

氏名	石川 優真
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第 1151 号
学位授与年月日	令和元年 9 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp.PCC 6803 が有する NAD キナーゼの生理機能
論文審査委員	委員長 教授 川合 真紀 委員 教授 日原由香子 委員 教授 金子 康子 委員 准教授 山口 雅利

論文の内容の要旨

酸素発生型光合成細菌であるシアノバクテリアは油脂、水素、バイオプラスチックといった有用物質生産の為に多くの応用・基礎研究が展開されている。細胞内の代謝を包括的に制御するため、細胞内に還元力 (NADH, NADPH) を蓄積させ、物質合成を向上させる取り組みが数多く行われている。しかしながら、還元力として着目されている NAD (P) H 自体の生理機能や調節機構といった NAD (P) (H) を量的に改変するために基盤となる知識は意外にも乏しく、その理解はより効率的な代謝改変に向けて必須である。本研究では、シアノバクテリアがどのように NAD (P) (H) 量を調節し、その調節にどのような意義があるのかを理解するため、NAD (H) のリン酸化がシアノバクテリアでどのような生理応答に影響を与えているのか明らかにすることを課題とした。NAD (H) のリン酸化を担う酵素は NAD キナーゼ (NADK) である。ゲノム配列が完全に明らかになっているシアノバクテリアの多くは二つの NAD キナーゼ (NADK) を有しており、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 も *sll1415* と *slr0400* の二つの NADK を有する。そこで、本研究では、シアノバクテリアが培養環境依存的に二つの NADK を使い分けることで、一次代謝を調節し、様々な環境ストレスに順応していると予測し、二つの NADK の機能の違いを明らかにすることを目的として研究を行った。

研究の結果、それぞれの NADK 破壊株の表現型解析から、*sll1415* は従属栄養条件で必須であることが分かった。一方で、*slr0400* は逆に従属栄養条件におけるシアノバクテリアの増殖を抑制していることがわかり、従属栄養条件でそれぞれの NADK は増殖速度を正又は負に調節するための異なる機能的な役割を有していることを示した。さらに、従属栄養条件では *sll1415* の遺伝子発現は上昇する一方で、*slr0400* は減少することを見出し、それぞれの NADK は遺伝子発現レベルで異なる機構により調節されていることが示唆された。加えて、NADK の機能を上流で調節する候補因子について、NAD (P) (H) 量の明暗周期での変動結果を基に時計遺伝子 *Kai* との関連性を考察した。さらに、*sll1415* 破壊株では NADP (H) が従属栄養条件で減少し、糖代謝として酸化的ペントースリン酸経路が滞り、培地中のグルコースが消費できない状態となっていた。一方で *slr0400* 破壊株では NAD⁺ が蓄積し、従属栄養条件では野生株よりも増殖が早くなり、強光条件下では光化学系 II にストレスがかかり、強光を数日間当て続けると黄化してしまうことが分かった。

これらの結果、それぞれの NADK を調節する上流因子が NAD^+ と NADP^+ 量をモニターすることでそれぞれの NADK を使い分け、細胞内の従属栄養性に合わせて代謝を調節し、適切な光合成と呼吸のバランス制御を可能にしていると考察した。さらに、ゲノムが明らかになっているシアノバクテリアのデータベース解析から、それらが *sll1415* と *slr0400* のいずれのクレードの分子種を持っているのかに着目して系統解析を行った結果、多くの種は 2 種類の NADK を有していたが、例外的に、*sll1415* のクレードに属する NADK は有するが、*slr0400* のクレードに属する NADK は有していないシアノバクテリアとして *Atelocyanobacterium thalassa* が見出された。*Atelocyanobacterium thalassa* はルビスコや光化学系 II が遺伝子レベルで喪失し、光合成をしない代わりに、他の酸素発生型光合成シアノバクテリアに付着して炭素源を略奪することが報告されている。そこで、*slr0400* 破壊株を、培地にグルコースを添加し完全暗所条件で培養すると、WT は全く増えないが、*slr0400* 破壊株は増殖することが分かった。このことから、*slr0400* は藻類の進化の過程で光合成能力の有無と関連している可能性が考えられ、光合成シアノバクテリアの光合成能の獲得、もしくは非光合成シアノバクテリアの完全従属栄養性の獲得というイベントの中で重要な因子であると考えられた。

