

論文審査の結果の要旨

鈴木崇之

本論文「Identification and functional analysis of cAMP receptor proteins in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120」(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)は、2章構成に成っており、第1章では cAMP 受容体タンパク質の同定、第2章では主要な cAMP 受容体タンパク質である AnCrpA による遺伝子発現制御の解析結果を報告している。

本研究では、近年のシアノバクテリアのシグナル伝達経路の中で注目されているサイクリック AMP(cAMP)の役割を、その受容体タンパク質の生化学的解析と遺伝子発現における機能解析によって明らかにした。cAMP シグナル伝達経路は、動物や大腸菌などのいくつかの生物では非常に重要な二次メッセンジャーとしてさまざまな調節現象に関わっていることがよく知られているが、植物や下等生物ではその存在も含めて明らかでない場合が多い。一方、シアノバクテリアでは、大森らの研究により、おもに単細胞性の *Synechocystis* sp. PCC 6803 における合成酵素、受容体とその標的遺伝子の研究が精力的に行われており、細胞運動などに関わっていることが示されてきた。しかし、シアノバクテリアで初めて cAMP が発見されたのは糸状性の窒素固定型シアノバクテリア *Anabaena cylindrica* であり、最初の cAMP 合成酵素が単離されたのも糸状性のシアノバクテリア *Spirulina platensis* であった。これらの種における cAMP の調節は光による代謝調節などの可能性も指摘されており、上記の *Synechocystis* とは異なっている。本研究では、このような背景を元に、糸状性で遺伝子操作が容易な *Anabaena* sp. PCC 7120 を用い、そのシグナル伝達経路を明らかにしたものである。

第1章では、バイオインフォマティクス解析により抽出されてきた環

状ヌクレオチド結合配列をもつ受容体をコードする候補遺伝子(*ancrpA* と *ancrpB*)に注目し、そのコードするタンパク質を大量発現・精製した。これらを用いて cAMP と cGMP に対する親和性を求め、AnCrpA タンパク質は cAMP に対して特異的で、その解離定数は約 0.8 μM であった。この値は、これまでに調べられている cAMP 受容体タンパク質の中で親和性がもっとも高いことを示している。一方、AnCrpB タンパク質は cAMP に対する解離定数は約 60 μM であり、cGMP に対してもわずかな親和性を示した。なお、AnCrpA タンパク質はヘリックスターンヘリックス型の DNA 結合ドメインと思われる領域をもっていた。そのため、推定 DNA 結合部分のアミノ酸配列の相同性から、AnCrpA タンパク質はよく知られている大腸菌などの cAMP 受容体の DNA 結合配列に結合するのではないかと予測し、cAMP 存在下での特異的な結合をゲルシフト法によって検証した。その結果、AnCrpA タンパク質は cAMP 依存的に予想配列のオリゴ DNA に結合した。一方、AnCrpB タンパク質には上記の DNA 結合モチーフのような明確な特徴はなかったが、ゲルシフト法において AnCrpB タンパク質も比較的高濃度の cAMP の存在下で同じオリゴ DNA に特異的に結合した。以上の結果は、糸状性窒素固定型シアノバクテリアにおける cAMP 受容型転写因子を同定した最初の結果である。

第 2 章では、細胞内における AnCrpA、AnCrpB タンパク質の機能を調べるために、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。その表現型としては、*ancrpA* 破壊株では硝酸塩培地中で窒素固定細胞ヘテロシストの形成抑制が加速することを見いだした。そのため、転写因子としての AnCrpA タンパク質の標的遺伝子を探索するために、オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用い、*ancrpA* 破壊株の遺伝子発現レベルを野生株と比較した。その結果、硝酸塩培地中で窒素固定関連遺伝子群(*nifB* オペロン、*hglE* 群、*coxB* 群、*hepC* 群など)の mRNA レベルが著しく低下することを見いだした。一方、鉄欠乏ストレス誘導遺伝子や乾燥ストレス応答性の糖転移酵素遺伝子群やトレハロース代謝酵素遺伝子群などのレベルは上昇していた。これらの結果は、定量 PCR によって検証した。これらの遺伝子破壊の結果が AnCrpA タンパク質の直接の作用によるものかどうかを確かめるために、これらの遺伝子の 5' 上流領域に対する特異的な結合をゲルシフト法によって確認した。その結果、*nifB* 上流配列、*all5347* 上流配列、*nifH* 上流配列の内部に特異的に結合する領域があり、しかもその結合は cAMP 依存的であることを見いだした。しかし、これらの結合領域には、上記の AnCrpA 結

合予想配列は見いだされなかった。そのため、AnCrpA タンパク質が本来結合する配列を *in vitro* セレクション法によって推定した。得られた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 タンパク質が結合した DNA 領域を探索した。こうして、推定した配列のひとつである *nifB* の 5' 上流配列を標的として、AnCrpA タンパク質の結合をゲルシフト法によって確認するとともに、標的配列に変異を導入した DNA には結合しないことを示した。以上の結果は、*in vitro* セレクション法の妥当性ととも転写因子の認識配列の推定を拡張できることを示している。一方、*ancrpB* 破壊株には特徴的な表現型はなく、マイクロアレイ解析でも大きな影響は認められなかった。このことは AnCrpB タンパク質が特定の条件でのみ作用する調節因子であることを示唆している。

なお、本論文の第 1 章は、吉村英尚、久堀徹、大森正之との共同研究であり、第 2 章は、吉村英尚、得平茂樹、池内昌彦、大森正之との共同研究であるが、どちらの場合も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。