

論文審査の結果の要旨

肥後 明佳

本論文「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)は、2章構成として、第1章では乾燥・再水和時における網羅的遺伝子発現解析、第2章では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についての解析結果を報告している。

乾燥ストレスは、水と炭酸ガスを必要とする光合成反応にはもっとも生じやすいストレスであり、光合成生物は常にこれを避ける手だてを準備している。本研究では、乾燥ストレスに強い陸生ラン藻における乾燥耐性にかかわる応答機構を分子レベルで解析することを目指した。この仲間でもっとも耐性が強い *Nostoc commune* などがよく知られているが、分子生物学的解析には適していない。また、モデル生物としてよく知られている *Synechocystis* sp. PCC 6803 は乾燥耐性がなく、不適である。したがって、ゲノム解析が完了し、遺伝子破壊が可能で乾燥耐性をある程度保持している陸生ラン藻 *Anabaena* sp. PCC 7120 をモデル生物として用い、マイクロアレイ解析や遺伝子破壊を駆使して分子生物学的研究を行った。

第1章では、乾燥ストレス時と再水和時の遺伝子発現の変化を網羅的にDNAマイクロアレイ解析によって明らかにした。乾燥過程では399個の遺伝子の発現量が明らかに増加していた。また、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。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し

ている。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、細胞の修復に寄与する遺伝子群や、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。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個あったが、そのうち転写促進因子をコードするのは *ancrpB*と *alr0618*の2個であった。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、乾燥・再水和過程に起こる転写産物量の変化の全体像を明らかにした。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、再水和過程は乾燥過程の逆の現象ではないことが明らかになった。

第2章では、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を解析した。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。さらに、再水和30分以内において野性株に比べ、*cyaC* 破壊株は暗所での酸素消費活性が高いことを見いだした。そこで、酸化ストレスを予想して、細胞での酸化ストレスの蓄積をマーカー分子により評価した。脂肪酸の過酸化によって生じるマロンジアルデヒド(MDA)量を測定したところ、再水和直後にはこの量に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。また、酸化ストレスにより促進されるタンパク質のカルボニル化を定量し、同様の結果を得た。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を示唆した。

*cyaC*破壊株において、再水和直後においてcAMPの添加によって、酸素

消費活性が野性株程度に抑制された。また、再水和におけるMDA量の増加も抑制された。さらに、*cyaC*破壊株に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量の増加を抑制した。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有意に低下していた。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を示された。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。

なお、本論文の第1章、第2章ともに、鈴木崇之、池内昌彦、大森正之との共同研究である。しかし、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。