本研究により、細胞区画が基本的には単一であり、多くの代謝系が混在して存在するシアノバクテリアでは、環境に依存する代謝系の使い分けに応じて NAD(P) の量的調節を行い、培養条件ごとの NAD^+ もしくは NADP^+ の必要量に応じてそれぞれの NADK を駆動させることが示された。このように二つの NADK による NAD(P) の量的調節は培養環境への適応を通じた、増殖速度の維持に貢献していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、令和元年7月30日に論文発表会を開催し、論文内容の発表に続いて質疑と論文内容の審査を行なった。以下に審査結果を要約する。

植物やシアノバクテリア（藍藻）など酸素発生源型光合成を営む生物は、大気中の二酸化炭素を有機物に固定する能力を有することから、その光合成能力の改変によるバイオマスの増大や、有用物質生産性の向上を目指した代謝工学的研究が盛んに行われている。*Synechocystis sp.* PCC 6803 は、単細胞性の原核生物であり、光合成研究のモデル生物である。相同組換えによる遺伝子破壊や遺伝子導入が容易であることから、有用物質生産生物としての応用研究も盛んに行われている。生物の物質生産性に大きく寄与するのがNAD(P)(H)（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（リン酸））である。NAD(P)(H)は、生体内酸化還元反応を司る電子伝達物質であり、酸化型の NAD^+ と NADP^+ 、還元型の NADH と NADPH が存在する。このうち、 NAD^+ と NADH は呼吸などの異化代謝に使用され、 NADP^+ と NADPH は脂質合成、光合成などの同化代謝に使用される。すなわち、細胞内でNAD(P)(H)の量やバランスが変わることは、その細胞の代謝の方向性に大きな影響を及ぼすこととなる。本研究では、代謝工学による物質生産のプラットフォームとして注目される*Synechocystis sp.* PCC 6803において、細胞増殖・物質生産制御をNAD(P)(H)のバランス改変により実現するための基盤研究をおこなった。そのため、 NAD^+ と NADH をリン酸化し、同化代謝に使用される補酵素量を増加させる機能があると考えられるNADキナーゼ（NADK）に注目し、その生理機能と代謝制御における役割を明らかにすることを目的として研究が行われた。本学位論文では、その成果が、7章にまとめられている。

第1章では、「序章」として、NAD(P)(H)の生合成経路について過去の知見をまとめ、本研究で取り組むべき課題の位置づけを述べている。リン酸化型の NADP^+ 、 NADPH と、非リン酸化型の NAD^+ 、 NADH が異なる代謝系で使い分けられる理由や、これらのバランスが厳密に制御されるメカニズムを解き明かすことを課題として、そのリン酸化を担う酵素であるNADキナーゼ（NADK）に着目した。単細胞性の原核生物であるシアノバクテリア*Synechocystis sp.* PCC 6803は2種類のNADK（*sll1415*、*slr0400*）を有する。それぞれのNADKがどのような特徴を有するのか、アミノ酸配列の類似性、遺伝子破壊株の作成とその生育特性について先行研究の知見を元に議論を進めた。*Synechocystis*の2つのNADKを両方破壊した株は致死となり作成できないこと、1種類のNADKを破壊した株は、光合成により生育する独立栄養条件下では生育に差がないが、1次代謝物のメタボローム解析の結果、基本代謝系には異なる影響が現れており、2つのNADKが異なる生理機能を有していることが示された。

第2章では、*Synechocystis sp.* PCC 6803の2つのNADKのうち、*sll1415*の機能に関する研究成果を示した。*sll1415*破壊株が光従属栄養条件（培地にグルコースと光合成阻害剤を加え、光照射下で培養）で増殖阻害を示す現象を見出した。代謝物定量実験の結果、*sll1415*破壊株では、酸化的ペントースリン酸経路の代謝物が特異的に蓄積していた。また、グリコーゲンの蓄積が見られたことから、グリコーゲン合成と分解に関与する遺伝子の発現と酵素活性を調べた結果、*sll1415*破壊株では、ペントースリン酸経路への NADP^+ 供給が不足した結果、正常な糖代謝が阻害され、グリコーゲンが蓄積したと考えられた。さらに、NAD(P)(H)量が明暗周期で変動することを見出し、さらにこれが時計遺伝子*Kai*の変異体では見られなくなることから、NAD(P)(H)量の制御における時計遺伝子の役割を考察した。

