

# 論文概要

人間総合科学研究科 猪瀬 由美子

## 目的：

細菌の環境変化に応答した遺伝子発現は、主として転写レベルで決定される。細菌は転写装置である RNA ポリメラーゼを1種類しか持たないが、複数種のシグマ因子を使い分けることで発現する遺伝子のパターンを変化させる。例えば、枯草菌(以下 *B. subtilis*) では18種のシグマ因子が知られており、それぞれの因子は異なるプロモーター配列(転写開始シグナル)を認識することで、特定の遺伝子群の転写を誘導する。黄色ブドウ球菌(以下 *S. aureus*) ではこれまで2種類のシグマ因子しか知られていなかった。

本研究では、*S. aureus* の全シグマ因子を同定し、各因子がどのような役割を果たしているのかを調べることにより、シグマ因子を中心とした環境応答機構を明らかにすることを目的とした。

## 対象と方法：

- ・ *S. aureus* の各シグマ因子に対する特異的抗体(IgY)を作製し、定量的ウェスタン法の確立を試みた。
- ・ *sigB* の破壊株および過剰発現株の解析により、SigB が環境応答やストレス耐性に果たす役割を調べた。
- ・ 近縁種である *B. subtilis* の全シグマ因子に「位置的に対応」する遺伝子を検索し、新たな因子の同定を試みた。

## 結果：

細胞内のシグマ因子の蓄積量を調べた結果、SigA は増殖期を通じて一定であった。SigB の蓄積量は増殖期を通じてほぼ一定レベルを示したが、その活性は定常期において増強した。このことは SigB の蓄積を一定レベルに保ちながら、その活性を制御するシステムが存在することを意味する。これは急激な環境変化に対応してSigB の活性化を即座に行うために有利であると考えられた。

*sigB* を過剰発現させると細胞壁の肥厚が見られ、細胞壁合成を阻害する -ラクタム剤に対して高度耐性が誘導された。高度耐性を示す臨床分離MRSA(メチシリン耐性株)においても、SigB の蓄積量と活性がともに高いことが確認された。本菌は、薬剤に親和性が低いペニシリン結合タンパク質遺伝子(*mecA*)を発現することにより、-ラクタム剤に対してある程度耐性を示す。

*mecA* を恒常的に発現する株に*sigB* を過剰に発現させると、メチシリンに対する耐性度は増強することから、 $\beta$ -ラクタム剤に対する高度耐性化には、*mecA* の発現に加えて SigB の高度な蓄積が重要な要因であることが示唆された。

また、属種を越えて遺伝子の配置が保存されていることに着目することにより、シグマ因子遺伝子 (SA0492) を同定することに成功した。本因子は *B. subtilis* の *sigH* (胞子形成開始およびコンピテンス：細胞外 DNA 取り込みを制御するシグマ因子遺伝子) に位置的に対応し、*Streptococcus* 属においては類似クラスターの近傍に *comX* (コンピテンスを制御するシグマ因子遺伝子) が存在した。系統解析および遺伝学的解析により、本因子がコンピテンス関連遺伝子のホモログの転写を誘導することを証明した。この遺伝子のプロモーター下流に緑色蛍光タンパク質遺伝子 *gfp* をつないだレポーター株を作製しその発現を調べた結果、本因子は「一部のアミノ酸欠乏 + 嫌気 + 静置培養」という複合的な環境によって活性を示した。

## 考 察：

最近のメチシリン高度耐性株は *mecA* を恒常的に発現しているが、その発現量と耐性度との間には相関が認められない。したがって、高度耐性化には *mecA* の恒常的な発現に加えて別の因子が関与していると考えられている。*mecA* を恒常的に発現させた株に *sigB* を過剰発現させると  $\beta$ -ラクタム剤に高度耐性を示すことから、SigB の過剰な蓄積が細胞壁合成系の亢進あるいは分裂増殖速度の抑制により、高度耐性化を実現している可能性が考えられる。

本研究で同定したシグマ因子 SA0492 が活性を示すのはバイオフィーム内と類似した条件であり、フィルム内で本遺伝子が活性を持つことが生物学的に何らかの重要な役割を果たしているものと考えられた。本菌においてはコンピテンスが実験的に証明されていないが、必須遺伝子群がほぼ備わっている。このことはその能力を保持している可能性を示すものであり、自然界ではこうしたフィルム内で SA0492 の活性化を介して、外部から病原因子や耐性遺伝子を獲得しているのかもしれない。

## 結 論：

本菌のシグマ因子は少なくとも 3 つ存在し、各因子の活性調節による転写制御が存在することを示した。SigB と SA0492 の代替シグマ因子は、それぞれ薬剤耐性および遺伝子の獲得といった本菌が適応・進化する上で重要なシステムを支配していることが明らかとなった。