

論文審査の結果の要旨

氏名 村松 昌幸

本論文においては、シアノバクテリアの強光順化の過程で観察される光化学系 I 複合体量減少の分子メカニズムの解析を行っている。強光下で系 I 複合体量調節に欠損のある変異株 (*pmgA* 変異株) が *Synechocystis* sp. PCC 6803 から単離されているが、この変異株は長時間強光培養を続けると致死となることから、系 I 複合体量減少は光障害回避のための重要な調節であると考えられる。したがって、その分子メカニズムを知る事は、強光順化における系 I 複合体量調節の意義を包括的に明らかにするためにも重要であると考えられる。

Synechocystis sp. PCC 6803 を弱光から強光へ移すと、ゲノム上に散在している系 I 複合体構成遺伝子群の発現が 1 時間以内に統一的に減少する。その後発現は多少増加するものの、弱光に比べると大きく抑制されたままである。*pmgA* 変異株では、強光シフト直後の系 I 遺伝子群の応答は、野生株と変わらないが、強光シフト 6 時間以降、系 I 反応中心サブユニットをコードする *psaAB* の発現が大きく増加する。さらに、PsaAB タンパク質量、およびクロロフィル量においても、野生株では強光シフトにより大きく減少し、その後低く維持されているが、*pmgA* 変異株においては、強光シフト 6 時間以降から顕著な増加が観察される。したがって、シアノバクテリアの強光下での系 I 複合体量調節は、強光シフト後 6 時間までの(Phase 1)の PmgA に依存しない調節と、6 時間以降の(Phase 2)、PmgA に依存した調節があることが示された。本論文では、Phase 1 における系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制メカニズム、さらに Phase 2 における PmgA の機能を探ることにより、強光下での系 I 複合体量調節メカニズムの解明を行なっている。

1 章 Phase 1 における系 I 遺伝子群の転写調節メカニズム

1 章では、*psaAB* および系 I 小サブユニットをコードする *psaD* について、プライマー伸長法、およびレポーターアッセイを行い、プロモーター構造を詳細に調べた上で、両者の比較を行い、共通の光応答に必要なシス配列の同定を行っている。このシス配列は、各プロモーターの-35 配列上流に存在しており、AT リッチであることが特徴的である。さらに、他の系 I 遺伝子群 *psaC*, *psaE*, *psaK1*, *psaL1* についても転写開始点を決定しプロモーターの-35 配列上流を比較したところ、やはり AT に富む配列が存在し、さらにこの領域を欠失させると光応答性が失われることを見出している。このことから、Phase 1 における系 I 遺伝子群の統一的な転写抑制は、系 I 遺伝子群プロモーターに共通に存在する-35 配列上流の AT リッチな配列により制御されていることが示された。

2 章 Phase 2 における PmgA の役割

2 章では、強光シフト 6 時間以降に観察される PmgA を介した系 I 複合体量抑制メカニズムについて、2 つの観点から解析を行っている。1 つ目として、Phase 2 において、*pmgA* 破壊株では *psaAB* 転写産物量の蓄積が顕著にみられる。そこで、PmgA による *psaAB* の転写抑制がどれだけ重要であるのかを知るため、強光下で *psaAB* の転写を過剰発現させた株を作成し検証を行っている。*psaAB* を強

光下で強発現させた *psaAB*-OX 株の表現型は、クロロフィル量や系 I 複合体量は野生株同様の減少を示しており、この結果は、*psaAB* 転写産物量のみで強光下での系 I 複合体量が規定されているわけではないことを示している。一方、*psaAB*-OX 株の生育は、弱光下では正常であったが、強光下で大きく阻害されたことから、*psaAB* の転写抑制が強光下での生育に必須であることが示されている。

2 つ目の観点としては、Phase 2 において、*pmgA* 破壊株ではクロロフィル量を低く維持できないという表現型が観察されることから、系 I 複合体量とクロロフィル量との関係について解析を行っている。強光下において、クロロフィル合成阻害剤であるレブリン酸を、*pmgA* 変異株に対して添加し、*pmgA* 破壊株における強光下での過剰なクロロフィル量の蓄積を野生株程度に抑ええたところ、系 I 複合体量も野生株程度まで抑制された。すなわち、強光下で系 I 複合体量を減少させるためには、クロロフィル合成量を低く保ち続けることが重要であることが示された。さらに *pmgA* 破壊株におけるクロロフィル量の抑制維持欠損原因の同定を行っている。クロロフィル合成系における最初の律速段階である、5-アミノレブリン酸(5-ALA)合成の活性を調べたところ、Phase 1 では野生株と *pmgA* 破壊株ともに大きく減少していたが、Phase 2 では、*pmgA* 破壊株でその活性が再び大きく増加していた。この結果は PmgA が、Phase 2 では *psaAB* 転写産物量の抑制に関与するのに加え、クロロフィル合成経路の初期段階を抑制し、その結果クロロフィル量の低下、ひいては系 I 複合体量の減少を達成していることを示している。

本論文 2 章ではさらに、PmgA が系 I 複合体量調節以外に、どのような調節を担っているのか同定を試みている。PmgA のアミノ酸配列は、枯草菌のアンチシグマ因子と、弱いながら相同性を持つ。このことから、PmgA は *psaAB* 以外にも多くの遺伝子発現調節に関わるのではないかと考え、DNA マイクロアレイ解析を行っている。その結果、強光シフト後 12 時間において、*pmgA* 変異株では野生株に比べて無機炭素取り込みに関わる遺伝子群 *cmpB*, *sbtA*, *ndhD3* の発現が増加していることが示されている。なお、*sbtA* の発現をさらに詳細に調べたところ、*psaAB* の発現と同様、Phase 2 においてはじめて野生株と *pmgA* 変異株間で違いが見られている。また、*pmgA* 破壊株では、高濃度の CO₂ 存在下のほうが低濃度 CO₂ 存在下より生育が悪くなることを見出している。このことから、PmgA は、強光下での無機炭素取り込みを抑制し、致死とならないよう制御している可能性が示された。

以上の解析結果から、強光下での系 I 複合体量の調節は、2 つのフェーズで行なわれていること、フェーズ I では系 I 遺伝子群の転写抑制が顕著でありその統一的な応答は系 I 遺伝子群プロモーターに共通に存在する AT リッチ配列により制御されていること、フェーズ 2 では PmgA によるクロロフィル量の調節が重要であること、更には、PmgA はこのフェーズにおいて無機炭素取り込みの調節にも関与していることが示された。

なお、本論文の第 I 章は、埼玉大学の日原由香子氏、また、第 II 章は主査である園池公毅氏および埼玉大学の日原由香子氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。