

氏 名 兼 崎 友

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第606号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 DNAマイクロアレイを用いたラン藻 *Synechocystis* sp.
PCC 6803 における塩ストレス及び高浸透圧ストレス
誘導性遺伝子の網羅的解析

論文審査委員	主 査 教授	飯田 滋
	教授	村田 紀夫
	教授	長谷部 光泰
	教授	堀内 嵩

論文内容の要旨

本研究は、ラン藻における塩ストレス及び高浸透圧ストレス応答の機構を分子レベルで解明するために行われた。

第 1 章では、本研究の意義及びストレス応答に関する研究の背景をまとめた。植物のストレス応答機構を解明することの重要性と、そのためのモデル系として、ゲノム解析が終了したラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 が有利な材料であることについて述べた。また、*Synechocystis* 用の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析と、ラン藻においてこれまでに明らかにされている塩ストレス耐性の機構をまとめた。

第 2 章では、塩ストレス及び高浸透圧ストレスが、ラン藻に対して生理レベルでどのような効果を及ぼすかについて解析した結果をまとめた。細胞の生育においては、*Synechocystis* は塩ストレスよりも高浸透圧ストレスに対してより感受性を示した。また、0.5M NaCl もしくは 0.5 M sorbitol が引き起こす高浸透圧ストレスによる脱水効果を比較するため、スピンプローブを用いた EPR 法により細胞質体積の変化を解析した。その結果、0.5M sorbitol は、長時間にわたって細胞質体積を大きく減少させるが、0.5M NaCl による効果は相対的に弱く、しかも一時的なものであることが明らかになった。これらの結果、塩ストレスが細胞に及ぼす主要な効果はイオンによるストレスであり、高浸透圧ストレスとは生理レベルで異なっていることが明らかになった。

第 3 章では、さらに遺伝子発現のレベルでの塩ストレスと高浸透圧ストレスの比較を行うため、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、塩ストレス及び高浸透圧ストレスにより、全遺伝子中の約 1 割の遺伝子が、発現の誘導もしくは抑制を受けることが明らかになった。そのうちの約半数は、コードするタンパク質の機能が同定されていない遺伝子であった。これらは、塩ストレス及び高浸透圧ストレスに対する耐性及び適応の機構が、これまで考えられてきたよりも複雑であることを示唆するものであった。また、DNA マイクロアレイにより得られた発現の誘導比は、従来の Northern blotting 法と比べてもそれほど大きな差が無いことも明らかになった。さらに、ストレスにより発現の変化が見られた遺伝子を誘導比に基づいて分類した結果、塩ストレスもしくは高浸透圧ストレスに特異的な発現の変化を示す遺伝子群が存在することが明らかになった。それらの多くは、細胞内の特定の機能や化合物の代謝に関わる一連のタンパク質をコードした遺伝子群であることが明らかになった。塩ストレス特異的に発現が誘導される遺伝子は、リボゾームタンパク質などの一群であった。高浸透圧ストレス特異的に発現が誘導される遺伝子は、リポタンパク質などの一群であった。さらに、塩ストレスと高浸透圧ストレスの両方で発現が誘導される遺伝子は、熱ショックタンパク質やシグマ 70 因子などの一群であった。同様に、ストレスに特異的な発現の抑制を受ける遺伝子も、同じ機能に関わる遺伝子間で共通の制御を受けている傾向があることが明らかになった。塩ストレス特異的に発現が抑制される遺伝子は、脂質不飽和化酵素などの一群であった。また、塩ストレスと高浸透圧ストレスの両方で発現が抑制される遺伝子は、光化学系 I やフィコビリゾームを構成するタンパク質などの一群であった。これらの結果は、細胞における塩ストレスと高浸透圧ストレスの作用点の違い、及びシグナル伝達経路の違いを示唆するものであった。一方で、両方のストレスに共通した遺伝子発現制御の機構が存在することも示唆された。

第 4 章では、総合考察として、DNA マイクロアレイによる解析の利点及び問題点に関して論じた。また、本研究の今後の展望について考察した。

論文の審査結果の要旨

塩ストレスと高浸透圧ストレスは、多くの植物の生育を阻害する重要な環境ストレスである。申請者は植物細胞のモデルとしてラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を材料として選び、これらのストレスが細胞に及ぼす効果を生育、細胞質体積、及び遺伝子発現の各レベルで解析し、比較を行った。論文は以下の4章から構成されている。

第1章：研究背景 研究材料としてのラン藻の有意性、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析の手法、及びこれまでに明らかにされている塩ストレス応答の機構について詳細に記述した上で、本研究の目的を述べている。

第2章：ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における塩ストレス及び高浸透圧ストレスによる生育阻害及び細胞質体積の変化 塩ストレスと高浸透圧ストレスが細胞質体積に及ぼす効果の違いをスピンプローブ EPR 法により測定している。その結果、NaCl による塩ストレス処理により細胞が受ける高浸透圧効果は弱く一過的であることが明らかになった。

第3章：ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における塩ストレス及び高浸透圧ストレスによる遺伝子発現の変化 塩ストレスと高浸透圧ストレスにより細胞の遺伝子発現がどのような影響を受けるかを、DNA マイクロアレイを用いて解析している。その結果、塩ストレス及び高浸透圧ストレスによりそれぞれ全遺伝子の 11.8% 及び 8.6% の遺伝子が発現の誘導もしくは抑制を受けていることが明らかになった。また、細胞内の特定の機能や物質の代謝に関わるタンパク質をコードする遺伝子は塩ストレスもしくは高浸透圧ストレスに特異的な発現の制御を受けていることも明らかになった。これらの結果から以下の可能性が示された。1) これまでに知られた塩ストレス及び高浸透圧ストレス耐性遺伝子以外にも多くの遺伝子がストレス応答及び耐性の機構に関与している可能性。2) 塩ストレスと高浸透圧ストレスのシグナル伝達に関わる経路が異なっている可能性。

第4章：総合討論 DNA マイクロアレイによるゲノムレベルでの遺伝子発現解析の利点及び問題点について考察している。

なお、以上の研究成果は、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 誌に掲載された。

本研究は、網羅的な解析により塩ストレス及び高浸透圧ストレスによるゲノムレベルでの遺伝子発現の制御が行われていることを示した重要な研究である。したがって、学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と判定した。

審査委員会は、専門領域及び関連領域に関する口述試験を行った。その結果、審査委員は一致して兼崎友の研究内容、専門分野に関する知識と理解が学位取得の条件を十分に満たすものと判定した。