

論文審査の結果の要旨

氏名 吉村英尚

本論文は2章からなり、第1章は *Synechocystis* sp. PCC6803 の cAMP 受容タンパク質である SYCRP1 を同定し、その生化学的な解析を行った。第2章は cAMP 受容タンパク質 SYCRP1 の標的遺伝子の同定について述べられている。

cAMP は原核生物から真核生物に至るまで幅広く存在する情報伝達物質であり、様々な遺伝子の発現や酵素活性の調節に関与している。動物や大腸菌などではよく研究がなされているが、光合成生物では cAMP の研究がほとんどなされていない。ラン藻は酸素発生型の光合成を行う独立栄養型のバクテリアである。ラン藻は光や pH、窒素源の有無などによる環境変化に応答して細胞内の cAMP レベルが増減することが知られており、これまでに5種類のアデニル酸シクラーゼが単離、同定されている。しかし、cAMP が情報を伝達していく機構については全く不明である。本研究では、cAMP receptor protein (CRP) をコードする遺伝子を同定し、大腸菌を用いた組み換え型タンパク質によるラン藻の CRP の生化学的な特徴を明らかにするとともに、その機能を解析した。

第1章の要約は以下のようである。材料は *Synechocystis* sp. PCC6803 を用いた。このラン藻は全ゲノムシーケンスデータがかずさ DNA 研究所によって公開されている。ラン藻は原核生物なので大腸菌の CRP の配列をもとに、それに相当する遺伝子が存在するかどうか全ゲノムシーケンスデータを用いて検索した。*Synechocystis* sp. PCC6803 の全遺伝子 3,168 個の中から最終的に3つの遺伝子に絞り、それぞれを *sycrp1*、*sycrp2*、*syk* と名付けた。次にこれら3つの候補の組み換え型タンパク質を作製した。3つの組み換え型タンパク質と cAMP との結合親和性は平衡透析法で調べた。その結果、SYCRP1 と SYK の2つの組み換え型タンパク質が cAMP と結合することが示唆された。次に SYCRP1 の cAMP に対する結合解離定数を平衡透析によって求めた。その結果から Kd を算出したところ、約 3 μ M という値を得た。また平衡透析の結果から SYCRP1 に対する cAMP の最大結合量を考えると、タンパク質2分子あたりに1分子の cAMP が結合していることになり、SYCRP1 は cAMP と複合体を形成する際、ダイマー構造をとるのではないかと考えられた。そこで、タンパク質架橋剤である EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) を用いて架橋実験を行った。cAMP を加えた場合と cAMP を加えない場合の両方の条件でダイマーが観察された。このことから SYCRP1 はダイマーとして存在するが cAMP はダイマー形成に寄与するのではなく、機能の面で寄与する可能性が考えられた。大腸菌の CRP は C 末端側に DNA 結合ドメインとして helix-turn-helix モチーフを持っており、SYCRP1 の C 末端側と比較すると後者のヘリックスが高い相同性を示した。そこで大腸菌の CRP が認識し、最もよく結合するコンセン

サス DNA 配列を合成し、その配列に対する SYCRP1 の結合能を調べるためにゲルシフトアッセイを行った。その結果、SYCRP1 は特異的にコンセンサス DNA 配列に結合することが明らかとなった。一方、cAMP を加えない場合には SYCRP1 の濃度を上げてバンドのシフトは全く検出されなかった。以上のことから、SYCRP1 は cAMP 存在下でのみ特異的な塩基配列を認識し結合すると結論した。

第 2 章の要約は以下のものである。SYCRP1 は転写因子であることが示唆されたので、SYCRP1 の標的となる遺伝子を、網羅的に遺伝子発現解析できる DNA microarray を用いてスクリーニングした。その結果、野生株と *sycrp1* 破壊株において遺伝子発現の違いに再現性の得られた遺伝子は 18 個あった。これらのなかでシグナル強度が比較的大きく、オペロンになっていると思われる遺伝子群 (slr1667~slr1668、slr2015~slr2018) に注目した。また、slr1667、slr2015 の ORF 内部に設定した primer で primer extension を行った結果、*sycrp1* 破壊株ではほとんど発現が認められず、DNA microarray の結果と一致していた。次にスクリーニングした遺伝子群の先頭の遺伝子について転写開始点の決定、およびプロモーター部位を予測するために primer extension を行った。slr1667 の場合、3 つのバンドが検出され、転写開始点は 3 つあることが示唆された。slr2015 の場合、転写開始点は 1 つであった。それぞれの遺伝子の転写開始点が決まったので、それらの遺伝子のプロモーターと考えられる領域を用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果、slr1667 の予測した上流領域と SYCRP1 は特異的に結合することが明らかとなった。slr2015 においては予測した上流領域で特異的といえる結合は認められなかった。次に slr1667 の上流領域のどの部分に SYCRP1 が結合するのか特定するために、DNase I フットプリントを行った。その結果、転写開始点からみて -178 から -127 の領域が SYCRP1 によって保護されることが明らかとなった。保護された領域のなかには大腸菌の CRP が最もよく結合する、コンセンサス DNA 配列のコアとなる塩基配列が確認された。そこで、SYCRP1 が結合するためのコアと考えられる塩基配列を含むプローブ（野生型）と、その塩基配列を塩基置換したプローブ（変異型）の 2 種類の合成オリゴヌクレオチドを用いて SYCRP1 の結合部位を決定した。その結果、変異型プローブにおいては SYCRP1 の濃度を増大しても全くバンドのシフトは認められなかった。野生型プローブにおいては SYCRP1 は特異的に結合した。これらの結果から SYCRP1 は予測した塩基配列に結合すると結論した。

以上、本研究においてラン藻における cAMP 受容タンパク質が同定され、その生化学的な性質や機能が明らかとなった。さらに *Synechocystis* sp. PCC6803 では、2 つの cAMP 結合タンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかとなった。また転写因子と示唆される SYCRP1 の標的遺伝子を同定した。このように本論文はこれまで知られていなかったラン藻の cAMP 情報伝達系に新しい知見を与えるものであり、科学的に高い価値がある。

よって、博士（理学）の学位を授与できると認める。