受性試験において *bacA* 破壊株のバシトラシン感受性の増強が認められた。

[考察] 酵素活性測定は、DgkA が UOH キナーゼ、BacA および PptB が UPP ホスファターゼとして UP の産生に寄与し、また PptB が UP ホスファターゼとして UOH の産生に寄与できることを示した。また UP 合成は生存に関与する細胞壁合成に必須であるので、*bacA* と *pptB* の合成致死はこれらの遺伝子産物が黄色ブドウ球菌の生菌において UP の生成に寄与していることを示唆している。薬剤感受性の結果は、*bacA* が黄色ブドウ球菌の生菌において主要な UPP ホスファターゼであるか、薬剤に応答して調節されていることを示している。