

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 PAN Lulu

論文題目

Regulatory mechanism of the CO₂ concentrating mechanism (CCM)-related genes in *Synechococcus elongatus* strain PCC7942

(*Synechococcus elongatus* strain PCC7942 における CO₂ 濃縮機構関連遺伝子群の制御機構)

論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小俣達男
委員	名古屋大学教授	小林哲夫
委員	名古屋大学教授	藤田祐一
委員	名古屋大学准教授	前田真一

ラン藻（シアノバクテリア）は、酸素発生型の光合成を行う原核生物であるが、CO₂を細胞内に HCO₃⁻の形で濃縮し、CO₂固定酵素である Rubisco 周辺で局所的に CO₂に変換することにより、きわめて効率的な光合成を行うことが知られている。このようなラン藻の「CO₂濃縮機構（CCM）」の構成成分の多くは、転写レベルで発現制御されており、CO₂欠乏条件下で転写レベルが大きく上昇する。近年、LTR型転写因子のうち、CbbRサブファミリーに属する転写因子が、CCM関連遺伝子の制御に関与することがわかってきたが、制御機構の全体像は未解明である。本学位論文は単細胞性のラン藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料として、CCMの制御に関わる CbbRホモログである CcmRの作用機構について、プロモーター近傍の作用部位、および CcmRの発現を制御する転写因子と制御シグナルを解析したものであり、以下の3つの内容から構成されている。

1. CO₂に応答する最小プロモーターにおける CcmRの役割の解析

S. elongatus PCC7942は CbbRホモログとして CcmRのみをもつが、2つの CbbRホモログをもつ *Synechocystis* sp. PCC6803では、それらのうちの1つ（CmpR）が低CO₂条件下で転写活性化因子として作用するのに対し、他方（CcmR）は高CO₂条件下で自身の遺伝子（*ccmR*）を含め複数の遺伝子を抑制している。*S. elongatus* PCC7942では CcmRが転写活性化因子としても抑制因子としても作用することが示されていたが、自身の遺伝子に対する制御は不明であった。そこで、*ccmR*遺伝子のプロモーターをレポーター遺伝子 *luxAB*に連結した融合遺伝子を、野生株と *ccmR*欠損株とに導入して発現レベルを比較することにより、1) *ccmR*プロモーターが低CO₂条件で活性化されること、2) CcmRが *ccmR*を抑制していること、および3) 低CO₂条件下で *ccmR*を活性化する未知因子（X）が存在することを明らかにした。*ccmR*のCO₂応答に必要なシス因子は、開始コドン上流側115 bp以内にあり、CO₂応答性遺伝子群の中でもっとも短い制御領域をもつ。この領域内には CcmRの結合配列と推定される不完全なパルンドローム配列が2組存在している。この特徴的な配列は *S. elongatus* PCC7942において、もっとも顕著に低CO₂条件で誘導される3つの転写単位のうちの2つ、すなわち *sbtA*遺伝子と *ndhF3*オペロンの上流にも保存されているが、奇妙なことに CcmRは *ndhF3*オペロンを抑制的に制御するのに対して *sbtA*遺伝子に対しては活性化因子として作用しており、上述の特徴的な配列と活性化/抑制の関係が判然としない。そこで、*sbtA*遺伝子上流部の762 bpの範囲を上流側から順次削り込んだDNA断片を *luxAB*に結合した融合遺伝子を作製し、野生株と *ccmR*欠損株とに導入して発現レベルを比較したところ、*sbtA*の開始コドンから上流側541 bpのDNA断片はCO₂制限によって CcmR依存的な転写活性化を引き起こすが、360 bpにまで削り込むと CcmR欠損株の方が CcmR保有株より高いプロモ

ーター活性を示すようになった。360 bp の範囲には上述の 2 組の推定 CcmR 結合配列が含まれており、この配列を含む *ndh3* オペロンの開始コドン上流 120 bp の DNA 断片も、やはり CcmR の欠損によって、より強い低 CO₂ に応答した転写活性化を示すようになった。以上の結果より、*ccmR*、*sbtA*、*ndhF3* オペロンの上流域に共通に存在する 2 組の推定 CcmR 結合配列を含む約 115 bp の領域が、「CcmR による抑制的な制御を受ける低 CO₂ 誘導性の最小プロモーターである」と結論した。以上の結果からまた、1) *sbtA* の開始コドン上流 360 bp から 541 bp の領域は CcmR が CO₂ 制限条件下で転写を正に制御する配列を含むこと、2) *sbtA*、*ndhF3* オペロンの場合にも、*ccmR* の場合と同様に最小プロモーター部分に作用して CcmR 非依存的に転写を活性化する CO₂ 応答性の未知因子が存在すること、の 2 点が明らかになった。引き続き *ccmR* の最小プロモーター上の 2 つの推定 CcmR 結合配列のそれぞれに変異を導入した実験により、上流側の CcmR 結合配列が未知因子による活性化に必要であることを明らかにした。

