

論文審査の結果の要旨

亀井綾子

本論文「Signal transduction pathways via eukaryotic-type protein phosphorylation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803における真核生物型タンパク質リン酸化が関与するシグナル伝達経路の解明)」は、5章から成っている。第1章では、真核生物型プロテインキナーゼSpkAの活性と生理的役割、第2章では真核生物型プロテインキナーゼSpkBの活性と生理的役割、第3章では、真核生物型プロテインキナーゼSpkC~Fの生化学的解析、第4章では、転写因子SII1626の生化学的解析と遺伝子の発現解析、第5章では、*Synechocystis* sp. PCC 6803の遺伝子の進化の特徴を解析している。

第1章では、真核生物型プロテインキナーゼSpkAの活性と生理的役割の解析結果を報告している。ゲノム情報が決定されている培養株では、この遺伝子は1塩基の挿入変異によって2つの読み枠(ORF)に分割されているが、運動性の培養株では真核生物型プロテインキナーゼをコードする単一の遺伝子であることを示した。大腸菌でこの遺伝子(*spkA*)を発現・精製し、自己リン酸化活性と一般的な基質であるヒストンタンパク質などのリン酸化を実証した。また、シアノバクテリアの細胞抽出物を添加し、30kDa、90kDaの膜タンパク質をリン酸化することを示した(生理的基質)。*spkA*破壊株の解析から、この遺伝子が細胞運動に必須であることを示した。線毛サブユニットをコードする*pilA1*遺伝子の発現をノーザン解析したが変化はみられなかった。しかし、電子顕微鏡で細胞表面を観察すると、運動に関与している太い線毛の数は大幅に減少していた。これらは、SpkAが線毛の形成もしくは運動を調節するプロテインキナーゼであることを示唆している。

第2章では、真核生物型プロテインキナーゼSpkBの活性と生理的役割の解析結果を報告している。大腸菌でこの遺伝子が発現・精製し、自己リン酸化活性と一般的な基質であるヒストンタンパク質などのリン酸化を示した。2価カチオン依存性を調べ、 Mg^{2+} や Mn^{2+} は活性に必要であるが、 Ca^{2+} は効果がないことを示した。*spkB*破壊株の解析から、この遺伝子が細胞運動の活性化に必要であるが、走光性には関与しないことを示した。しかし、*pilA1*遺伝子の発現や細胞表面の太い線毛の形成には影響はみられなかった。これらは、SpkBが運動を調節するプロテインキナーゼであることを示している。

第3章では、真核生物型プロテインキナーゼSpkC~Fの生化学的解析を報告している。これらの遺伝子を実験室で大腸菌で発現し、SpkC、SpkD、SpkFタンパク質が自己リン酸化とヒストンなどのタンパク質に対するリン酸化活性をもっていることを生化学的に示した。とくに、SpkFは膜タンパク質であることが示唆された。一方、SpkEはキナーゼドメイン内の重要な残基に置換変異を生じており、発現させたタンパク質も活性を示さなかった。これらの遺伝子の破壊株は運動性も含めて野生株と区別できなかったが、*spkD*破壊株においては野生型DNAを完全には除去できず、*spkA*が生育に必須であることが示唆された。

第4章では、転写因子SII1626の生化学的解析と遺伝子の発現解析を報告して

いる。複数の転写因子の破壊株の解析から、運動に必須な遺伝子*sll1626*を同定した。この遺伝子産物Sll1626を大腸菌で発現・精製し、自己の上流配列との特異的な結合をゲルシフトアッセイによって示した。*sll1626*が発現を調節する標的遺伝子を網羅的に同定するために、破壊株をDNAマイクロアレイで解析した。*sll1626*は多くの原核生物のSOS応答調節遺伝子*lexA*に似ていたが、SOS応答を示す*recA*などDNA修復系の遺伝子の発現は破壊株で変動していなかった。一方、新規の線毛サブユニット遺伝子(*slr2015*、*slr2016*、*slr2017*)の発現は大きく低下し、逆に*sll1626*自身や*sll1009*などの少数の遺伝子の発現は大きく増加していた。ノーザン解析でもこれらの遺伝子の発現への影響を確認した。この発現解析で明らかになった遺伝子の破壊株を作成し、*slr2015*や*slr2016*、*slr2017*はそれぞれ独立に運動に必須であることを示した。一方、大腸菌で示されているLexAの自己切断と同様の切断をSll1626が示すかどうかを検討したが、幅広い条件でも切断を確認することはできなかった。シアノバクテリアのゲノム解析で明らかになっている多くの種にも*lexA*は存在しているが、*Synechocystis* sp. PCC 6803のものだけが、自己切断に必要な残基が欠失していることが判明した。これらは、転写因子Sll1626は、大腸菌LexAのようなDNA損傷以外の何らかのシグナルを受けて、*slr2015*など新規線毛遺伝子の発現を調節することによって、運動を調節していることを示している。

第5章では、*Synechocystis* sp. PCC 6803を材料として、シアノバクテリアの遺伝子の進化の特徴を解析している。つまり、*spkA*における塩基挿入による遺伝子の不活性化は、運動性の培養株と非運動性の培養株の間で知られる唯一の遺伝的変異である。さらに、この非運動性培養株への*spkA*の導入によって運動性が回復できないことを示し、さらに未知の変異も同時に起こっていることを示唆した。つまり、修士論文で明らかにした真核生物型プロテインホスファターゼの遺伝子の欠失変異とともに、シアノバクテリアの人工的な培養とともに運動性に関与する遺伝子群が次々と機能欠失につながる変異を生じていることを示している。一方、Sll1626の自己切断に関与するアミノ酸残基の変異やSpkEプロテインキナーゼの変異は、複数の残基の置換を引き起こしているにもかかわらず、遺伝子全体の読み枠を破壊することはない。これは、既存の遺伝子が、新しい進化の可能性を探っている途中段階ととらえることもでき、非常に興味深い。

これらの研究成果をまとめると、原核生物における真核生物型プロテインキナーゼの存在を実証し、その生理的役割をはじめ明らかにした点で関連研究分野に与える影響が非常に大きい。また、原核生物のSOS応答調節遺伝子に似た*sll1626*が実際にはSOS応答ではなく、運動調節にかかわっていることを示したことも非常に意義深い。これらの業績は、今後の研究、とくに原核生物における真核生物型プロテインキナーゼの果たす役割や、真核生物におけるプロテインキナーゼによる調節機構の進化的背景などの研究に大きな貢献をすると考えられる。

なお、本論文の第1章は、湯浅高志、折川紅美、耿曉星、池内昌彦との共同研究、第2章～第5章は池内昌彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究の立案、遂行を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。