

論文審査の結果の要旨

成川 礼

本論文「Analysis of novel sensory PAS domains in filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120」(糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における新奇センサー-PAS ドメインの解析)は、6章から成っており、第1章：general introduction、第2章：バイオフィォマティクス解析、第3章：ヘム結合型 PAS ドメインの解析、第4章：フラビン結合型 PAS ドメインの解析、第5章：未知センサー型 PAS ドメインの解析、第6章：general discussion となっている。

本研究では、近年のゲノム解析で明らかになってきた遺伝子スーパーファミリーの中で、シグナル伝達におけるセンサードメインとして注目されている PAS ドメインに注目した。PAS ドメインは、アミノ酸配列は多様だが立体構造は保存されている一群のドメインであり、光、酸化還元状態、酸素、電圧などのセンサー、二量化のリンカーなどの多様な機能をもつといわれている。この PAS ドメインが、糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 にとくに多く分布することを見いだした。まず第2章のバイオフィォマティクス解析では、近縁の糸状性シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 のゲノム情報との網羅的比較解析を行い、推定センサー-PAS ドメインを選別した。*Anabaena* 7120 の140個の PAS ドメインから Hidden Markov Model プロファイルを作成し、最終的に *Anabaena* 7120 から143個、*Nostoc punctiforme* から180個の PAS ドメインを検出した。まず、クラスタリング解析により、複数の PAS ドメインを含む計64種のサブクラスと35個のオーファン PAS ドメインに選別した。次に、このクラスタリングとともに他のドメインの相同性を参考にして、両種間の36対のオルソログタンパク質を同定した(オルソログ解析)。このうちの22対はタンパク質の全長に渡って相同であったのに対し、残りの14対は片方、或いは両方において主に PAS ドメインの挿入・重複が見られた。*Anabaena* 7120 や *Nostoc*

punctiforme の進化において、これらのドメインが挿入・重複を繰り返したことが推測された。進化において機能が保存されているとすれば、両種間で保存されている PAS ドメインが祖先の機能を受け継いでいると考えられる。これら 36 対のタンパク質に保存されている 61 対のオルソログ PAS ドメインのうち、転写因子・推定ターゲットと遺伝子配置が保存されているものを、実験的検証の候補とした(シンテニー解析)。また、既知のセンサー PAS ドメインの立体構造において、リガンド結合に重要なヒスチジン・システイン残基が特定の領域に集中している。この領域に同様の残基が両種で保存されているオルソログ PAS ドメインをリガンド結合センサー PAS ドメインの候補とした(マッピング解析)。以上の解析から、最終的に 25 対の PAS ドメインを実験的に検証するセンサー候補とした。

第 3 章では、この 25 対のうちで、唯一ヘム結合が推定された PAS ドメイン(Alr2428_PAS3)を生化学的に解析した。この PAS ドメインをもつオルソログタンパク質(Alr2428 と Npun1874)において、推定ヘム結合 PAS ドメインは唯一の保存されたセンサー様ドメインである。Alr2428 タンパク質は、10 個以上のドメインをもち、センサーとしての推定ヘム結合 PAS ドメイン以外に、シグナル伝達のための二成分制御系の多数のドメインとともに、推定転写因子としての DNA 結合ドメインを含んでいる。まず、Alr2428_PAS3 を大腸菌でヒスタグ融合タンパク質として発現・精製した。この推定ヘム結合 PAS ドメインには、実際にヘムが結合していた。詳細解析の結果、ヘムは酸素との親和性は低く、酸化型還元型ともに 6 配位型として存在していることを確認し、酸化還元状態に応答しうることを明らかにした。また、このヘム結合 PAS ドメインは、大腸菌の DOS タンパク質のヘム結合 PAS ドメインとは異なるサブファミリーに属するにもかかわらず、その生化学的特徴は非常に似通っていた。また、大腸菌で発現精製した DNA 結合ドメインは、特定の塩基配列に対して特異的に結合することを示した。これらのことから、Alr2428 と Npun1874 が酸化還元に応答する転写因子である可能性が示唆された。以上の結果はオルソログ間で保存された PAS ドメインがセンサーとして機能しうることを示唆している。

第 4 章では、*Anabaena* の 3 つの推定フラビン結合 PAS ドメインを大腸菌で発現精製して、解析した。このうち 2 つ(Alr3170_PAS2 と All2875_PAS2)は *Nostoc* とオルソログ関係にあるが、他方(Alr1229_PAS8)は、保存されていない。精製の結果、保存された 2 つの PAS ドメインは実際にフラビンを結合していた

のに対し、保存されていない PAS ドメインは全くフラビンを結合しなかった。また、結合していたフラビンは、青色光に应答してフォトロピンと同様な光還元反応を示したが、その光应答性は大きく異なっていた。Alr3170_PAS2 は完全に光還元され、暗反転も非常に遅いのに対し、All2875_PAS2 はわずかにしか光還元されず、暗反転も非常に早かった。これは、進化的に保存されているドメインであっても、異なる光受容体として進化している可能性を示している。また、近縁種間で保存されている PAS ドメインが祖先の機能を受け継いでいるという仮説を支持した。

第 5 章では、残りの 22 対の機能未知 PAS ドメインのうち *Anabaena* のものを、大腸菌でヒスタグ融合として発現・精製した。これらの精製タンパク質に関して、特異的な紫外・可視吸収は検出されなかった。金属分析に関しては、特異的に結合しているものは検出されなかった。システインを介した分子内あるいは分子間ジスルフィド結合について調べたところ、幾つかの PAS ドメインはジスルフィド結合を形成しており、酸化還元に応じて可逆的に应答することが示された。とくに、近縁種でもシステインが保存されている PAS ドメインは、細胞内における酸化還元状態を感知している可能性が考えられる。ゲル濾過カラムを用いて分子量を決定し、いくつかの PAS ドメインが特異的に二量化していることを示した。

以上の結果は、光合成生物における多数の機能未知 PAS ドメインを分類し、より重要と思われるものを選別し、個別の機能解析に移していくパイロット実験という側面をもっている。具体的には、推定ヘム結合 PAS ドメインと 2 つの推定フラビン結合 PAS ドメインの役割を明らかにした。また、配列相同性からは全く機能が予測できない 22 個の PAS ドメインに関しては、網羅的生化学解析により、幾つかについて、酸化還元应答性が検出された。このような点で本研究は大きな貢献をするものと考えられる。

なお、本論文の第 2 章は、岡本忍、大森正之、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した。