

氏 名 Ali, Ferjani

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第693号

学位授与の日付 平成15年3月24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 Glucosylglycerol, a Compatible Solute, Sustains Cell
Division under Salt Stress in *Synechocystis* sp.
PCC 6803

論文審査委員	主 査	教授	大隅 良典
		教授	西村 幹夫
		教授	村田 紀夫
		助教授	塚谷 裕一

論文内容の要旨

The growth and spatial distribution of living organisms are severely restricted by a variety of environmental factors. The acclimation of organisms to a constantly changing environment involves the accumulation of organic compounds of low molecular mass collectively called compatible solutes. The accumulation of compatible solutes has been intensively investigated during the last two decades however their protective role remains hypothetical. In this research the unicellular cyanobacterium, namely *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*, hereafter), is used as a model organism to study the role of compatible solutes in the protection against salt stress. *Synechocystis* cells accumulate glucosylglycerol (GG) and transiently sucrose as compatible solutes in response to an upward shift in concentrations of NaCl in the growth medium. While the molecular mechanism for GG synthesis including the regulation of expression of the *ggpS* gene which encodes glucosylglycerol phosphate synthase, the key enzyme for GG biosynthesis, has been intensively investigated, the role of GG in protection against salt stress remains poorly understood.

In order to study the role of GG in the tolerance to salt stress, *Synechocystis* cells which are deficient in the biosynthesis of GG, namely $\Delta ggpS$ cells, were generated by targeted mutagenesis of the *ggpS* gene. $\Delta ggpS$ cells are much more sensitive to salt stress than wild-type cells. Furthermore, salt stress due to 450 mM NaCl inhibited cell division and significantly increased cell size of $\Delta ggpS$ mutant cells, whereas the inhibition of cell division and increase in cell size were observed in wild-type cells at much higher concentrations of NaCl, such as 800 mM. Long-term incubation of $\Delta ggpS$ cells with 450 mM NaCl induced cell lysis. In addition, electron microscopic analysis revealed that, in $\Delta ggpS$ cells, separation of daughter cells was incomplete and the aborted division could be recognized by the presence of a structure that resembled a division ring. These results suggested that NaCl specifically inhibits cell division machinery in *Synechocystis* cells.

Cell cycle in a prokaryotic cell such as *E. coli*, could be subdivided into three major events, namely cell elongation, cell septation and cell separation. During cell elongation, DNA replication and active biosynthesis of proteins is a prerequisite for cell division. Cell septation is characterized by the formation of a division-ring followed by the formation of a septum that splits the mother cell into two daughter cells during cell separation, which indicates the end of cell cycle. In order to determine the step of cell cycle that is inhibited by NaCl, the amounts of DNA, proteins and chlorophyll per single cell were determined. In fact, the amounts of DNA, proteins and chlorophyll per cell increased about 4-, 7- and 4-fold respectively in $\Delta ggpS$ cells after incubation with 450 mM NaCl for 3 days. On the other hand, in $\Delta ggpS$ cells which have been grown under control conditions, the levels of these macromolecules remained almost constant after three days. This result suggested that in $\Delta ggpS$ cells even under salt stress conditions cell elongation occurred normally. However, salt stress seems to arrest the cellular processes that follow cell elongation, namely cell septation and cell separation. In contrast, in wild-type cells, no arrest in cell division was observed during incubation of cells with 450 mM NaCl.

On the other hand, osmotic stress due to 900 mM sorbitol, which has approximately the same osmotic effect as 450 mM NaCl, totally arrested the growth of wild-type and $\Delta ggpS$ cells. While 450 mM NaCl induced a significant increase in size of $\Delta ggpS$ cells, 900 mM sorbitol slightly reduced (about 10~20%) the size of both wild-type and $\Delta ggpS$ cells. Thus, the inhibition of cell division and the increase in cell size induced by long-term incubation with 450 mM NaCl were due to the ionic effect of NaCl.

Exogenous supplementation of GG at 1 mM to the culture medium protected $\Delta ggpS$ cells against salt stress and reversed the adverse effects of NaCl on cell division and cell size. Moreover, the addition of equivalent concentrations of compatible solutes other than GG, such as sucrose, sorbitol and trehalose, failed to rescue the $\Delta ggpS$ cells under salt-stress conditions. From all these observations, he suggested that GG is important for salt stress tolerance in *Synechocystis* cells. Also, he could successfully demonstrate for the first time in a photosynthetic organism that NaCl specifically inhibit cell division machinery. Finally, he could demonstrate accurately that the compatible solute GG is necessary for the proper functioning of cell-division machinery in *Synechocystis* cells under salt-stress conditions.

論文の審査結果の要旨

植物やバクテリアは高濃度の塩などのストレスに曝されると、適合溶質と呼ばれる低分子化合物を蓄積し適応する。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、塩ストレス下でラン藻が合成、蓄積する適合溶質であるグルコシルグリセロールが塩耐性に重要な役割を持つことを、生育、細胞の大きさ、及び細胞分裂の各レベルで解析し、その機能を検討した。論文は以下の6章から構成されている。

第1章：研究背景 植物細胞およびバクテリアにおいて明らかにされている塩ストレス及び高浸透圧ストレス応答とその適応機構、及び様々なストレス下での適合溶質の蓄積と耐性の獲得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：実験操作 本実験で用いられた研究手法について詳細に記述している。

第3章：塩ストレスによる細胞分裂機構の阻害

ラン藻は塩ストレスにより生育阻害を受けるが、グルコシルグリセロール合成に関わる酵素をコードした遺伝子 (*ggpS*) を破壊した株では、より強い生育阻害を受ける。また、塩ストレスに曝された *ggpS* 遺伝子破壊株では細胞の膨張が起きていることを光学顕微鏡及びフローサイトメトリー法により確認した。さらに電子顕微鏡で観察することにより塩ストレスが細胞分裂機構の阻害を起こし、その結果細胞の溶解がおこること、及びグルコシルグリセロールがその補償に必要であることを示唆した。

第4章：グルコシルグリセロールによる塩ストレス下での細胞分裂阻害の補償

細胞外からグルコシルグリセロールを添加することで、塩ストレス下で *ggpS* 遺伝子破壊株に見られた細胞の膨張が回復することをフローサイトメトリー法により明らかにした。また、この効果は他の適合溶質では観察されなかった。これらの結果から、それぞれの適合溶質が持つ機能は異なっている可能性が示された。

第5章：細胞分裂に及ぼす塩ストレスと高浸透圧ストレスの違い フローサイトメトリー法により塩ストレス下では細胞の膨張が観測されるが、高浸透圧ストレス下では観測されないことから、これらのストレスが細胞に対して異なる効果を持つことを明らかにした。

第6章：総合討論 研究成果に関する考察、及びこれまでの適合溶質と塩耐性に関する報告との比較をおこなっている。

なお、以上の研究成果は、*Plant Physiology* 誌に掲載された。

本研究は、塩ストレスが細胞の分裂機構を阻害すること、及びグルコシルグリセロールの蓄積がその補償に必須であ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 Ferjani Ali 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。