

氏名(本籍)	さき やま てつ し (北海道) 先 山 哲 史 (北海道)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 乙 第 2491 号		
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Structure and Function of Hemolysin-Like Protein in the Cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 がもつヘモリシン様タンパク質の構造および機能に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副 査	筑波大学准教授	博士 (農学)	鈴 木 石 根
副 査	筑波大学教授	理学博士	井 上 勲
副 査	筑波大学教授	理学博士	沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究は、光合成独立栄養生物シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 が生産する α -ヘモリシン様タンパク質 (hemolysin-like protein : HLP) に関し、その分子の特徴や機能解析から、なぜ光合成生物であるシアノバクテリアが HLP を有するのか、HLP がどのような機能を有し、HLP がどのような性質を有するかを解析したものである。HLP は、主に病原菌が有する RTX (repeat in toxin) タンパク質に特徴的な GGXGXDXUX (X:任意のアミノ酸、U:疎水性アミノ酸) の Ca^{2+} 結合モチーフを有することが知られている。近年、病原菌以外でもそのモチーフをもつグラム陰性細菌の存在が明らかになりつつあるが、それら生物における HLP の分子構造の性質および生理機能は依然不明である。HLP が、*Synechocystis* sp. PCC6803 のグルコース耐性株 (GT 株) において、3 μM 硫酸銅を添加した BG-11 培地で培養することによって培養液中に放出されるとの先行研究 (Nagai et al., 2001. In: PS2001 Proceedings. 12 th International Congress on Photosynthesis. S36-010, CSIRO Publishing, Melbourne, Australia) を踏まえ、本研究では、シアノバクテリアにおける HLP を精製し、その分子特性、細胞における局在性および生理機能を明らかにすることを目的としたものである。

第 1 章では、HLP の分子特性を明らかにした。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 のグルコース耐性株 (GT 株) の HLP は、3 量体である可能性を示唆した。原子吸光分析により、HLP1 分子当たり約 100 原子のカルシウムを結合し、銅は全く結合していないことを明らかにした。さらに、HLP は Ca^{2+} が結合すると compact form (90kDa) になり、 Ca^{2+} が遊離すると extended form (200 kDa) に変化することを見出した。さらに、HLP が熱処理後は約 1,000 kDa を示し、 Ca^{2+} の添加により 560 kDa 変化したことから、HLP は、熱処理と Ca^{2+} 添加を受けて多量体構造のまま構造変化を起こしていることを示した。また、熱処理と Ca^{2+} による構造変化は可逆的であることを明らかにした。

免疫電顕法により、HLP の細胞内局在は surface layer (S-layer) にあり、細胞内ではないことを示した。次に、抗 HLP 抗体によるウエスタンブロットティングによって、HLP は誘導性ではなく、恒常的に発現していること、および 3 μM 硫酸銅処理は、HLP を S-layer から培養液中に遊離させることを明らかにした。 Ca^{2+}

非結合型 HLP は羊赤血球に対して明瞭な溶血活性を示さなかった。

第2章では、HLP の機能解析を行った。まず *hlp* の C 末端領域をスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換した HLP 欠損株を作製した。そして、HLP 保持株 (GT 株) および HLP 欠損株 (GD 株) を用いて、重金属、抗生物質、浸透圧ストレス条件下でそれぞれ培養し、増殖に対する影響を調べ、以下の結果を得た。(1) カドミウムについて、0.5-6 μM の濃度範囲で、(2) 硫酸銅では 1-5 μM の濃度範囲で、(3) 塩化亜鉛では 0.5-3 μM の濃度範囲で、(4) カナマイシンおよびアンピシリンでは 0.1-0.3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、(5) ソルビトールでは 0.2-0.5 M の濃度範囲で、GD 株は GT 株よりもより大きな増殖阻害を受けた。以上より、HLP が重金属阻害、抗生物質および浸透圧阻害の緩和に寄与することを明らかにした。

カドミウムの放射性同位体である ^{109}Cd を GT および GD 株培養懸濁液に添加し、シリコンオイル層遠心法を用いて解析した。それらの結果から、重金属によって GT 株の増殖抑制が緩和された原因は、S-layer に局在する HLP が重金属、抗生物質やソルビトールの影響を緩和するものであると考えられる。

本研究は、*Synechocystis* sp. PCC6803 の S-layer に局在する HLP が種々の環境ストレス阻害を緩和する幅広い機能をもつことを明らかにした。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 GT 株が生産する α -ヘモリシン様タンパク質 (hemolysin-like protein : HLP) の分子特性と機能解析を行ったものである。その結果、HLP が細胞表層の S-layer を構成するタンパク質であり、カルシウム結合型の 3 量体構造を有することを見出した。さらに、当該細胞が、HLP を細胞表層に局在させることによって、重金属、抗生物質、浸透圧影響に対する耐性能を向上させる能力を獲得することを、生理学、生化学、分子生物学的手法を全て駆使することによって明らかにしたものである。本 GT 株は人為的な変異により得られたものであるが、自然界においても同様の変異を有す細胞が出現した場合、環境影響を受けにくい株となることが期待される。本研究の成果は、微細藻類、微生物の環境応答、環境影響耐性に関する興味ある知見を提供したものであり、高く評価できるものである。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。