

## 論文審査の結果の要旨

吉原 静恵

本論文「Molecular studies on phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. (シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の走光性機構の分子生物学的解析)」は、4章から成っている。第1章では、運動に必須の線毛サブユニットおよび線毛形成遺伝子 (*pil* 遺伝子) の同定と、電子顕微鏡による運動に關与する線毛の解析、第2章では、線毛形成にかかわるシグナル伝達経路にかかわる *pil* 遺伝子クラスターの役割と分断された *cheA* 型遺伝子の同定、第3章では、正の走光性にかかわる *pil* 遺伝子クラスターの役割の同定、第4章では、第3章で同定された *pilJ1* 遺伝子産物の生化学的解析により新規光受容体であることを示している。

第1章では、運動に必須の線毛サブユニットおよび線毛形成遺伝子 (*pil* 遺伝子) の同定と、電子顕微鏡による運動に關与する線毛の解析を行った。べん毛をもたないシアノバクテリア (ラン藻) の運動機構は、これまで詳しくわかっていなかった。1996年に全ゲノム情報が決定された単細胞性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 には、グラム陰性細菌の4型線毛の形成にかかわる遺伝子と弱い相同性を示す ORF (遺伝子) をいくつか見いだした。本研究では、これらの ORF その近傍に存在する ORF の破壊株を作製し、その表現型を解析した。その結果、*sll1694*、*slr0063*、*slr1294*、*slr1295*、*slr1296*、*slr1297* の運動性が完全に失われ、同時に、自然形質転換能や細胞表面の径 5 nm の太い線毛も消失した。一方、残りの多数の破壊株では、このような表現型は見られなかった。以上の結果から、これらの遺伝子は、グラム陰性細菌の4型線毛に似た太い線毛が単細胞性シアノバクテリアにおける運動と自然形質転換にかかわる必須因子であると結論した。したがって、これらの ORF をシアノバクテリアにおける *pil* 遺伝子として、それぞれ *pilA1*、*pilB1*、*pilM*、*pilN*、*pilO*、*pilQ* と命名した。一方、3D キーノートで DNA 結合を予測されていた *slr0197* の破壊株を作製・解析したところ、運動性を保持しているが、形質転換能を完全に失うことを見いだした。これは、運動性に關与せず形質転換に特異的にかかわる遺伝子であることを示しており、*comA* と命名した。

第2章では、線毛形成にかかわるシグナル伝達経路にかかわる *pil* 遺伝子クラスターの役割と分断された *cheA* 型遺伝子の同定を行った。*Synechocystis* のゲノムには、べん毛運動の調節因子 (CheY、CheW、MCP、CheA) に相同性を示す遺伝子などから構成される遺伝子クラスターが3種存在する。大腸菌など多くの細菌では、べん毛運動による走化性の調節において、MCP は誘引物質などのセンサーであり、MCP → CheA → CheY のシグナル伝達がべん毛運動のスイッチングにはたっていることが知られている。本研究では、これらと弱い相同性を示す ORF をすべて破壊することにより、*slr1042*、*slr1043*、*slr1044* が運動に必須であることを見いだした。また、このクラスターの先頭に存在する *slr1041* 破壊株では運動性がやや阻害された。これらの遺伝子を含むクラスターは、他の2つのクラスターとは異なり、*cheA* 様 ORF を伴っていなかった。そこで、再びゲノムを検索し、*cheA* 様の特徴を部分的にもつ2つの ORF (*slr0322*、*slr0073*) を見いだした。これらの遺伝子破壊株は、期待通り運動性を失った。これらの遺伝子破壊株の線毛形成と形質転換能を解析したところ、第1章で同定した遺伝子群とは異なり、まったく運動能を失った株でも低い形質転換能を保持していた (*slr1044*、*slr0322* 破壊株)。一方、太い線毛も消失しているもの (

*slr1044*, *slr0322*破壊株)と、野生株よりも過剰に形成されているもの (*slr1042*, *slr0073*破壊株)、若干保持しているもの (*slr1043*破壊株)に分けられた。これらの結果は、MCPドメインをもつSlr1044タンパク質が何らかの化学シグナルを受容するセンサーであり、分断されたCheA様遺伝子産物Slr0322/Slr0073タンパク質がCheY様Slr1042タンパク質をリン酸化することによって、線毛の形成を調節していること、線毛の形成には、伸長と短縮の過程があることを示唆している。これらの知見に基づいて、*slr1041*, *slr1042*, *slr1043*, *slr1044*, *slr0073*, *slr0322*を、*pilG*, *pilH*, *pilI*, *pilJ*, *pilL-N*, *pilL-C*と命名した。

第3章では、正の走光性にかかわる*pix*遺伝子クラスターの役割を同定した。野生株から白色光下で正の走光性を示すクローンと負の走光性を占めるクローンに分離し、それぞれに対し、上記の3種の遺伝子クラスターの破壊株を作製し、その走光性を解析した。その結果、正の走光性を示す野生株から作製した*sll0038*, *sll0039*, *sll0041*, *sll0042*, *sll0043*破壊株だけが、負の走光性を示した。また、このクラスターの内部に存在する*sll0040*の破壊株は、運動性が阻害されていた。Sll0041はMCPドメインとともに、植物フィトクロムの色素結合ドメインと相同性を示すGAFドメインをもっていた。これらの結果は、Sll0041タンパク質が光を感知して、CheA様Sll0043タンパク質を活性化し、CheY様Sll0038/Sll0039タンパク質をリン酸化することが、正の走光性にかかわる線毛の運動を調節していることを示唆している。また、野生株と*sll0041*破壊株の走光性の作用スペクトルを解析し、野生株が示す紫外光に対する負の走光性と、500-700nmの可視光に対する正の走光性が後者では消失することが示された。これらの知見に基づいて、*sll0038*, *sll0039*, *sll0040*, *sll0041*, *sll0042*, *sll0043*を、*pixG*, *pixH*, *pixI*, *pixJ1*, *pixJ2*, *pixL*と命名した (*pix*=positive phototaxis)。

第4章では、*pixJ1*遺伝子産物の生化学的に解析した。*pixJ1*遺伝子のN末端にHisタグを融合し、強いプロモータとともに*Synechocystis*に導入した過剰発現株を作製し、PixJ1タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製した。これによって、タグを保持した100.5kDaタンパク質をほぼ単一バンドとして単離することに成功し、SDS-PAGEで分離したバンドに開環テトラピロール色素が共有結合していることを示した。その蛍光の励起スペクトルから、吸収の極大が580nm付近に存在することが明らかになった。これらの結果は、PixJ1タンパク質が正の走光性の光受容体であり、その性質は従来知られていた植物フィトクロムとは非常に異なる新しいタイプの光受容体であることを示している。

これらの研究成果をまとめると、単細胞性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803の示す運動性には、太い線毛が必須であり、その形成と調節にかかわる遺伝子のほとんどが明らかになった。また、正の走光性にかかわる光受容体と調節遺伝子を同定することによって、従来まったく機構がわかっていなかった線毛による運動機能と走光性の分子機構を解明する重要な手がかりを得た。PixJ1タンパク質がまったく新しいタイプの光受容体であることを示し、光受容体研究の新しい分野を開拓した。

なお、本論文の第1章は、耿曉星、岡本忍、由良敬、村田隆、郷通子、大森正之、池内昌彦との共同研究、第2章は、耿曉星、池内昌彦との共同研究、第3章は、鈴木布美子、藤田浩徳、耿曉星、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。