

学位論文題名

Functional analysis of resuscitation promoting factor
from *Tomitella biformata* AHU1821^T

(*Tomitella biformata* AHU1821^T の産生する覚醒促進因子の機能解析)

学位論文内容の要旨

Resuscitation promoting factor (Rpf) is a protein that promotes the growth of active dividing cells and resuscitates dormant non-dividing cells. An exclusive and wide distribution of *rpf* gene homologs within Actinobacteria suggested that Rpf may have an important role in the life cycle of non-spore forming bacteria, in which little is known about the mechanisms controlling dormancy and re-growth. However, only purified Rpf proteins from three species have been studied. To understand the roles played by Rpf especially in respect to the diverse habitat of Actinobacteria, searching for other functional Rpf within this group becomes essential.

Previous study in this laboratory revealed that *Tomitella biformata* AHU 1821^T, a novel non-spore forming Actinobacteria isolated from permafrost ice wedge, possessed *rpf* gene homologs. The deduced amino acid sequence was 44.9% identical to RpfB in *Mycobacterium tuberculosis*, the closest functionally tested. The objectives of this study were to determine the function of Rpf from *T. biformata*.

Biological activity of Rpf from *T. biformata*

Incubation of *T. biformata* in oxygen-limited conditions in modified minimal medium (mMMF) for 60 days resulted to the formation of non-dividing cells, in which approximately 99% of the cells lost cultivability on agar medium but retained membrane integrity and exhibited a distinct morphological characteristic in TEM.

Recombinant Rpf (rRpf) of *T. biformata*, expressed in *Escherichia coli*, showed activity in promoting growth in a low initial concentration of dividing cells and resuscitating non-dividing cells by reducing the lag phase in mMMF culture. However higher concentrations was required to produce activity compare to other known functional Rpf indicating that this Rpf was active but not identical to previously studied

Rpfs.

Bioinformatics analysis indicated that *T. biformata* Rpf was placed in monophyletic branch within the RpfB subfamily. The genomic structure of Rpf in *T. biformata* also differed from *M. tuberculosis* RpfB in the number of DUF348 domain and length of linker region between the second DUF348 domain and the G5 domain. These differences might contribute to the functional variation of *T. biformata* Rpf.

Rpf as a growth factor to promote colony formation of environmental sample

Recombinant Rpf was used for the cultivation of permafrost ice wedge sample. The colony formation unit on plates amended with rRpf increased rapidly and colonies appeared earlier than non-amended plates. Two prominently increasing colony types appeared on Rpf amended plate were related to *Brevibacterium* sp. and *Arthrobacter rhombi* F98 based on partial 16s rRNA analysis. This result indicated that Rpf from *T. biformata* had a cross species activity. In early incubation period, the addition of exogenous Rpf protein might promote growth of other dividing cells.

This research exhibited that Rpf from *T. biformata* had a cytokine-like activity but genetically different from other functional tested Rpf. It also shows cross species recognition within other member of Actinobacteria. This study provides the evidence of functional differentiation of Rpf produced by the member of Actinobacteria and possibility of using Rpf as a growth factor for isolation of Actinobacteria from environmental sample.

学位論文審査の要旨

主査	教授	浅野	行蔵
副査	客員教授	鎌形	洋一
副査	准教授	曾根	輝雄
副査	特任准教授	田中	みち子

学位論文題名

Functional analysis of resuscitation promoting factor from *Tomitella biformata* AHU1821^T

(*Tomitella biformata* AHU1821^T の産生する覚醒促進因子の機能解析)

