

## 論文の要約

報告番号	甲 第 1007 号	氏名	鬼沢 あゆみ
学位論文題目	シアノバクテリアにおける脂肪酸代謝制御にかかわる 転写因子の機能解析		
<p>脂肪酸は全ての生物において、生体膜の不可欠な成分であると同時に、エネルギー源としても利用される。近年、大腸菌をはじめとする複数の従属栄養細菌において、脂肪酸代謝経路を構成する一連の酵素をコードする遺伝子群が、特定の転写因子による統一的な転写制御を受けていること、その制御に働く転写因子と制御メカニズムは種によって多様であることが明らかになってきた。本論文は、光独立栄養生物であるシアノバクテリアにおいて、脂肪酸生合成関連遺伝子をコードする <i>fab</i> 遺伝子群の転写制御に関わる転写因子を初めて同定し、その機能解析を行った結果をまとめたものである。</p> <p>第1章では、シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803において、<i>fab</i> 遺伝子群上流域に結合する因子を単離同定したことを記述している。DNAアフィニティークロマトグラフィーの手法を用いて、<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803の可溶性画分から<i>fabI</i>および<i>a cpP-fabF</i>上流域に結合する因子を精製したところ、両領域に結合するタンパク質として、約 27 kDaのLexA (Sll1626) が同定された。LexA 組換えタンパク質を大腸菌内で大量発現精製し、DNAゲルシフトアッセイを行うと、<i>fabD</i>、<i>fabG</i>、<i>acpP-fabF</i>、<i>fabH</i>、<i>fabI</i>、<i>fabZ</i>の<i>fab</i>遺伝子群のみならず、アセチルCoAカルボキシラーゼをコードする<i>accC</i>、<i>accD</i>、アシルACP合成酵素をコードする<i>aas</i>遺伝子の上流域にもLexAタンパク質の結合が検出されたことから、<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803においては、LexAが脂肪酸代謝関連遺伝子の統一的な転写制御に関与することが強く示唆された。</p> <p>第2章では、<i>lexA</i> 遺伝子破壊株を作製し、その表現型解析および網羅的遺伝子発現解析を行った結果を記述している。細胞内に存在する複数コピーのゲノムの全てで<i>lexA</i> 遺伝子が破壊された完全破壊株は得られなかったものの、LexAタンパク質の発現量は検出限界以下であったため、この株 (<math>\Delta</math><i>lexA</i>株) を用いてその後の解析を行った。通常培養条件下で、<math>\Delta</math><i>lexA</i>株は生育遅延、不均一な細胞サイズ、光合成色素含量の低下等の特徴的な表現型を示した。RNA-seq解析を行ったところ、繊毛運動、適合溶質であるグルコシルグリセロールの蓄積、双方向性ヒドロゲナーゼ、光化学系 I とフィコビリソーム複合体に関与する遺伝子の発現が、<i>lexA</i>破壊により大きな影響を受けていることが明らかになった。さらに、DNAゲルシフトアッセイを行うと、繊毛運動に関連する<i>pilA7</i>オペロンと<i>pilA9</i>オペロン、グルコシルグリセロール蓄積に関連する<i>ggpS</i>オペロンと<i>slr1670</i>オペロンの上流域にLexAタンパク質が結合したことから、これらがLexAの標的遺伝子であること、光化学系 I サブユニット遺伝子群の上流域には結合しなかったことから、光合成関連遺伝子の発現レベルへの<i>lexA</i>遺伝子破壊の影響は間接的なものであることが示唆された。</p> <p>RNA-seq解析の結果、<i>fab</i> 遺伝子群に関しては、野生株と<math>\Delta</math><i>lexA</i>株間に有意な発現量の差異が検出されたものの、その差はわずかであった。その結果を受け、第3章では、<i>fab</i> 遺伝子群に焦点を絞り、異なる栄養条件下でリアルタイムPCRによる個別発現解析を行った結果を記述している。通常培養条件下での<math>\Delta</math><i>lexA</i>株において、<i>fabD</i>と<i>fabH</i>は有意な発現増加、<i>fabF</i>と<i>fabG</i>は増加傾向、<i>fabZ</i>は発現減少傾向を示し、その傾向はRNA-seqとリアルタイムPCRの両解析において同様であった。次に、細胞内の脂質組成に影響を与えることが広く知られている窒素欠乏条件とリン欠乏条件に着目して解析を行った。野生株の<i>fab</i> 遺伝子転写産物量は、窒素欠乏条件では通常培養条件に比べて減少するが、リン欠乏条件では、通常培養条件に比べて増加傾向を示した。<math>\Delta</math><i>lexA</i>株では、異なる栄養条件下での<i>fab</i> 遺伝子転写産物量の変動幅は野生株に比べて小さかった。以上の個別発現解析結果から、LexAは通常培養条件で脂肪酸伸長反応の初期段階にかかわる<i>fabD</i>、<i>fabH</i>、<i>fabF</i>、<i>fabG</i>に対してリプレッサーとして働くが、脂肪酸の鎖伸長回路の後半の反応過程にかかわる<i>fabI</i>、<i>fabZ</i>への影響は弱いと考えられた。ま</p>			

た、そのリプレッサーとしての効果は窒素欠乏条件下で強まり、リン欠乏条件下で弱まる可能性が示唆された。*lexA*遺伝子破壊が細胞内の総脂肪酸量に及ぼす影響を知るため、通常培養条件で脂質解析を行ったが、野生株と破壊株の間に有意な差は観察されなかった。それに対して、遊離脂肪酸がリサイクリングされず培地に放出される *aaS* 遺伝子破壊株において *lexA* を破壊した場合には、脂肪酸量の増加が観察された。