

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 東 美由紀

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、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、中でも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。本論文では、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ている。

第一章の序論においては、シアノバクテリアにおける窒素制御系の背景や転写制御系の概略が述べられるとともに、本研究の目的が解説されている。*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。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既に明らかになっていた。本研究は、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 が糖異化酵素遺伝子の発現誘導に関与することを見だし、この新規因子の機能の解明と、糖異化酵素遺伝子の発現調節ネットワークの詳細を明らかにしたものである。

本研究以前のバイオインフォマティクスを用いた解析により、レスポンスレギュレーターをコードする *rre37* 遺伝子の発現が NtcA 制御下にあることが予測されていた。そこで第二章では、*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* 部分変異株における *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* の破壊株ではその誘導が大幅に減少することを見いだした。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を明らかにし、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を示した。

第三章では、マイクロアレイを用いて Rre37 の制御標的遺伝子の探索を行い、Rre37 が糖異化に関わる多くの酵素の発現を正に制御していることを示している。本研究以前に、RNA ポリメラーゼのシグマ因子 SigE も糖異化酵素遺伝子の転写を正に制御することが明らかとなっていた。そこで、*sigE* と *rre37* の関係を調べるために *rre37* 変異株、*sigE* 変異株、*rre37/sigE* 二重変異株を構築し、窒素欠乏下での糖異化酵素遺伝子の発現を観察している。その結果、Rre37 と SigE が、それぞれ別の経路で糖異化酵素遺伝子の発現を制御していることを示唆している。

第四章では、窒素欠乏時に Rre37 によって転写量が調節される糖異化酵素遺伝子の発現制御機構を調べる目的で、プライマー伸長法を用いて各遺伝子の転写開始点を決定している。同定された転写開始点を基に、各遺伝子のプロモーター配列の予測を行ったが、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を見つけることはできなかった。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を明らかにしている。

第五章では *Synechocystis* における Rre37 の役割を明確にするため、*rre37* 変異株の表現型について解析を行っている。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、*rre37* 変異株では増殖速度が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 が糖異化酵素遺伝子の発現を正に制御しているためであると考えることができる。さらに、Rre37 は窒素欠乏により発現誘導を受けることから、*rre37* 変異株を用いて窒素に関連した表現型の探索を行った。その結果、*rre37* 変異株では細胞が緑から黄色に変化するブリーチングが遅れることを見いだしている。この表現型をもたらす直接の原因を明らかにすることはできていないが、Rre37 が窒素欠乏下における応答反応に関与することが示された。

以上、光合成生物にとって重要な糖代謝、特に糖異化経路について、本論文はシアノバクテリアを材料としてその制御機構を解析したものである。本研究の内容は、その全体像の理解に向けて学術的、応用的に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。