

氏名	藤田 清仁
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 679 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 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	原始紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> における <i>rbcL-rbcS-cbbX</i> オペロンの解析
論文審査委員	委員長 教授 定家 義人 委員 教授 大森 正之 委員 准教授 朝井 計 委員 教授 松本 幸次

論文の内容の要旨

光合成において二酸化炭素の固定は酵素リブローズ 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) によって行われており、構成タンパク質は遺伝子 *rbcL*, *rbcS* にコードされている。植物が持つ RuBisCO は進化の過程で大きく二つに分岐したことが報告されている (Delwiche et al. 1995)。一つは細胞内共生したシアノバクテリア由来の RuBisCO を持つタイプ (cyanobacterial type) であり、緑藻・緑色植物がこれにあたる。もう一つは細胞内共生後、シアノバクテリアの *rbcL*, *rbcS* が遺伝子水平移動により β -プロテオバクテリアの *rbcL*, *rbcS*, *cfxQ* に置き換わったもの (proteobacterial type) で、紅藻・褐藻がこれにあたる。

遺伝子水平移動により獲得された *cfxQ* は、色素体ゲノム上で *rbcL-rbcS* の下流に存在しており、またプロテオバクテリアの研究では光合成独立生育に必須であることが示されている (Gibson et al. 1997)。このことから RuBisCO との関連性が推測されていたが詳しい機能解析はされていなかった。

Cyanidioschyzon merolae (シゾン) は紅藻に属し、2003 年に色素体ゲノムが決定され *rbcL-rbcS* の下流に *cfxQ* の存在が報告されていた (Ohta et al. 2003)。2004 年に紅藻類では初めて決定された核ゲノム配列から核にも単独で *cfxQ* が存在していることが報告された (Matsuzaki et al. 2004)。本研究ではシゾンの核、色素体ゲノムに存在している *cfxQ* の機能と関連性を明らかにすることを目的として始まった。

核と色素体ゲノムに存在する *cfxQ* について細胞外の環境に対する転写応答を調べた結果、光条件に対しては両 *cfxQ* 共に明期で転写の増加、暗期で減少することが分かった。また二酸化炭素濃度の変化に対しては核の *cfxQ* のみが顕著な転写量の正の相関を示し、二酸化炭素変化における転写応答が異なっていることを示した。

CfxQ タンパク質と *rbcL-rbcS-cfxQ* オペロン転写との関係を調べるために、大腸菌を用いて CfxQ タンパク質の精製をおこない、ゲルシフト解析を行った結果、核、色素体の CfxQ 共に *rbcL* プロモーター領域に結合活性を示し、特に色素体の CfxQ については強い結合活性を持つことが示された。また *rbcL* の転写開始点を決定し、他の光合成生物と比較し転写開始点と翻訳開始点の距離が非常に短いことを明らかにした。シゾンではまだ遺伝学的手法が確立していない中で、実際に CfxQ がプロモーター DNA に結合することで *rbcL* プロモーターからの転写に対しどのような影響を与えるのかの知見を得るため、大腸菌内で実験系の

構築を試みた。プラスミド上で *rbcL* プロモーターを持つ *lacZ* の発現量を、やはりプラスミド上で IPTG 制御下にあるプロモーターを持つ *cfxQ* の発現量で制御する試みである。色素体の CfxQ に関してはタンパク質誘導を行うと、発現量が非常に少ない条件であっても *rbcL* プロモーター活性に負の影響を与え、また核の CfxQ も共発現させるとその影響が軽減されたことから色素体の CfxQ は *rbcL* プロモーター活性に対しネガティブに作用し、核の CfxQ に関しては色素体の CfxQ に対し負の制御機能を示すのではないかという知見が得られた。

論文の審査結果の要旨

本学位論文は *Cyanidioschyzon merolae* (*C. merolae*) の核と色素体のゲノムにコードされている 2 つの CbbX の、色素体ゲノムの RuBisCO オペロン転写発現における負の転写制御因子とそのレギュレーターの可能性を示唆したもので、殆ど解析例のない CbbX の役割を報告したものである。

