

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小山内 崇

炭素・窒素の各代謝機構は古くから研究がなされてきたが、両代謝間に存在する「代謝間相互作用」機構については未知な点が多い。本論文は、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) を研究材料とし、炭素/窒素 (C/N) バランス調節機構についても研究をまとめたもので、6章からなっている。

第1章では、シアノバクテリア C/N バランスの調節に主要な役割を果たす3種のタンパク質、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigE、シグナル伝達因子 PII、転写因子 NtcA の概説とともに、当該分野におけるトランスクリプトーム、プロテオーム研究の不足を指摘し、本論文の目的であるシアノバクテリア C/N バランス調節機構の解明の意義を述べている。

第2章では、これまで未解明であった *Synechocystis* グループ 2 シグマ因子 SigE の制御下にある遺伝子の探索を、マイクロアレイを用いて行った。その結果、SigE 欠損株において、解糖系、酸化性的ペントースリン酸 (OPP) 経路、グリコーゲン異化などの糖異化酵素遺伝子群の発現が減少していることを発見し、また、酵素活性、グリコーゲン量、グルコース取り込み速度、暗条件下での表現型などの解析から、SigE が糖異化の正の制御因子であることを結論づけた。

第3章では、シアノバクテリアにおける C/N バランスセンサーである PII の結合タンパク質を、かずさ DNA 研究所との共同研究により、酵母ツーハイブリッドスクリーニング法を用いて探索した。その結果、新規 PII 結合タンパク質 Sll0985 が得られ、これを PamA (PII associated membrane protein A) と名付けた。In vitro における結合検定の結果、PII と PamA の C 末端領域(475-680 アミノ酸残基)が、In vitro で相互作用することが明らかとなった。次に PamA 欠損株を作製し、トランスクリプトーム解析を行ったところ、sigE を含む NtcA の制御下にある窒素関連遺伝子群の一部の mRNA 量が、PamA 欠損株において減少していた。野生株に比べ、PamA 欠損株では SigE のタンパク質量も減少しており、これに一致して糖異化遺伝子群の mRNA 量も減少していることが明らかとなった。これらの結果により、PamA が遺伝学的に窒素代謝、糖異化遺伝子群の発現を正に制御することを示している。

第4章では、マイクロアレイを用いてゲノムワイドな窒素欠乏下での発現解析を行い、解糖系、OPP 経路、グリコーゲン異化などの糖異化遺伝子群の mRNA 量が、窒素欠乏により増加することを明らかにした。窒素関連転写因子 NtcA の変異株 (NtcA タンパク質量が約 50%に減少した株) を作製し、ノーザン解析を行ったところ、糖異化遺伝子群の窒素欠乏下での発現誘導が大きく減少することを見出した。しかし、糖異化遺伝子群のプロモーター領域には NtcA 結合部位が見られないため、NtcA はその制御下にある未知の転写因

子を介して、糖異化遺伝子群の転写を窒素欠乏時に促進することが考えられた。

第5章では、酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより SigE 結合タンパク質を探索し、クロロフィル合成酵素 Mg-キラターゼの H サブユニット ChlH と窒素同化酵素グルタミンシンセターゼ GS を結合タンパク質の候補として得た。GST-pulldown 法による結合検定の結果、GST-ChlH および GST-GS が His-SigE と結合すること、また、ChlH と SigE の結合が Mg^{2+} により促進されることを明らかにした。さらに、SigE と ChlH が Mg^{2+} 依存的に、細胞膜に共局在する可能性を示した。これらの結果より、ChlH が SigE と物理的相互作用することにより、SigE の活性を制御していることを示唆している。

第6章では、本研究の結果により構築された糖異化遺伝子発現制御機構のモデルが説明され、また、糖異化遺伝子およびその制御因子の共進化についても言及されている。

以上、本論文は、シアノバクテリアにおける炭素、窒素代謝制御機構における新規の制御因子を同定し、かつ新規の制御機構を提唱したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。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あるものと認めた。