

氏名	田川 進也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4017号
学位授与の日付	平成21年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	ラン藻 <i>Oscillatoria brevis</i> のリプレッサータンパク質 BxmR による重金属ストレス下での遺伝子発現調節に関する研究
論文審査委員	准教授 江崎 文一 教授 馬 建鋒 准教授 田中丸重美

学位論文内容の要旨

本研究では、(I)糸状体ラン藻 *O. brevis* において金属耐性に関わるタンパク質であるメタロチオネイン (BmtA) と CPx-ATPase 金属トランスポーター (Bxa1) を発現制御している BxmR リプレッサータンパク質のオペレーターに対する結合位置の詳細な解析、および結合様式の検討と (II) *bmtA*、*bxmR* および *bxa1* 遺伝子発現に inducer として関わる Ag、Cu、Cd、Zn 以外の金属の検討を行った。さらに (III) *O. brevis* に代わり、同じ原核細胞である *E. coli* を用いた BxmR の関わる遺伝子発現制御系の再現による *bmtA/bxmR* プロモーター解析を試みた。

(I) EMSA と DNaseI foot printing assay の結果、BxmR は *bmtA/bxmR* および *bxa1* のオペレーター(O)/プロモーター(P) 領域に存在する 12-2-12 inverted repeat 配列に結合することが確認された。さらに BxmR は TGA 部位に対する結合力が弱く、特に G に対する結合力は非常に弱い、無いことが分かった。また EMSA では、12-2-12 配列内の変異数が多くなるに従い、BxmR の結合力は急激に弱まったことから、TGA 部位は BxmR が 12-2-12 配列に結合する上で欠かさないことが分かった。また、12-2-12 配列への一塩基置換導入は BxmR に対して重金属添加時に DNA 鎖から解離させやすくするが、その解離性の変化は金属種によって異なった。

(II) 新たな EMSA の結果、BxmR は Au により、DNA 断片から解離することが示されたが、La と Cr による影響は受けなかった。また、RT-PCR による Au 暴露時の *O. brevis* における *bmtA*、*bxa1* および *bxmR* 発現量の濃度依存的変化および経時変化を測定した結果、*bmtA* 遺伝子では約 50 倍、*bxa1* 遺伝子では約 8 倍の発現量増加が暴露後 1~4 時間後付近で見られた (*bxmR* は微増)。このことから Au が新規の inducer であることが明らかになった。

(III) *E. coli* を用いて BxmR の関わる遺伝子発現応答機構の再現を試みた。*bmtA* および *bxmR* 遺伝子の代替遺伝子をリポーター遺伝子として両末端に持つ *bmtA/bxmR* O/P 全領域断片を挿入されたプラスミド (pBS1) と BxmR タンパク質を発現させるためのプラスミド (pBS2) を併せて保持する *E. coli* 転換体を作成し、Zn 1200 μ M、Ag 20 μ M または金属無添加条件下での *bmtA* と *bxmR* のリポーター遺伝子の発現量の変化を RT-PCR により測定した。しかし、これらの発現パターンは *O. brevis* で見られたものとは異なっており、*E. coli* と *O. brevis* 間で発現制御系が予想以上に違うため、再現できなかったものと思われた。

論文審査結果の要旨

本研究では、【1】糸状体ラン藻 *O. brevis* において金属耐性に関わるタンパク質であるメタロチオネイン (BmtA) と CPx-ATPase 金属トランスポーター (Bxa1) の発現を制御する BxmR リプレッサータンパク質のオペレーターに対する結合位置の詳細な解析、および結合様式の検討と、【2】 *bmtA*、*bxmR* および *bxa1* 遺伝子の発現に inducer として関わる Ag、Cu、Cd、Zn 以外の金属の検討を行っている。さらに【3】 *O. brevis* に代わり、同じ原核細胞である *E. coli* を用いた BxmR の関わる遺伝子発現制御系の再現による、*bmtA/bxmR* プロモーターの解析を試みている。まず、今回の研究を通して 12-2-12 inverted repeat 配列に特異的に結合することが明らかにされたとともに、その結合は均一ではないことを示した。また、この配列に変異を与えると BxmR の結合性が著しく低下することを示し、この配列が BxmR の結合に大変重要であることを明らかにした。さらに BxmR による *bmtA* や *bxa1* 遺伝子の発現制御に Au も関与することを示した。BxmR は他の同類のリプレッサーとは異なり、広範囲の 1 価、2 価の重金属に応答するが、今回の結果から応答する金属種の範囲がさらに広がった。残念ながら、BxmR 制御系の *E. coli* 内での再構築はうまく行かなかった。この点については今後も何らかの検討が望まれる。なお、博士論文内容や論文発表会には別段、重大な問題点は無かった。

研究内容には未だ完結していない部分もあるが、上記のような新規の知見がいくつか示されており、この研究分野においては重要なものと評価できるので、博士（農学）を授与するのに足りると判断されるという、審査結果に至った。