論文の内容の要旨

Elucidation of the mechanism of dehydration-rehydration tolerance in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120

（糸状性ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 における乾燥・再水和耐性機構の解明）

氏名 肥後明佳

序論

水は生物にとって必須であり、乾燥状態に耐えられる生物は少ない。しかしながら極限的な乾燥状態を生き抜くことが可能な生物も広い範囲の生物界に存在する。ワムシやクマムシなどの微小な動物、復活草、植物の種子、酵母、土壌細菌などである。これらの生物が乾燥状態に耐えるための機構として、二糖類の蓄積が重要な役割を果たすと信じられている。また、乾燥に強い高等植物やコケ類は乾燥過程において代謝活動を能動的に停止し、活性酸素の発生を抑えることが重要なメカニズムであることが近年言われている。一方、耐乾性の獲得には、乾燥した細胞が水分を吸収し、代謝活動を再開する再水和過程も重要であると考えられる。停止している代謝活動を再開していく再水和過程の方が活性酸素を発生しやすく、細胞にストレスがかかりやすいという可能性も議論されており、再水和過程は単純な修復・回復過程ではないことが示唆されている。

ラン藻は水圏生物として知られているが、土壌に生息できるラン藻も存在し、非常に強い乾燥耐性を持っている。陸生ラン藻の乾燥耐性機構を解明することは土壌改善や砂漠緑化などへの応用にもつながる重要性を持つ。*Nostoc commune* を初めとする強い乾燥耐性能を持つ陸生ラン藻は、遺伝子操作系が現在のところ開発されていないことなどから、遺伝子レベルでの研究は遅れている。これに対して *N commune* に近縁な *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC 7120 株は、*N. commune* ほど乾燥耐性能を持たないが、数日間の乾燥には十分耐えることができ、遺伝子操作が可能であることなどから、分子レベルでの解析に利用できる。そこで私は *Anabaena* sp. PCC 7120 を用いて乾燥耐性機構の研究を進めた。第 1 章では DNA マイクロアレイ解析により *Anabaena* sp. PCC 7120 の乾燥及び再水和時の網羅的遺伝子発現の解析を行った。第 2 章では再水和過程において cAMP 信号伝達系に着目し、解析を進めた。

第1章 乾燥・再水和時における網羅的遺伝子発現解析

Anabaena sp. PCC 7120において乾燥・再水和時各3点ずつについてDNAマイクロアレイ解析を行った。乾燥過程では、399個の遺伝子の発現量が少なくとも1点において増加していた。再水和過程では769個の遺伝子の発現量が増加していた。これらのうち292個の遺伝子が乾燥・再水和両方の過程において共通に発現量が増加していた (Fig. 1)。これら遺伝子の多くは塩や低温ストレス時などにおいても発現量が増加する一般ストレス応答遺伝子と考えられるものであり、再水和過程においても何らかのストレスがかかっていることが示唆された。乾燥過程特異的に転写産物量が増加した遺伝子は29個あり、そのうちの大部分は機能未知の遺伝子であった。逆に、再水和過程特異的に発現量が増加した遺伝子は259個あり、急激かつ一過的な応答を示すものが多かった。タンパク質の再フォールディングや分解、あるいはDNAの修復に関わる遺伝子など、明らかに細胞の修復に寄与すると考えられる遺伝子群の他、様々な代謝に関わる遺伝子群の発現量が増加していた。その中には、cytochrome *c* oxidaseやNADプールの新規合成、また、窒素欠乏時や無機炭酸欠乏時に発現が誘導される遺伝子などを含んでいた。また、RuBisCOやATP合成、光化学系、窒素固定など細胞内の主要な代謝に関わる遺伝子群の発現量は乾燥過程において段階的に減少し、逆に再水和過程では段階的に回復していった (Fig. 2)。

