

論文審査の結果の要旨

小林 真理

本論文「Analysis of oxidative stress-mediated gene regulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803」(*Synechocystis* sp. PCC 6803の酸化ストレス応答機構の解析)は、2章から成っている。対象生物として、単細胞性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803を用いて、第1章では、メチルピオローゲンと過酸化水素処理において変動する遺伝子群をマイクロアレイを用いて網羅的に明らかにし、その中からとくに活性酸素に応答して誘導される遺伝子クラスタを同定し、その中から見いだした新規抗酸化タンパク質をコードする遺伝子*sll1621*と*sll1620*の破壊株を作製し、前者が細胞の生存にかかわる重要なペルオキシレドキシシンであること、後者も活性酸素ストレス下の増殖に必要な役割を果たしていることを示した。第2章では、上で見いだした活性酸素に応答する遺伝子クラスタなどに隣接する転写因子様遺伝子*slr1738*と*sll0088*を組換タンパク質として大腸菌で発現させ、Slr1738タンパク質が*sll1621-slr1738*遺伝子間領域、*slr0589*上流領域、*sll1620*上流領域に特異的かつレドックス依存的に結合するリプレッサーであることを示した。また、Sll0088タンパク質が隣接する*slr0074*上流領域に特異的かつレドックス依存的に結合するリプレッサーであることを示した。

第1章では、活性酸素に応答する遺伝子群をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に明らかにした。これまで、光合成生物における活性酸素応答の分子機構はほとんど不明であった。本研究では、単細胞性シアノバクテリア*Synechocystis* sp. PCC 6803を用いて、メチルピオローゲン処理で誘導または抑制される遺伝子を検出した。15分処理では*sll1621*など27個の遺伝子の発現が誘導、60分処理では、*sll1621*など17個の遺伝子の発現の誘導が確認された。両者で共通して誘導されたのは9個(*sll1621*, *slr0074*, *slr0075*, *sll0503*, *sll1542*, *slr0373*, *slr0513*, *slr0589*, and *ssr0692*)であった。また、発現比で見ると、15分処理の方が遺伝子の変動が大きい傾向があった。一方、過酸化水素15分処理では、35個の遺伝子が誘導された。これらには、メチルピオローゲンと共通するものとして*sll1621*や*slr0074*, *slr0075*などが見られたが、固有のものとして*sll1159*, *sll1160*なども新たに見いだされた。これらのうちでもっとも発現が誘導されていた*sll1621*について、その破壊株を作製した。シアノバクテリアは多コピーゲノムをもっており、遺伝子破壊株の作製においては野生型DNAが完全に除去される必要がある。*sll1621*破壊株では、プレート培養では嫌気状態でのみ野生型DNAを除去することができた。また、作製した破壊株は好気条件ではプレート上で増殖するものの死滅しやすいこと、液体培養でも中光下で増殖阻害をおこし、強光下でやがて死滅した。*sll1621*がコードするタンパク質はペルオキシレドキシシンと呼ばれる一群のペルオキシダーゼと弱い相同性を示す。したがって、*sll1621*破壊株の表現型は、*Synechocystis*におけるもっとも重要なペルオキシダーゼであることを示している。また、過酸化水素でのみ誘導された*sll1159*も別のペルオキシレドキシシン様のモチーフをもっており、これまで指摘されてきたカタラーゼなどの遺伝子ではないものが活

性酸素ストレスへの順化に重要な役割を果たしていることが初めて明らかになった。

第2章では、前章で明らかになった活性酸素に応答して発現誘導を調節する転写因子を同定し、活性酸素に応答する新たなレギュロンの存在を明らかにした。*sll1621* 遺伝子上流には、メチルビオローゲンや過酸化水素で誘導される転写因子の遺伝子 *slr1738* を見いだした。この遺伝子の破壊株を作製し、その遺伝子発現をDNAマイクロアレイを用いて野生株と比較した。その結果、57個の遺伝子の発現が野生株よりも有意に高くなっており、その中には *sll1621*, *sll1620*, *slr0589* の3個の遺伝子の発現レベルの上昇は、メチルビオローゲン処理と共通していた。この推定転写因子 Slr1738 を大腸菌で組換タンパク質として発現させ、精製した。この Slr1738 タンパク質は、*slr1738-sll1621* 遺伝子間領域のプロープと特異的に結合し、ジチオスレイトールで促進、過酸化水素で結合の阻害が見られた。このことは、Slr1738 がレドックス依存的にプロモータ領域に結合する転写因子であることを示している。この領域の塩基配列の解析から、特異なパリンドローム配列を見だし、そのオリゴプロープに特異的に結合することを示した。さらに、Slr1738 が同様の様式で *sll1620* や *slr0589* の上流にも結合することを示した。一方、メチルビオローゲンや過酸化水素で誘導される *slr0074*, *slr0075* の上流に存在する推定転写因子 *sll0088* の発現もやや誘導されていた。この Sll0088 を大腸菌で組換タンパク質として発現させ、精製した。この Slr1738 タンパク質は、*sll0088-slr0074* 遺伝子間領域のプロープと特異的に結合し、ジチオスレイトールで結合の促進が見られた。このことは、Sll0088 がレドックス依存的にプロモータ領域に結合する新規転写因子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 において、活性酸素応答性レギュロンとして、転写因子 Slr1738 タンパク質は、*sll1621*, *sll1620*, *slr1738*, *slr0589* の上流にリプレッサーとして結合し、活性酸素に応答してそれらの発現を調節する単位を形成している。この発現調節の活性酸素種依存性から、Slr1738 はスーパーオキシドに感受性が高い活性酸素センサーであると考えられる。一方、転写因子 Sll0088 タンパク質は、*slr0074* クラスターと *sll0088* の上流にリプレッサーとして結合し、活性酸素に応答してそれらの発現を調節しているが、まだ破壊株が得られていないため、これら以外の標的遺伝子があるのかどうか不明である。さらに、本研究により過酸化水素で誘導される別のレギュロン候補（転写因子 Slr1245 と標的 *sll1158* クラスター）も見いだされた。その制御様式から Slr1245 は過酸化水素センサーであると考えられた。また、新規抗酸化タンパク質（Sll1621, Sll1620）も新たに見いだした。

以上の結果は、光合成生物における活性酸素応答性遺伝子発現調節の分子機構を初めて明らかにしたものである。植物やシアノバクテリアは水分子を光合成的に分解して、酸素と強力な還元力を発生するが、これは同時に、もっとも活性酸素を発生しやすい条件でもある。このような条件で生育・進化してきた光合成生物における活性酸素応答機構は、従来の非光合成生物の応答機構とは異なる意義と分子機構をもっている。本研究はこのような点で大きな貢献をするものと考えられる。

なお、本論文の第1章は、石塚智和、片山光徳、金久實、M. Bhattacharyya-Pakrasi, H.B. Pakrasi、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。