

論文審査の結果の要旨

氏名： 角 悟

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：非光合成細菌が保有する光応答性転写調節蛋白質に関する研究

審査委員： （主査） 教授 上田 賢志 印

（副査） 教授 砂入 道夫 印

教授 青木 俊夫 印

学位申請者である上記の角 悟氏（生物資源科学研究科応用生命科学専攻博士後期課程3年生）は、昨年12月5日に実施された学位申請論文発表会において学位論文の概要を発表し、その結果、論文の詳しい審査を進めることが許可された。そこで、応用生命科学専攻に所属する上記の教授3名が主査および副査として審査にあたった。

本人の研究は、光合成を行わない一般のバクテリアに分布する光センサーに関するものであり、これまで知られてこなかったタイプの光受容タンパク質が普遍的に存在していることを見だし、その一つに焦点を当てた分子分類学、遺伝学ならびに生化学的検証を行っている。広範な領域にわたる研究手法を駆使して実施された精密な検討は数々の新しくかつ信頼度の高い成果を挙げることに結びついており、それによって新しい分子の機能と生物学的意義を明らかにしている。研究対象の独創性の高さの実施した研究手法の精密さ、ならびに取得したデータとそれに基づいた考察の深さのいずれの点においても優れた研究であることが認められた。以下に、その具体的な内容と所見をまとめる。

（1）光センサー蛋白質の分類

角氏が研究対象とした光合成を行わないバクテリアに分布する蛋白質 LitR は、当初 *Streptomyces* 属放線菌類や高度好熱菌 *Thermus* 属が保有するものが詳細に調べられ、コバラミンないしビタミン B12 として知られるテトラピロールにコバルトが配位した分子がアンテナとして結合し光の受容に関与することが明らかとされてきた。本蛋白質は、MerR ファミリーに含まれる転写調節蛋白質であり、光感知能と同時に DNA に結合して転写の開始

を調節する機能も有している。暗条件では転写調節の標的遺伝子の調節領域に結合してリプレッサーとして機能することでその転写開始を抑制するが、光が照射されるとアンテナ分子のコバラミンが光を吸収することで蛋白質のコンフォメーションが変化してリプレッサーとしての機能を失い、それに伴って RNA ポリメラーゼがリクルートされて転写が開始される。このタイプの調節蛋白質はその後、*Bacillus* 属を含む多様な分類群の細菌に広く分布していることが、角氏が所属する研究室における研究を通じて明らかになった。

これに加えて角氏は、同じく MerR に含まれながらもリガンド結合ドメインがコバラミン結合型とは異なる構造を有するタイプの転写調節蛋白質も存在し、それがやはり光照射に応答した転写調節を担っている可能性を見いだした。同氏は蓄積するゲノム情報を活用し、これまでに一次配列が解読されている類似の蛋白質について系統解析を行うことで、LitR 類似蛋白質が少なくとも 5 つのクラスに分類されることを明らかにした。これまでに知られるコバラミンを光アンテナ分子とするクラス I に加え、青色光受容体 LOV と相互作用するクラス II が存在すること、一方で、クラス III~V についてはアンテナ分子が一次配列から予想できないものであることを見いだした。このことは、同氏が考察しているように、これらのクラスが未知の光受容機構を有する新しい光センサー蛋白質であることを強く示唆している。同氏によるこの観察は、光を信号とする環境応答の分子生物学にこれまでに知られていない未知の大陸があることを予見する観察として大いに興味もたれる。

(2) クラス III 蛋白質に着目した分子生物学

角氏は、上記のように構造上の多様性が認められた LitR 類似蛋白質のそれぞれのクラスに対して予備的な検討を加え、その結果に基づいてグラム陰性細菌 *Burkholderia multivorans* が保有するクラス III 型の蛋白質に焦点を絞るという的確な方針を打ち出し、以降の精密な分子生物学的検証を推進している。それによって、以下に記述する光依存的に誘導発現する遺伝子群の役割に関する遺伝学的知見と、本クラスの蛋白質の光受容メカニズムに関する生化学的知見を収集した優れた成果を挙げることに成功している。

(i) 光依存的に誘導発現する遺伝子群の役割

角氏はまず、クラス III 型 LitR 蛋白質によって光依存的な調節がなされている遺伝子群の同定を行った。すでに予備的に実施されていた同検証の結果を踏まえて定量 RT-PCR 法を用いた転写解析を行うことで、*litR* 遺伝子に加えて光回復酵素遺伝子 *phr*、葉酸合成酵素遺伝子 *foIE2*、シクロプロパン環含有脂肪酸合成に関与すると予想される *cfa* オペロンを含む遺伝子群が光照射によって転写誘導されること、それが LitR の機能を介して起こることを明らかにした。さらに、同様に光と LitR に依存的に発現誘導が起こる遺伝子として σ 因子をコードする *litS* 遺伝子を見いだした。この発見に基づいてさらに遺伝学的な検証を行った結果として、*B. multivorans* における光照射に応答した遺伝子発現は、LitR による光受容によって、まずそのリプレッサー機能によって直接制御されている遺伝子群の発現が誘