本論文は英文107頁、図16、表6、5章からなり、参考論文2編が付されている。

覚醒促進因子(Rpf)は活発に分裂する細胞の生育を促進し、休眠状態にある非分裂細胞を覚醒するタンパク質である。*rpf*遺伝子ホモログがもっぱらアクチノバクテリア門だけに広く分布するという事実から、Rpfタンパク質がこのグループの細菌の生活環に重要な役割を果たすだろうと予想されるが、無芽胞細菌では休眠状態や再増殖の制御機構についてあまり知られていない。タンパク質として精製され、機能活性が確かめられている3種の細菌の*rpf*遺伝子は、それぞれの長さ、遺伝子構造に違いがあり、活性や活性のある対象も異なる。特に、アクチノバクテリア門の多様な生息環境を考慮すると、Rpfタンパク質の役割を理解し、多様な微生物集団を培養するために、この門における様々な機能的Rpfを探索し解析することが必要不可欠である。

当研究室における先行研究により、永久凍土氷楔から単離された新規無芽胞放線菌*Tomitella biformata* AHU1821^T が*rpf*遺伝子ホモログをもつことが明らかとなった。推定アミノ酸配列は、*Mycobacterium tuberculosis*が持つ既知の活性の確かめられたRpfBに最も近縁であり、44.9%の相同性を示した。本研究の目的はこの*T. biformata*由来Rpfの生物学的機能を解析することである。

1. *T. biformata*由来Rpfの生物学的活性

生物学的活性測定のために、まず非分裂状態の細菌細胞を誘導することが不可欠であった。改変最小培地 (mMMF)で 60日間、酸素制限条件下で培養すると、*T. biformata*は非分裂状態へ移行した。この状態では約99%の細胞が平板培地上でコロニー形成能を失ったが、膜統合性は保たれており、また、透過型電子顕微

鏡での観察では、顕著な形態的特徴を示した。

*Escherichia coli*及び*Rhodococcus erythropolis*で発現させた*T. biformata*由来の組み換えRpf (rRpf)は、分裂できる細胞を低い初期濃度で接種したmMMF培地において誘導期を短くし成長促進作用を示した。また非分裂状態の細胞接種でも同培地中で誘導期を短くし覚醒の効果を示した。しかしながら、他の既知の機能性Rpfと比べ、活性を示すのにより高い濃度が必要となることから、このRpfは、生育促進・覚醒活性を持つが先行研究でのRpfと同等ではないことが示唆された。また、*rpf*遺伝子ホモログのmRNAは、*T. biformata*の対数増殖期の間検出され、この遺伝子が増殖した培養液中で発現していると考えられた。

公表された全ゲノム配列から得られる既知あるいは推定Rpf配列を用いた系統解析では、*T. biformata*のRpfがRpfBサブファミリー内で独立した系統に属していることが明らかとなった。また、*T. biformata*由来Rpfの遺伝子構造は、DUF348ドメインの数や2つ目のDUF348ドメインとG5ドメイン間のリンカー領域に関して*M. tuberculosis*のRpfBと異なっていた。これらの違いが*T. biformata* Rpfの機能性の違いに関与しているのかもしれない。

2. 環境サンプルのコロニー形成を促進する生育因子としてのRpf

E. coli あるいは *R. erythropolis* 発現系で得られた組み換えRpfを永久凍土氷雪サンプルの培養に用いた。rRpfを加えた平板上でのCFUは急速に上昇し、非添加の平板と比べ、より早くコロニー形成が見られた。Rpf 添加プレート上に現れた顕著に増加する2つのコロニーは、16S rRNA解析によると*Brevibacterium sp.* と*Arthrobacter rhombi* F98 に近縁であった。この結果は*T. biformata*由来Rpfが近縁種に対して活性があることを示した。培養初期段階に、外来Rpfを加えることで他の分裂状態にある細胞の生育を促進したと考えられる。

本研究により*T. biformata*由来Rpfはサイトカイン様活性を持っていることが示された。しかし、既に評価されている機能的Rpfとはその活性及び遺伝子構造が異なった。また、アクチノバクテリア門の他種に対して活性を持つことも明らかとなった。本研究は、アクチノバクテリア由来Rpfの機能が分化している証拠と、環境中からアクチノバクテリアを単離するための生育因子としてRpfが使える可能性を提示した。

よって、審査員一同は、Indun Dewi Puspitaが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。