

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 関 麻子

本論文は、シアノバクテリアにおけるグループ 1/2 シグマ因子群の基本的な機能について解析を行うとともに、これらシグマ因子群によるストレス応答、特に光環境応答について明らかにすることを目的として行われた研究であり、6章からなる。

序章では、真正細菌及びシアノバクテリアの転写装置 RNA ポリメラーゼ及びシグマ因子の分類、構造的特徴及び機能について、また、光合成生物であるシアノバクテリアの光合成装置や、光に応答した遺伝子発現制御について詳細に記述し、本研究の背景を解説している。

第一章では、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (以下 *Synechococcus*) におけるグループ 1/2 シグマ因子のプロモーター認識特異性について *in vitro* 転写解析を行っている。申請者はまず、*Synechococcus* 細胞から RNA ポリメラーゼコア酵素を精製し、大腸菌の過剰発現系を用いて発現精製したレコンビナントシグマ因子 RpoD1、RpoD3、RpoD4 と合わせて3種類の RNA ポリメラーゼホロ酵素を再構成した。これらホロ酵素とコンセンサス型プロモーター *tac*、RNA I、*rrnA* プロモーターを用いた *in vitro* 転写解析より、グループ 1/2 シグマ因子の認識特異性が類似しているが同一ではないことを明らかにしている。さらにこの結果から、シグマ因子とプロモーターが1対1の関係であるというこれまでの概念とは異なり、異なる環境条件下において発現する複数種のシグマ因子が1つのプロモーターの制御に関わる可能性を示した。

第二章では、*Synechococcus* のグループ 1/2 シグマ因子群のストレス応答性発現について検討を行った。まず、*Synechococcus* 細胞に塩、浸透圧、強光、暗、高温及び低温ストレスを与え、これらに応答したグループ 1/2 シグマ因子群の発現を mRNA 及び蛋白質レベルで解析した。その結果、RpoD3 を除くシグマ因子の mRNA 量はこれら条件で大きく変動するが、蛋白質量は一定に保たれていること。そして RpoD3 について、強光ストレス特異的に mRNA、タンパク質レベルで発現誘導されることを明らかにしている。そして、*rpoD3* 遺伝子破壊株が強光ストレスに感受性をもつことから、RpoD3 が強光ストレス時に発現、機能するシグマ因子であることを提唱している。

第三章では、*rpoD3* 遺伝子の強光ストレスによる発現誘導機構について解析を試みている。まず *rpoD3* 遺伝子の転写開始点の同定を行い、周辺領域の構造解析から、光応答性エレメント (HLR1) 様配列が存在することを明らかにした。HLR1 は、光応答性のシグナル伝達に寄与する二成分制御系センサーキナーゼである Nb1S 依存的に発現誘導される遺伝子群のプロモーター領域に見出されたコンセンサス配列である。このことから、*rpoD3* 遺伝子の強光応答性発現も Nb1S に依存している可能性が示唆された。

第四章では、強光ストレスに応答して RpoD3 非依存的に発現誘導される *sufBCDS* オペロンの発現誘導機構について、*Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) の *in vitro* 転写系を用いた解析を行っている。まず、RNA ポリメラーゼコア酵素の $\beta'$ サブユニットにヒスチジンタグを付与した *Synechocystis* 変異株を用いて、ニッケルアフィニティーカラムによる簡便な RNA ポリメラーゼ精製法を確立した。この方法で精製したコア酵素と、大腸菌過剰発現系を用いて発現精製したグループ 1 シグマ因子 SigA からホロ酵素を再構成し、*sufBCDS* オペロンの P1、P2 プロモーターからの転写が SigA 依存的であることを示している。さらに、遺伝学的な解析から同オペロンの負の制御因子であることが報告されている SufR 蛋白質が P2 には影響を及ぼさず、P1 からの転写を濃度依存的に抑制することを示した。これにより、強光ストレス時において P1 の抑制が解除されることが、細胞内での発現誘導のメカニズムであることが考えられた。

第五章では、RNA ポリメラーゼの特異性調節がシグマ因子以外にも RNA ポリメラーゼに結合する調節因子群によってもなされることを考慮し、シアノバクテリア RNA ポリメラーゼの結合蛋白質について検討している。その結果、RNA ポリメラーゼを更にグリセロール密度勾配法によって分画することで、RNA ポリメラーゼと共精製される数種の低分子量蛋白質を見出した。これらは質量分析法によりリボソーム蛋白質、集光アンテナサブユニットであることが同定され、この結果から転写と翻訳のカップリング、及び光依存的な転写装置の制御機構について示唆している。

以上、本論文はシアノバクテリアの環境適応機構を転写レベルで解明する目的で RNA ポリメラーゼのシグマ因子群に注目し、特に強光ストレスに関与するシグマ因子の機能と遺伝子発現制御機構について明らかにしたものであり、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。