

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 都築 稔

地球上の自然環境は極めて多様であり、生命が生きていくには過酷とも思える環境においても適応可能な細菌が存在する。細菌はそのような厳しい自然環境下でも外的環境の変化に速やかに応答し、その環境に適応して生存している。これまでに、塩ストレスにより発現する遺伝子やタンパク質が多数同定されているものの、これらの遺伝子の誘導、あるいは抑制を含めた塩ストレス応答機構の全容は明らかになっていない。本論文は基礎生命科学研究としての立場から、塩ストレス条件で誘導が見出された *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*) の機能未知タンパク質 SspA の生体内機能を明らかにすることを目指して、種々のアプローチを試みたものである。

1 章の緒言では、これまでに知られている生物の塩ストレス応答機構に関して、細菌を中心に述べられている。また、本論文で使用している *R. sphaeroides* の特徴、および SspA に関する基本情報を述べることにより、塩ストレス応答機構解明における研究の位置づけがなされている。

2 章は、機能推定の一つの手段として活用する SspA のポリクローナル抗体作製に関するものである。大腸菌を宿主にして、抗原となる組み換えタンパク質を作製することにより、抗原性の高い抗体を取得することに成功した。

3 章、および 4 章において、作製したポリクローナル抗体を用いて SspA の誘導条件、および局在情報をウェスタンや電子顕微鏡により解析した。ウェスタンによる誘導条件解析の結果、SspA は NaCl、KCl というイオン性の塩ストレス条件下で特異的に誘導合成されることが明らかになった。一方、局在解析に関しては、シヨ糖密度勾配法とウェスタンによる解析、および免疫電顕による解析により SspA は外膜に局在していることをはじめて明らかにした。

5 章では、*sspA* 遺伝子破壊株を取得して、その表現型観察を試みている。取得した破壊株がどのような表現型を示すかを観察するべく、大きく分けて 3 種類の観点から野生株と比較解析した。第一は生育の変化である。嫌気光合成条件においてはストレスの有無に関係なく優位な生育の変化は見られなかった。一方、好気暗条件においてはいくつかの顕著な変化が観察された。最も目立ったのは、破壊株で見られた生育の抑制であった。破壊株はストレスのない条件下でも野生株と同程度まで生育することができなかった。加えて、塩ストレス条件下では全く生育することができなかった。この結果から、SspA は好気条件で、より重要な役割を果たしていることが考えられた。第二に顕微鏡とフローサイトメータ (FCM) により菌体形状の変化を観察した。その結果、最も大きな変化であったのが、好気暗条件で見られた SSPA1 の菌体凝集である。光学顕微鏡で観察したところ、NaCl ストレス条件下で大きな凝集体が観察された。こ

の凝集体は培養開始から数時間という培養の初期段階で形成されることから、*sspA* 遺伝子の欠損が直ちに菌体に重大な影響を与え、その結果生育抑制を引き起こしているのではないかと考えられる。さらに、破壊株は FCM による解析により内部構造が変化していることが観察され、電子顕微鏡による観察において内部構造に何らかの変化が起こっていることが示唆された。

6 章では SspA と関連する因子の探索も行なった。第一に免疫沈降法により SspA と直接的に相互作用を持っているタンパク質の探索を試みた。しかし、結合タンパク質に関する情報を得ることはできなかった。第二に、他の菌株で塩ストレスセンサーであると示唆されている Histidine kinase 遺伝子の配列を元に、相同性から *sspA* の上流因子の探索を試みた。しかし、ウェスタンで解析した結果、これらの遺伝子を破壊しても SspA の発現量に変化は見られなかったことから、*sspA* は今回探索したシグナル伝達経路以外の経路で誘導されることが示唆された。第三に、塩ストレス応答における重要な役割が報告されている適合溶質トレハロースとの関連性を探索した。トレハロース合成遺伝子を破壊することにより、トレハロースが細胞内に蓄積されていない状態で SspA の発現量に変化が生じているかどうかをウェスタンにより解析した。その結果、トレハロース蓄積の有無に関わらず SspA の発現量に変化は見られないことが明らかになった。一方、*sspA* 遺伝子破壊株におけるトレハロース蓄積量も測定した。この際にも、野生株と比べて蓄積トレハロース量に変化が見られなかった。以上よりトレハロースと SspA の間に相関関係は低いことが示唆された。

7 章では DNA マイクロアレイを用いて、塩ストレスに対する遺伝子発現レベルの変化を網羅的に解析している。これにより、*sspA* が全遺伝子の中で、どの段階でどの程度発現しているのかを決定しようと試みた。その結果、NaCl ストレス添加後 45 min において、適合溶質トランスポーター遺伝子やトレハロース合成遺伝子と共に、*sspA* の顕著な発現上昇が観察された。また、全遺伝子の中でも相対的に *sspA* の発現量比は高いことが明らかになった。

8 章において、本研究のまとめ、および推測される *R. sphaeroides* の塩ストレス応答機構に関して述べられている。

以上、本論文は機能未知タンパク質 SspA の機能解析を行なうことにより、光合成細菌 *R. sphaeroides* の塩ストレス応答に関する新たな知見を得ることに成功している。本研究により SspA の生体内での役割については明らかにすることができなかったものの、機能未知タンパク質 SspA が塩ストレス条件下で特異的に誘導され、しかも好気塩ストレス下では本菌の耐塩性獲得メカニズムを解析する上で極めて重要かつユニークな足がかりとなったと考えられる。塩ストレス条件下で遺伝子・タンパク質レベルで高発現する外膜タンパク質に関する報告はこれまでになく、本研究が細菌の塩ストレス応答機構を解明する一端を担うことが期待される。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のあるものと認めた。