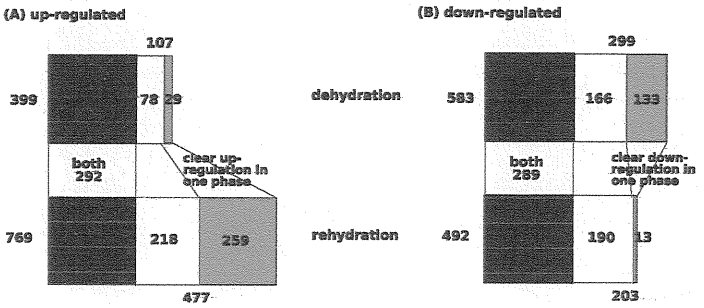

Fig. 1. 乾燥・再水和過程において発現量が変化した遺伝子の数

再水和過程で発現量が増加した転写因子をコードする遺伝子は8つあったが、そのうち転写促進因子をコードすると考えられたのは*ancrpB*と*alr0618*の2つであった。AnCrpBはcAMP依存的にDNA結合活性を示すことが既に報告されているが、Alr0618にはcAMP結合モチーフはない。*ancrpB*破壊株では、窒素欠乏時に発現が誘導される遺伝子の誘導が起こらなかった。また、*alr0618*破壊株では無機炭酸の取込に関わる遺伝子群の発現誘導が起こらなかった。

以上の結果から、乾燥・再水和過程に起こる転写産物量の変化の全体像を把握することができた。乾燥過程で発現量が増加した遺伝子の多くは再水和過程でも発現量が増加しており、これら遺伝子群は細胞の乾燥に直接応答しているわけではないことが示唆された。また、再水和過程は乾燥過程の逆の現象ではなく、乾燥過程とは違う側面を見せた。再水和

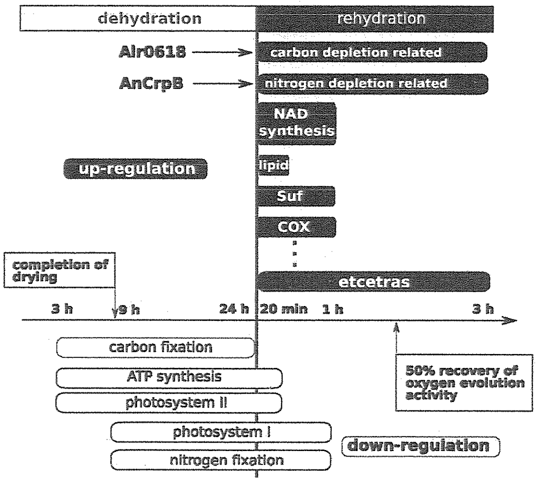

Fig. 2. 乾燥・再水和過程における様々な代謝活動に関わる遺伝子の発現変化

過程においてはダイナミックに細胞の修復や様々な代謝に関係する遺伝子群の発現量が増加することが示され、再水和過程では、短時間のうちに様々な代謝活動が活発になることが示唆された。

第2章 cAMPによる再水和過程における酸素消費活性の制御と酸化ストレスとの関係

次に再水和時の代謝活動の制御機構及び因子の同定を目指した。第1章では推定転写因子 *ancrpB* は再水和過程における遺伝子発現調節に寄与することを明らかにした。さらに再水和過程における代謝制御に関する理解を深めるため、第2章では cAMP 信号伝達系の再水和過程における役割の解明を目指した。

再水和過程において cAMP 濃度の測定を行ったところ、3分以内に細胞内濃度が急激に増加し、その後通常レベルまで減少した。cAMP 合成酵素遺伝子 *cyaC* 遺伝子破壊株では再水和時の cAMP 濃度の増加が起こらなかった (Fig. 3)。そこで、再水和過程における cAMP 信号伝達系の役割を調べるため、遺伝子破壊株を用いて解析を進めた。

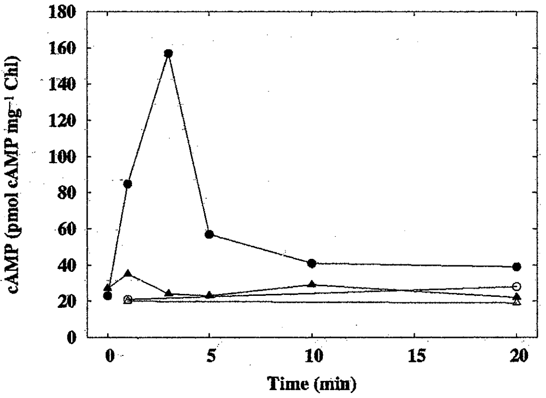

Fig. 3. 再水和過程における cAMP 濃度の変化。丸は野性株、三角は *cyaC* 破壊株、塗りつぶしは培養液全体、白抜きは細胞外の cAMP 濃度を表す。

