

## 論文の内容の要旨

論文題目 Identification and functional analysis of cAMP receptor proteins in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120

和訳 糸状性ラン藻 *Anabaena* sp. strain PCC 7120 における cAMP 受容体タンパク質の同定と機能解析

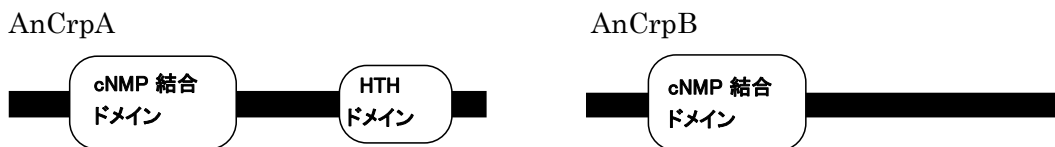
氏名 鈴木 崇之

生物は外界の環境刺激に応答し、その情報を細胞内に伝達するために細胞内シグナル伝達物質を用いる。その一つに cAMP が存在し、cAMP は微生物から哺乳類まで幅広い生物種に存在する。哺乳類では、A キナーゼが細胞内で cAMP により活性化され、グリコーゲン、糖、脂質などの代謝を調節することが知られている。一方、微生物では cAMP は cAMP 受容体タンパク質(cAMP Receptor Protein: CRP)と結合し、cAMP-CRP 複合体が遺伝子転写調節因子としての機能を持つことが知られている。

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う生物として知られ、cAMP 合成酵素の存在は認められているが、cAMP の機能については単細胞性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 において細胞運動への関与が判明している。糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 (以下 *Anabaena* 7120 と略) にも cAMP 合成酵素は存在するが、運動性を持たないため cAMP の機能については不明である。本研究では *Anabaena* 7120 における cAMP の機能を解明することを目的として、CRP の解析を行った。

*Anabaena* 7120 は 2001 年に全ゲノム配列が決定され、公開された。このゲノム情報をもとに、CRP をコードすると予測される遺伝子の探索を行った。その際の判定基準として、遺伝子の翻訳産物が他の生物で確認されている CRP と相同性が高く、なおかつ cAMP が結合すると予想される環状ヌクレオチドリン酸 (cNMP) 結合ドメインを持つことと定めた。最終的に候補遺伝子を二つに絞り込み、それぞれ *ancrpA*、*ancrpB* と命名した。それぞれの翻訳産物

について立体構造を予測した結果、*ancrpA* の翻訳産物 (AnCrpA) はアミノ末端側に cNMP 結合ドメインを持ち、カルボキシル末端側に DNA 結合ドメインであるヘリックス-ターン-ヘリックスドメイン (HTH ドメイン) を持つと予測された (下図参照)。この構造は、他の生物に見られる一般的な CRP の構造と一致する。一方 *ancrpB* の翻訳産物 (AnCrpB) はアミノ末端側に cNMP 結合ドメインを持つが、DNA 結合ドメインは持たないとの構造予測結果が得られた (下図参照)。



AnCrpA、AnCrpB それぞれの生化学的性質を調べるために、ヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させ、親和性クロマトグラフィーによる精製を行った。次に、平衡透析法を用いてこれら精製タンパク質の cAMP 結合能を調べた。その結果、AnCrpA は cAMP に対する解離定数が約  $0.8 \mu\text{M}$  であり、cGMP や、cAMP の分解産物である  $5' \text{-AMP}$  には親和性を持たないことが判明した。また、AnCrpA の解離定数値はこれまでに調べられた全ての CRP の解離定数値の中で最も低い値であった。一方、AnCrpB の cAMP に対する解離定数は約  $60 \mu\text{M}$  であり、cGMP に対してもわずかな親和性を示した。

一般的に cAMP-CRP 複合体は DNA 結合ドメインを介して特定の DNA 配列 (コンセンサス DNA 配列:  $5' \text{-TGTGA-N}_6 \text{-TCACA-3'}$ ) と結合する性質を持つ。そこで AnCrpA と AnCrpB のコンセンサス DNA 配列に対する結合性を、ゲルシフト法を用いて解析した。その結果、AnCrpA は cAMP 存在下においてコンセンサス DNA 配列と特異的に結合することが示された。同様に AnCrpB のコンセンサス DNA 配列に対する結合性を調べた結果、AnCrpB は一般的な DNA 結合モチーフを持たないとの構造予測結果が得られたにも関わらず、比較的高濃度の cAMP 存在下において、コンセンサス DNA 配列との結合が確認された。この結合は AnCrpA のコンセンサス DNA 配列に対する親和性と比較すると弱いものの、競合 DNA の添加による影響を受けなかったため特異的な結合であることが証明された。よって、AnCrpB は既存の DNA 結合モチーフとは異なる未知の DNA 結合モチーフを持つと考えられる。

次に細胞内における AnCrpA、AnCrpB の機能を調べるため、それぞれをコードする遺伝子の破壊株を作製した。遺伝子破壊株それぞれの表現型を調べた結果、*ancrpA* 遺伝子破壊株

