

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 木下 滋晴

珪藻は海洋での現存量が最も多い第一次生産者として生態系に重要な位置を占めている。こうした珪藻の特性は、その高い環境適応能力によると考えられているが、関連する分子機構はほとんど明らかにされていない。近年人間活動に伴う環境負荷が増大し、沿岸海洋環境も各種のストレスにさらされている。したがって、沿岸域の代表種である珪藻につき、そのストレス状態を正確に把握することは沿岸生態の保全にきわめて大切と考えられる。そこで、本研究は珪藻 *C. compressum* を対象に熱ストレスのマーカー遺伝子を探索し、その発現様式とコードタンパク質の機能を調べた。さらにその成果を利用して現場で採取した珪藻のストレス状態の評価を試みた。

まず、20℃で培養した *C. compressum* 対照区および 30℃で 15 分間の熱ストレス付加後 20℃で 2 時間培養した細胞群について、mRNA arbitrarily primed RT-PCR によるフィンガープリントを比較し、本種珪藻における熱ストレス誘導性遺伝子 *HI-4*、*HI-5*、および *HI-9* をクローン化した。*HI-4* cDNA 断片について相同遺伝子は検索されなかったが、*HI-5* cDNA 断片の演繹アミノ酸配列はネコ蚤 *Ctenocephalides felis* のセリンプロテアーゼ CfSP-33 の相同領域と 33%、*HI-9* cDNA 断片の演繹アミノ酸配列は嫌気性細菌 *Clostridium acetobutylicum* のタイプ III グルタミンシンセターゼ (GSIII) の相同領域と 40%の同一率を示した。

次に 3'RACE により *HI-9* cDNA の 3'側末端までの配列 1,030 塩基を決定した。演繹アミノ酸配列中には GSIII に特徴的な C 末端側の付加配列が存在し、GS1、GS2、および GSIII の間で高度に保存されている region IV および V についても、*HI-9* は明らかに GSIII 様の特徴を示した。さらに GSIII で高度に保存されている region D の一部配列も *HI-9* に存在した。これまでその存在が一部原核生物に限定されていた GSIII が珪藻で存在した事実は分子進化の観点からも興味深い。なお、熱ストレスによる GS の発現誘導はいくつかの植物種で報告され、熱ストレ

ス耐性獲得への寄与が示唆されている。

HI-9 同様、熱ストレス誘導性遺伝子としてクローン化された HI-5 については、5' および 3' RACE により cDNA の全長を決定し、HI-5 が分子中央にトリプシン様セリンプロテアーゼドメインをもつ新規分子であることを示した。さらに、RT-PCR およびゲノム DNA のクローニングにより、HI-5 遺伝子から選択的プライミングを介して形成される 2 種の転写産物アイソフォーム、HI-5a および HI-5b mRNA の存在を明らかにした。アクチン mRNA を内部標準とする定量的 RT-PCR により、HI-5a mRNA は熱ストレス付加により顕著に誘導されるが、HI-5b mRNA は構成的に発現することが示された。HI-5a は分子中央にセリンプロテアーゼドメインを含み、基質の切断部位の認識に寄与する S1 ポケットの構成アミノ酸はトリプシンのそれと一致した。一方、HI-5b では S1 ポケットの構成アミノ酸を含む C 末端側領域が欠失していた。大腸菌発現系を用いた機能解析では、HI-5a プロテアーゼドメインはトリプシン様セリンプロテアーゼに特異的な阻害剤 *p*-アミノベンズアミジンと結合したが、HI-5b 相同領域は結合しなかった。既知の熱ストレス誘導性プロテアーゼは変性タンパク質の除去やストレス応答におけるシグナル伝達で働き、HI-5a もこうした機能を担うと考えられた。HI-5b については、その mRNA が未成熟の前駆体として存在する、あるいはプロテアーゼとは異なる機能を有し非ストレス時に働く、という 2 つのモデルが考えられた。

さらに、現場試料を用いたマーカー遺伝子検出法について検討し、単一培養した細胞を用いた予備実験で、HI-5 cDNA 断片をプローブとした *in situ* hybridization により熱ストレス付加細胞を明確に識別できた。現場試料の採取は九州の A 発電所で行い、取水口周辺で採取した試料を対照に高温接触後の放水路での試料を評価した。中心目珪藻については、放水路の試料で取水口周辺のものに比べて染色強度が高い傾向を示したがその差は大きくなかった。一方羽状目珪藻は全く染色されず、珪藻の種類によってストレス状態の評価を区別する必要性が示された。

以上本研究は、珪藻の熱ストレス応答に関わる分子機構の一端を明らかにするとともに、現場的な熱ストレス評価の指針を示したもので、分子生物学および比較生化学、さらには環境保全学に資するところが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。