

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 17 年度博士課程 進学

氏名 東 美由紀

指導教員名 田中 寛

## 論文題目

シアノバクテリアにおける糖異化遺伝子群の発現制御に関する研究

### 第一章 序論

代謝は、細胞の生存に必要な物質合成やエネルギー獲得の手段であり、細胞の生育環境に合わせて厳密な調節を受けている。生物が生存するためには様々な栄養源が必要とされるが、窒素はアミノ酸や核酸、ビタミンなど多くの生体物質中に含まれ、光合成生物の生産性の鍵を握る元素である。そこで本研究では、光合成生物のモデル系であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *Synechocystis*) を用い、窒素栄養欠乏下での代謝調節機構を、特に転写制御機構を中心に解析した。

*Synechocystis* においては、窒素欠乏時に糖代謝が同化から異化に切り換わることがこれまでの研究により示唆されている (Osanai et al., 2006)。また、この代謝のスイッチングには窒素欠乏のセンサータンパク質 PII や転写因子 NtcA、PII 相互作用タンパク質 PamA、RNA ポリメラーゼシグマ因子 SigEなどを介したシグナル伝達機構があることが明らかになっている (Osanai et al., 2007)。本研究では、新たに窒素欠乏時に誘導される二成分制御系レスポンスレギュレーター Rre37 が糖異化遺伝子群の発現誘導に関与することを見だし、以下の解析により新規因子の機能の解明と、糖異化遺伝子群の発現調節ネットワークの詳細を明らかにした。

### 第二章 窒素誘導性レスポンスレギュレーター Rre37 の発現解析

シアノバクテリアが窒素欠乏にさらされると、その状況に対応するために遺伝子発現を大きく変化させる。その際に、遺伝子の発現制御の中心的な役割を果たしているのが転写因子 NtcA である。

NtcA は、シアノバクテリアおよび紅藻葉緑体に保存されており、窒素関連遺伝子群の転写を幅広く制御している。NtcA による転写の活性化/抑制は、遺伝子のプロモーター領域に存在するコンセンサス配列 (GTAN<sub>8</sub>TAC) に NtcA が結合することで起こり、その結合は窒素飢餓のシグナル物質である 2-オキシグルタル酸によって促進されることが知られている。最近のバイオインフォマティクスの解析により、二成分制御系のレスポンスレギュレーター *rre37* のプロモーターに NtcA 結合配列があることが予測され (Su et al., 2005)、*rre37* 発現量が窒素欠乏下で著しく増加することが、マイクロアレイ解析により明らかにされている (Osanai et al., 2006)。そこで本研究では、Rre37 が窒素欠乏下で重要な役割を果たしていると考え、その機能を詳しく調べることにした。

まず初めに、*rre37* の発現が NtcA によって調節されることを実験的に証明するため、*ntcA* ノックダウン変異株 (*ntcA* 遺伝子は生育に必須であることから、多コピーの染色体にコードされた遺伝子のコピー数を減少させ、発現量を抑制した変異株) における *rre37* の発現量を解析した。その結果、野生株では窒素欠乏により *rre37* の発現が mRNA 量、タンパク質量の双方で増加するのに対し、*ntcA* の変異株ではその誘導が大幅に減少していた。さらにゲルシフトアッセイにより、NtcA が *rre37* 上流のプロモーター領域に結合することや、その結合が 2-オキシグルタル酸の濃度依存的に強まることが明らかとなった。これらの結果より、窒素欠乏下での *rre37* の発現は NtcA によって直接正に制御されていることが示された。

### 第三章 Rre37 の制御標的遺伝子群の同定

Rre37 は OmpR 型のレスポンスレギュレーターであり、DNA に結合して遺伝子の転写を制御する転写因子であることが予想された。そこで、その制御下にある遺伝子群についてマイクロアレイを用いて網羅的に探索した。初めに通常条件下でマイクロアレイ解析を行ったところ、野生株と *rre37* 変異株における遺伝子発現プロファイルに変化が見られなかったため、Rre37 は窒素が充足した条件では、遺伝子発現調節にほとんど寄与していないことが示唆された。一方、窒素飢餓条件で野生株と *rre37* 変異株における遺伝子発現量の変化を比較したところ、発現量が 2 分の 1 以下に減少していた遺伝子には、呼吸鎖電子伝達系でシトクロム c オキシダーゼのサブユニットをコードする *ctaCI* (slr1136)、*ctaDI* (slr1137)、*ctaEI* (slr1138) や、解糖系酵素である *gapI* (slr0084; グリセルアルデヒド-3 リン酸デヒドロゲナーゼ)、*pfkA* (slr1196; ホスホフルクトキナーゼ)、グリコーゲン異化酵素の *glgX* (slr1857; グリコーゲンイソアミラーゼ)、*glgP* (slr1367; グリコーゲンホスホリラーゼ) が含まれていた。このことから、Rre37 は糖異化に関わる多くの酵素の発現を正に制御している可能性が示唆されたため、以後は特に糖異化