まず序論で RuBisCO の進化と制御因子、殊に CbbX についての背景説明を記した。

光合成における二酸化炭素の固定はリブローズ 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) によって行われており、この酵素を構成するサブユニットタンパク質 RbcL, RbcS は遺伝子 *rbcL*, *rbcS* にコードされている。植物が持つ RuBisCO は進化の過程で大きく二つに分岐したと考えられている。一つは細胞内共生したシアノバクテリア由来の RuBisCO を持つタイプ (cyanobacterial type) であり、緑藻・緑色植物がこれにあたる。もう一つは細胞内共生後、シアノバクテリアの *rbcL*, *rbcS* 遺伝子が水平移動によりもたらされた β -プロテオバクテリアの *rbcL*, *rbcS* に置き換わった RuBisCO を保存するもの (proteobacterial type) で、紅藻・褐藻がこれにあたる。色素体ゲノム上で *rbcL-rbcS* の下流に存在する *cbbX* は *rbcL*, *rbcS* 遺伝子水平移動に伴う cyanobacterial type から proteobacterial type への変換時に獲得されたと考えられており、プロテオバクテリアの研究では光合成独立生育に必須であることが示されている。このことから CbbX タンパク質は RuBisCO 機能との関連性が推測されていたが詳しい機能解析はされていなかった。*Cyanidioschyzon merolae* (*C. merolae*) は核とミトコンドリアと色素体を 1 つずつ持つ極めて原始的な様相を持つ紅藻で、2003 年に色素体ゲノムの塩基配列が決定され proteobacterial type の *rbcL-rbcS* の下流に *cbbX* の存在が報告され、翌年に決定された核ゲノム配列から核にも単独で *cbbX* が存在していることが分かった。

次に本博士論文の研究は *C. merolae* の核、色素体ゲノムに存在している二つの CbbX の機能と関連性を明らかにすることを目的として行われたことを記した。

まず核と色素体ゲノムに存在する *cbbX* (*pt*), *cbbX* (*nuc*) について細胞外の環境に対する転写応答を調べた結果、光条件に対しては両 *cbbX* 共に明期で転写の増加、暗期で減少することが分かった。また二酸化炭素濃度の変化に対しては *cbbX* (*nuc*) のみが顕著な転写量の正の相関を示し、二酸化炭素変化における転写応答が異なっていることを記した。

次に CbbX タンパク質と *rbcL-rbcS-cbbX* (*pt*) オペロン転写との関係を調べるために、大腸菌を用いて CbbX タンパク質の精製をおこない、ゲルシフト解析を行った結果、CbbX (*pt*), CbbX (*nuc*) 共に *rbcL* プロモーター領域に結合活性を示したが、特に CbbX (*pt*) については強い結合活性を持つことが示された。また *rbcL* の転写開始点を決定し、他の光合成生物のものと比較して転写開始点と翻訳開始点の距離が非常に短いことを明らかにしたことを記した。

さらに *C. merolae* ではまだ遺伝学的手法が確立していない中で、実際に CbbX がプロモーター DNA に結合し *rbcL* プロモーターからの転写に対しどのような影響を与えるのかの知見を得るため、大腸菌内で実験系の構築を試みた。プラスミド上で *rbcL* プロモーターを持つ *lacZ* の発現量を、やはりプラスミド上で IPTG 制御下にあるプロモーターを持つ *cbbX* の発現量で制御する試みである。CbbX (*pt*) に関してはタンパク質誘導を行うと、発現量が非常に少ない条件であっても *rbcL* プロモーター活性に負の影響を与えた。一方 CbbX (*nuc*) は過剰発現時のみに *rbcL* プロモーターの転写活性に対し負の影響を与えたが、ゲルシフト解析の結果から未知の大腸菌因子により DNA 結合活性が上昇する現象が見られたため、CbbX (*nuc*) について結合活性はほとんど保持していないと考察したことを記した。

また RuBisCO を構成している RbcL, RbcS と CbbX (*pt*), CbbX (*nuc*) についてタンパク質の相互作用

を yeast two hybrid 法によって調べ、CbbX (nuc) と CbbX (pt) 間でのみタンパク質相互作用を観察した。また Native PAGE を行い、質量比 1:1 でヘテロ複合体を形成するという知見を得た。以上の知見により、*C. merolae* 色素体 RuBisCO オペロン (*rbcL-rbcS-cbbX*) 転写に対する CbbX (pt) の負の発現調節と、これに対するタンパク質相互作用による CbbX (nuc) の関与の可能性を考察したことを記した。

これらの実験結果を総合的に評価して、*C. merolae* 色素体ゲノムに存在する CbbX を介した *rbcL-rbcS-cbbX* オペロンの負の転写制御機構と、シグナル配列によって色素体に輸送されるであろう核の CbbX (nuc) による更なる制御についての考察を行っている。

今回の研究は、*C. merolae* の核と色素体ゲノムに存在する *cbbX* を介した *rbcL-rbcS-cbbX* オペロンの発現制御機構を部分的にはあるが明らかにした。CbbX の RuBisCO 発現における転写制御因子としての役割を解析した例はない。これによって *rbcL-rbcS-cbbX* 遺伝子水平移動が起こった後に紅藻類が独自に獲得した CbbX を介した核と色素体間のクロストーク機構を解明する手掛かりの一つになると期待されると結んだ。

本論文には研究の対象となった RuBisCO と *C. merolae* の背景と研究の意義の説明、実験手法の詳述、適切な考察を伴った実験結果の説明、最後に紅藻類が独自に獲得した CbbX を介した核と色素体間のクロストーク機構の考察などが万遍なく記述されており、博士（理学）の論文として適切と判断した。よって学位論文の審査は「合格」である。