では硝酸塩培地中で窒素固定細胞であるヘテロシストの形成抑制が加速することが判明した。cAMP に対する親和性や遺伝子破壊株の表現型解析により、*Anabaena* 7120 では主に AnCrpA を介して cAMP シグナル伝達経路が形成されると仮定される。従って、AnCrpA 標的遺伝子の同定を次の目的とした。標的遺伝子のスクリーニングには *Anabaena* オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用い、*ancrpA* 遺伝子破壊株の全 mRNA レベルを野生株の全 mRNA レベルと比較した。その結果、硝酸塩培地中で窒素固定関連遺伝子群の mRNA レベルが *ancrpA* 遺伝子破壊株において野生株と比較して著しく低下することが判明した。その一方で、鉄欠乏ストレスに応答して誘導される遺伝子群や乾燥ストレスに応答する糖転移酵素遺伝子群、トレハロース代謝酵素遺伝子群などの mRNA レベルが *ancrpA* 遺伝子破壊株において野生株と比較して増加していることが判明した。*ancrpA* 遺伝子破壊によって野生株と比較して mRNA レベルが変化したこれら遺伝子群の中から幾つかの遺伝子を選別し、定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて、それぞれの mRNA レベルを *ancrpA* 遺伝子破壊株と野生株とで比較したところ、DNA マイクロアレイと同様の結果が確認された。

*ancrpA* 遺伝子破壊株において、mRNA レベルが野生株と比較して顕著に低下していた遺伝子は、AnCrpA が直接的あるいは間接的に遺伝子発現を正に制御していると考えられる。そこで AnCrpA の標的遺伝子候補としてスクリーニングされた各遺伝子の 5' 上流領域において、コンセンサス DNA 配列や、それに近い DNA 配列を検索したが、相当する配列は検出されなかった。しかし、*ancrpA* 遺伝子破壊株において mRNA レベルが野生株と比較して低下していた窒素固定関連遺伝子群の 5' 上流領域と AnCrpA を用いてゲルシフト解析を行ったところ、コンセンサス DNA 配列との結合親和性と比較するとそれらの親和性は低くなるものの、cAMP 存在下において AnCrpA と特異的に結合する DNA 領域の存在が明らかになった。従って、これら窒素固定関連遺伝子群遺伝子は AnCrpA によって発現が調節され得ることが示唆された。

AnCrpA の特異的結合が確認された DNA 領域にはコンセンサス DNA 配列や、それに近い DNA 配列は発見されなかったため、AnCrpA が認識する DNA 配列を *in vitro* セレクション法を用いて推定した。得られた DNA 配列情報をもとに隠れマルコフモデルを用いたマルチプルアラインメントプロファイルを作成し、AnCrpA が特異的に結合した DNA 領域において AnCrpA 結合 DNA 配列を推測した。その中の一つである *nifB* の 5' 上流領域に存在する推定 AnCrpA 結合 DNA 配列において、AnCrpA 結合に重要であると推測されたヌクレオチドを別のヌクレオチドに置換した DNA 配列を用いてゲルシフト解析を行った結果、変異型 DNA を用いた場合に AnCrpA 結合性の低下が確認された。よって推定ヌクレオチド配列の妥当性が確

認された。

*Anabaena* 7120 は、培地にアンモニアを加えるとヘテロシスト形成が完全に抑制されるが、その培養条件下でマイクロアレイ実験を行った結果、窒素固定関連遺伝子群の mRNA レベルは野生株と *ancrpA* 遺伝子破壊株間で同程度であった。*Anabaena* 7120 におけるヘテロシスト形成は培地から窒素源を取り除いた後に 24 時間で完了する。そこで、培地から窒素源を取り除き、その後 3、8、24 時間の時間経過で mRNA を抽出し、マイクロアレイ実験を行ったが、いずれの試料においても窒素固定関連遺伝子群の mRNA レベルは野生株と *ancrpA* 遺伝子破壊株間で同程度であった。これらの結果より、AnCrpA はヘテロシスト形成時には窒素固定に関連した機能を果たしていないと考えられる。しかし培地から窒素源を取り除き、48 時間経過後の試料においては、窒素固定関連遺伝子群の mRNA レベルが *ancrpA* 遺伝子破壊株において野生株と比較して低下していた。従って、AnCrpA が窒素固定関連遺伝子発現を促進するのはヘテロシストが完成した後であると考えられる。

一連のマイクロアレイの結果から、培養条件に関わらず mRNA レベルが *ancrpA* 遺伝子破壊株において野生株と比較して常に低下している遺伝子 *alr3280* (*sigG*) が同定された。*sigG* の 5' 上流領域には推定 AnCrpA 結合配列 (5'-GATGATGTACATCACT-3') が存在し、この配列は、*in vitro* セレクションで推定された AnCrpA 結合 DNA 配列とほぼ一致する。従って *sigG* は培養条件に依存しない AnCrpA の標的遺伝子であると考えられる。*Anabaena* 7120 の近縁種 *Nostoc* sp. HK-01 においては、*sigG* は乾燥ストレス耐性を増強させる機能を持つ遺伝子であると考えられている。*sigG* の発現レベルが低い *ancrpA* 遺伝子破壊株を用いて細胞に乾燥ストレスを与えた結果、*ancrpA* 遺伝子破壊株は野生株と比較して乾燥耐性が低いことが判明した。