2. *ccmR* の発現制御における RbcR の機能の解析

上記 1. で明らかにした CO₂ 応答性の最小プロモーターに作用する未知の活性化因子 X が CcmR と結合配列を共有することが推定されたため、その候補として CcmR と近縁の RbcR に注目してその機能解析を行った。RbcR はラン藻の代表的 LTR で全ラン藻に保存されているため、Rubisco 遺伝子との関連が予測されていたが、遺伝子破壊ができず、逆遺伝学的解析が困難な上、生化学な取り扱いも困難で十分な機能解析が行われていなかった。本研究では、*ccmR* プロモーターと *luxAB* の融合遺伝子を保有する株に *rbcR* を含むプラスミドを導入した上で、クロモソーム上の *rbcR* を破壊し、IPTG によって *rbcR* の発現をコントロールする系を構築して低 CO₂ 条件への応答過程を解析し、RbcR が CO₂ 欠乏による *ccmR* の誘導に関与することを証明した。また、並行して *rbcR* ノックダウン株を用いた RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を実施し、RbcR が *ndhF3* オペロンと *sbtA* 遺伝子の活性化にも関与すること、Rubisco をコードする *rbcLS* と Rubisco を含むカルボキシゾームの形成に関わる *ccmKLMN* オペロンの活性化における必須因子であること、窒素同化系の遺伝子を CO₂ 条件下で負に制御することを明らかにした。

3. *ccmR* の発現制御に関わる未知因子の遺伝学的探索

上記 2. において、*ccmR* の発現への RbcR の関与が明らかにしたものの、LTR である RbcR がどのようなシグナルを感知して発現制御を行っているかは以前として不明であった。上記 1. において CcmR 欠損株背景で *PccmR::luxAB* 株がきわめて強い生物発光を示すことが明らかとなったので、この株を親株とし、UV-C 照射によって突然変異を誘発した細胞集団のコロニーの中から、生物発光のレベルに異常のある株をリアルタ

イム生物発光分析システムを用いて単離した。当初、発光レベルが低い変異株の単離を目指したが、親株よりもさらに高い発光レベルを示す株も数株得られた。これらの変異株のゲノム配列の再解析によって原因遺伝子の同定を試みたところ、ほとんどの株に数カ所以上の変異があつて原因遺伝子の特定に至らなかったが、親株より強い発光を示した2株（E3、E11）で *cpcE* 遺伝子の欠損が見つかった。*cpcE* は光捕集タンパク質フィコシアニンの発色団であるフィコシアノビリリンをタンパク質に結合させるリアーゼのサブユニットのひとつをコードしている。2株の変異株はフィコシアニンの含量が低く、きわめて生育速度が遅かったが、*cpcE* をプラスミドを用いて変異株に戻したところ、フィコビリリン含量は部分的にしか回復しなかったものの、生物発光の強度と *luxA* の発現レベルはいずれも親株レベルに低下し、増殖速度も回復した。以上の結果から、光エネルギーが不足して光合成生産が制限された条件下で生じる何らかの代謝的な変化が、RbcR あるいはさらに未知の因子を介して CCM の基本制御因子である CcmR の発現を抑制しているものと推定した。

以上のように、本学位論文は CcmR の作用する最小プロモーターとその CO₂ への応答機構を明らかにするとともに、RbcR が CcmR を介して CCM 制御に関与すること、光合成と低 CO₂ 応答の間に従来知られていなかった未知シグナルが介在することを明確にしたものであり、光合成の制御機構について重要な知見を与えるものである。よって、当審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認め、合格と判定した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	PAN Lulu
試験担当者	主査 小俣 達男、小林哲夫、藤田祐一、前田真一			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成 29 年 2 月 10 日学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				