第3章では、*slr0400*の生理機能に関する研究成果をまとめた。*slr0400*欠損株は、強光条件下で黄化することを見出した。また、クロロフィル蛍光測定実験により、*slr0400*の遺伝子破壊株は、光化学系IIが直接影響

を受けていることを示した。さらに、*slr0400* 破壊株は Light-activated heterotrophic condition (培地にグルコースを添加し、暗黒条件で培養。1日に15分だけ光を照射) や、明暗条件で培地にグルコースを添加した培養条件で野生株 (WT) よりも増殖が早くなることを見出した。また、*slr0400* 破壊株では NAD^+ が WT に比べて蓄積しており、ROS 発生量の増加、暗呼吸活性の増加が示され、これらが強光条件での黄化の一因であると考えられた。

第4章では、*Synechocystis sp.* PCC 6803 の2つの NADK の高発現株の解析結果を示した。*slr0400* と *sll1415* をそれぞれ *psbA2* プロモーターで高発現させた株は同様に増殖したが、代謝解析の結果、それぞれ異なる NAD (P) (H) 量、1次代謝物パターンを示した。しかし、強光条件下では、*sll1415* 高発現株は早く黄色化すること、メチルピオロゲン感受性になっていることが示された。また、培地にグルコースと NaNO_3 を添加した高栄養培地では *sll1415* 高発現株は細胞が肥大し、細胞同士が接着するなどの形態変化が観察され、糖異化の亢進を伴う劇的な代謝変化が起きていると考えられた。

第5章では、シロイヌナズナ *nadk2* 変異体を用いたシアノバクテリア NADK の機能証明を行った。シロイヌナズナの葉緑体局在性の NADK2 を欠損した *nadk2* 変異体は黄緑色の葉色を示し、恒光条件下で生育が遅延する。*slr0400* はこれまで、シアノバクテリアで高発現させても NADK 活性の上昇を検出することができず、NADK としての機能を有しているか疑問が持たれていた。しかしながら、本章で、シアノバクテリアの2つの NADK に葉緑体移行シグナルを付加して *nadk2* 変異体に高発現させた結果、両者で *nadk2* の葉の色の表現型が緑色に回復することがわかった。これにより、*slr0400* も NADK としての能力を有していることが示された。

第6章では、遺伝子配列データベース解析により、シアノバクテリア類における NADK 分子種の分布と機能分化について考察を行った。公開されている72種類のシアノバクテリア類のゲノム情報に対して、*sll1415* と *slr0400* に相同性を持つ分子種の探索を行った結果、多くの種は2種類の NADK を有していることがわかった。一方で、*sll1415* のクレードに属する NADK は有するが、*slr0400* のクレードに属する NADK は有していないシアノバクテリアとして *Atelocyanobacterium thalassa* が見出された。この種は、ルビスコや光化学系 II を構成するタンパク質が遺伝子レベルで喪失して光合成能力を失っており、その為に他の酸素発生型光合成シアノバクテリアに付着して炭素源を得ることが報告されている。*Synechocystis sp.* PCC 6803 は、完全暗黒条件 (培地にグルコースを添加) では増殖できないが、*slr0400* を破壊した株はこの生育条件での増殖能を獲得していた。すなわち、野生株では、*slr0400* は暗黒下でグルコースを利用した増殖を阻害する機能を持ち、シアノバクテリアの独立栄養増殖性の維持や、光合成能力を失い共生性を獲得する際の代謝変化に関わっている可能性が示された。

第7章は、各章で得られた結果を総括する形で要約されており、*Synechocystis sp.* PCC 6803 の2つの NADK の機能について、今後の応用展開への構想を含めて展望が簡潔にまとめられている。

以上のように、本学位論文では、*Synechocystis sp.* PCC 6803 の NADK の機能について、遺伝子破壊株、高発現株を用いることにより、それらが細胞の増殖性やストレス耐性、物質生産性に及ぼす影響を含めて解明することに成功している。また、ゲノムデータベースを用いた解析より、これらの遺伝子の普遍的な重要性を示し、かつ従属栄養性と独立栄養性の切り替えへの関与という非常に新規性の高い発見も成し遂げている。第2章、および第6章の成果の一部は、査読付き国際学術雑誌3編に公表されている。そのほかの成果についても、現在、投稿論文として準備中である。審査委員会では、これらを総合的に判断し、博士 (工学) の学位論文として価値のあるものと認め、合格と判定した。