cyaC 破壊株は、再水和30分以内において野性株に比べ、暗所での酸素消費活性が高いということが明らかとなった (Fig. 4)。そこで、*cyaC* 破壊株では酸化ストレスがかかっている可能性を考えて、細胞への酸化ストレスを2つのマーカー分子により評価した。まず脂肪酸の過酸化によって生じるマロンジアルデヒド (MDA) 量を測定した (Fig. 5)。再水和直後には差が見られなかったが、30分後には野性株に比べ *cyaC* 破壊株では MDA 量が高かった。酸化ストレスにより進むタンパク質のカルボニル化を OxyBlot kit (Chemicon International Inc) を用いて評価したところ、同様の結果が得られた。以上のことから、*cyaC* 破壊株では再水和時に酸化ストレスがかかっていることが示唆された。

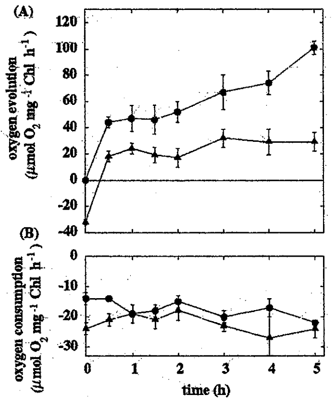

Fig. 4. 再水和過程における酸素発生 (A) 及び酸素消費活性 (B) の回復。丸は野性株、三角は *cyaC* 破壊株を示す。

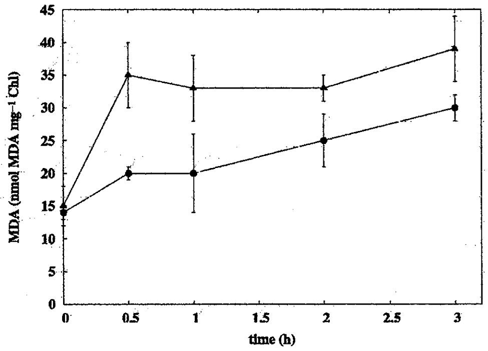

Fig. 5. 再水和過程における MDA 含量の変化。丸は野性株、三角は *cyaC* 破壊株を示す。

cyaC 破壊株において、再水和直後において cAMP を加えたところ、酸素消費活性が野性株程度に抑制された。さらに、cAMP を加えて再水和を行った *cyaC* 破壊株では MDA 量の増加が抑制された。*cyaC* 破壊株において KCN を低濃度加え、酸素消費活性を部分的に抑制したところ、MDA 量の増加が抑制された (Table 1)。以上のことから cAMP は再水和過程において酸素消費活性の制御を行い、酸化ストレスを防ぐ役割を持つことが示唆された。

乾燥時の生存率について調べたところ、*ancrpB* 破壊株では野性株と同程度であったが、*cyaC* 破壊株は野性株に比べ低下していた。また、DNA マイクロアレイ解析の結果、cAMP と AnCrpB はそれぞれ別のシグナルカスケードに属することが示唆された。

以上の結果から cAMP は再水和直後に酸素消費活性を抑制する役割を持つことが示された。さらに、呼吸活性を制御することで酸化ストレスの発生を抑制し、乾燥耐性の獲得につながることが示された。以上の結果をまとめると、素早い代謝活動の回復は再水和過程において必要であるが、全体的なバランスが重要であると結論した。

Table 1.　再水和直後の酸素消費活性と酸化ストレス

		control	200 μM cAMP	3 μM KCN
O_2 consumption activity	wt	10±2	10±1	N.D.
upon rehydration[a]	*cyaC* disruptant	24±6	12±3	12±3
MDA level after	wt	20±1	N.D.	N.D.
30 min of rehydration[b]	*cyaC* disruptant	35±5	17±1	19±5

[a] μmol O_2 mg^{-1} Chl h^{-1}
[b] nmol mg^{-1} Chl
N.D.; not determined