遺伝子群に着目して解析を進めた。

これまでに RNA ポリメラーゼのサブユニットであるシグマ因子 SigE も上記の遺伝子群の転写を正に制御することが明らかとなっているため (Osanai et al., 2006)、*sigE* と *rre37* の関係を調べるために *rre37* 変異株、*sigE* 変異株、*rre37/sigE* 二重変異株を使用して遺伝学的にこれらの関係を調べた。ノーザン解析により、それぞれの株における窒素欠乏条件下での糖異化遺伝子群の発現誘導を観察した結果、Rre37 と SigE はそれぞれ独立して糖異化遺伝子の発現を制御していることが示唆された。

#### 第四章 Rre37 依存性プロモーターの解析

窒素欠乏時に Rre37 によって転写量が制御される *gapI*、*pfkA*、*glgX*、*glgP* の発現制御機構をさらに詳しく解析するために、プライマー伸長法を用いて各遺伝子の転写開始点を解析した。その結果、それぞれの遺伝子に対して複数箇所の転写開始点が同定された。それを基にプロモーター配列の予測を行ったところ、構成的に発現しているプロモーターは、シグマ 70 型の -10、-35 配列を持つのに対し、窒素誘導性のプロモーターは -10 配列を有するが -35 配列が必ずしも存在しないという傾向が見られた。しかしこれまでのところ、Rre37 依存的に発現するプロモーター周辺に特定の保存配列は同定できていない。さらに、Rre37 依存的なプロモーターの中には SigE によっても発現制御を受けるものもあり、これら 2 つの因子が同一プロモーターを介して発現を制御している場合があることが明らかとなった。

#### 第五章 *rre37* 変異株の表現型

最後に、*Synechocystis* における Rre37 の役割をさらに明確にするため、*rre37* 変異株の表現型について解析を行った。まずグルコース存在下での光非依存的な増殖について調べた結果、*rre37* 変異株では増殖速度が顕著に低下していることを見いだした。暗所での生育には糖異化が必須であり、この表現型は Rre37 が糖異化遺伝子群の発現を正に制御していることを裏付けるものである。

次に、Rre37 は窒素欠乏により発現誘導を受けるため、*rre37* 変異株を用いて窒素に関連した表現型を探索した。まず、窒素欠乏条件下で野生株と *rre37* 変異株の生育を比較したところ、吸光度変化により測定した増殖曲線は双方の株の間で同じであった。しかし、*rre37* 変異株は窒素欠乏後のブリーチングが遅れる表現型が観察された。ブリーチングとは、窒素欠乏後 2 日ほどで細胞が緑から黄色に変化する現象であり、集光装置のフィコビリソームの分解とクロロフィルの減少によって引き起こされることが知られている。フィコビリソームの構成タンパク質

フィコシアニンとクロロフィルの細胞当たりの含量を計測したところ、クロロフィル量の減少に関しては野生株と *rre37* 変異株の間で違いが見られなかったが、*rre37* 変異株では野生株に比べてフィコシアニンの分解速度が遅れることが明らかになった。ブリーチングは、集光装置のフィコピリソームを分解することで不足している窒素源を手に入れ、過剰な光エネルギーを避ける意義があると考えられている。第三章で同定した Rre37 の標的遺伝子群の中にはフィコピリソームの分解に関わる遺伝子が含まれていなかったことから、この表現型をもたらす直接の原因は不明であるが、Rre37 が窒素欠乏下で生存するための応答反応に関与することが生理学的に明らかになった。

## 総括

本研究では、様々な環境ストレスにおける光合成生物の応答の一側面として、モデル生物であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、窒素飢餓状況における糖異化経路の活性化のシグナル伝達について解析を行った。特に、窒素欠乏により発現が誘導されるレスポンスレギュレーター Rre37 が、NtcA の制御下で糖異化酵素の発現を正に制御している新規因子であることを明らかにし、すでに同定されている窒素-糖代謝を結ぶ因子である SigE とともに多面的に糖代謝経路を調節していることを示した。今後は、上記因子のさらなる機能解析を通じて、糖異化遺伝子群の発現制御機構のネットワークの詳細を明らかにしていくことが期待される。

細胞がどのように栄養ストレスを感知し、応答しているのかを理解することは、生物の基本機構を理解するという基礎学問の観点だけでなく、将来的にストレス耐性を付与して生産性を上げるという応用面でも重要である。光合成能を持つシアノバクテリアの代謝機構は高等植物とも類似しており、代謝酵素にも保存されているものが見られる。そのため、シアノバクテリアで得られた細胞、分子レベルの知見は高等植物に応用する上でも、大いに貢献するものと考えられる。

## 参考文献

- Osanai, T., Imamura, S., Asayama, M., Shirai, M., Suzuki, I., Murata N. and Tanaka, K. (2006) *DNA Res.* **13**: 185-195.
- Su, Z., Olman, V., Mao, F. and Xu, Y. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**: 5156-5171.
- Osanai, T., Azuma, M. and Tanaka, K. (2007) *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 508-514.