発され、次にそうして生成する特異的 σ 因子である σ^{LitS} 蛋白質によってプロモーターが認識される遺伝子群が発現する、という 2 段階の誘導がおこることが明らかになっている。また、角氏は細胞内の葉酸量の定量も行っており、それが実際に光照射によって上昇すること、また *litR* 遺伝子の破壊によって明暗にかかわらず顕著に高いレベルを示すことを明らかにしている。以上の成果は、角氏が上記の検証で新しいタイプの光受容体として予想した III 型の蛋白質が実際に光照射に応答した転写制御を行っていること、それによって複数の主に光照射に対する防御応答に関与すると考えられる遺伝子群の発現が誘発されること、さらにそれが特異的 σ 因子の機能を介して段階的に起こることを明確にした点で高く評価できる。

(ii) クラス III 型蛋白質の光受容メカニズム

角氏はさらに、組み換え LitR 蛋白質を調製して、その光受容と DNA 結合に関する詳細な検証を進めた。その結果、本蛋白質が 340 nm 付近に単一の極大吸収を有し、それが光サイクル（光照射によって減少し、暗所に戻すことで回復する現象）と呼ばれる光センサーとして典型的な応答を示すこと、それが UV-A 領域の紫外線の照射によっておこることを見いだした。さらに、光照射が LitR の DNA 結合能に及ぼす影響をゲルシフトアッセイにより解析することで、暗条件の LitR は標的 DNA 配列への特異的な結合すること、一方で光照射された LitR は DNA 結合能が著しく低下していることを明らかにした。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによる見かけの分子量の計測を実施することで、暗条件下では計算上 16 量体に相当する大きな分子として振るまうが、光を照射することで 4 量体に変化することを見いだした。これらの結果から、前者は暗条件下で標的 DNA に対して強いリプレッサー活性を発揮するが、UV-A が照射されるとその 4 量体への解離によって DNA 結合能が低下することで、標的遺伝子群の転写が開始すると予想している。以上の観察は、当該蛋白質が光を吸収する分子であり、その光受容が DNA 結合能を制御していることを生化学的に裏付ける重要な証拠である。MerR 型の蛋白質が 16 量体として DNA に結合する事例は他にないと考えられ、その構造と作用に興味を持たれる。

DNA に対する相互作用上での構造と同時に、クラス III 型の LitR 蛋白質がいかなる構造によって光を受容しているかに興味を持たれる。そのため、角氏は本蛋白質に結合するクロモフォアが存在している可能性を様々な角度から検証したが、その検出には至っていない。また、元素分析の結果から金属も含まれていないと考えられた。角氏は一方で、蛋白変性剤の添加によって上述の 340 nm のピークがシフトするないし消滅することを見だし、さらにこのタイプの蛋白質の C 末端側領域に保存されている 3 つのシステイン残基をそれぞれアラニンに置換した変異体を作製すると、いずれにおいても 340 nm の極大吸収が消失し、また DNA 結合能も低下することを見いだした。これまでの結果を踏まえ同氏は、同じく保存されているいくつかの芳香族アミノ酸が関与するビルドイン型の光受容構造が本クラスの蛋白質の光感知を担っている可能性を想定している。これらの一連の検証と考察は、具体的

な構造の決定には至っていないものの、光受容体の多様性をさらに拡充する示唆に富む重要な成果である。

上記のように、申請者の角氏はグラム陰性菌の一つである *Burkholderia* 属が保有するクラス III 型 LitR に着目した詳細な解析を推進することで、(i) それが実際に光を感知して光依存性遺伝子群の転写を特異的に誘導する機能を有すること、(ii) 誘導される遺伝子群は 2 段階的に調節されること、(iii) 光感知ドメインがビルドイン型の構造をとっている可能性があることを明らかにした。本研究は、光応答の分子メカニズムの多様性とその普遍性を、一つの新規な蛋白質の機能と役割に焦点をあてて詳細な検討を多角的に加えることで、関連の学術上並びに応用上重要な知見を集積しており、生命科学領域の発展に大きく貢献するものと評価できる。

以上の内容に基づき、審査委員一同は、本論文が博士（生物資源科学）の学位論文としてふさわしいものとして一致した。