

論文の内容の要旨

論文題目 Biosynthesis and regulation of extracellular polysaccharides in cyanobacteria.

(シアノバクテリアにおける細胞外多糖の合成・制御機構)

氏名 前田 海成

全体の背景と目的

細胞外多糖(EPS)は一般的に微生物が細胞外に放出する多糖を指すが、私は植物のセルロースや動物のグリコサミノグリカン等の細胞外基質・構造多糖も本質的には EPS であると考えている。その中で、微生物の EPS は固着や微生物マット形成、またバイオフィームとしてストレス耐性に関わり、病原菌の感染性にも密接に関係する。また、EPS は食品や素材としても有用である。これらの重要性から、バクテリアの多様な EPS とそれらの合成系は古くから研究されており、いくつかの合成メカニズムに分類される。例を挙げると、酢酸菌が作る強固な不溶性多糖セルロースは、内膜を貫通するセルロース合成酵素を中心とした「合成酵素型複合体」により合成・排出される。*Xanthomonas* が合成する高粘性の酸性多糖キサントガムは、フリッパーゼを含む「Wzx/Wzy 型複合体」によって合成・排出される。

一方、シアノバクテリアにおいても、多様な EPS やそれらに関わる生理現象が報告されている。しかし、遺伝子レベルでの合成メカニズムに関する研究はこれまでほとんどなかった。シアノバクテリアは他のバクテリアとは系統的に離れており、さらに光合成という生存戦略は従属栄養生物と大きく異なる。また、硫酸多糖のようにシアノバクテリアに特徴的な有用多糖の合成系を明らかにできれば、応用面でも重要な貢献になる。本研究は、このようなシアノバクテリア固有の EPS 合成系とその制御機構の解明をめざすものである。

1章 シアノバクテリアにおける多様な NDP-sugar ピロホスホリラーゼ

背景と目的

多糖合成の基質となる NDP-sugar は NDP-sugar ピロホスホリラーゼ(PPase)によって合成される。その中でも UDP-glucose (Glc)は、チラコイド膜を構成する脂質の合成やセルロース合成の基質でありシアノバクテリアにとって必要不可欠な分子である。ところが、合成酵素 UDP-Glc PPase はバクテリア型の GalU が限られた種に存在するのみで、大部分のシアノバクテリアでは不明であった。そこで私は、未知の UDP-Glc PPase が存在すると考え、その同定を目的とした。

さらに、他の未同定群のものを含む複数のタンパク質についても同定することで、NDP-sugar PPase の進化等を明らかにすることも目的とした。

結果と考察

NDP-sugar PPase の系統解析と配列比較により、NTP 基質結合部位の直前に、UTP を基質とする酵素にのみ特異的なアラニン(Ala)残基を見出した。この Ala 残基を持つ未同定酵素群に属するタンパク質 Sll1558 の活性を測定し、基質特異性の厳密な UDP-Glc PPase であることを示した。Sll1558 のホモログはほぼ全てのシアノバクテリアに存在する。私はこのタンパク質を CugP(cyanobacterial UDP-Glc PPase)と名付けた。次に、特徴的な Ala をグリシンに変えた変異タンパク質の活性を測定したところ、UTP への結合能は低下したが特異的な基質は依然 UTP と Glc 1-phosphate であった。この結果は、他の残基も UTP の認識に関与していることを示唆している。

続けて、プロテオバクテリア等の CugP ホモログの基質特異性を測定し、シアノバクテリアで生じた CugP が進化の早い段階で別のバクテリアに水平伝播した可能性を示す結果を得た。また CugP と GalU という2種類の UDP-Glc PPase がシアノバクテリアと他のバクテリアで異なる形で進化において取捨選択されてきたことが推察された。

系統樹において CugP と姉妹群となる大きな未同定群が、これまで遺伝子が不明であった GDP-Glc PPase をコードすることが判明した。共通祖先型から GDP-Glc と UDP-Glc へ基質特異性が変化した可能性が考えられる。

2章 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* における細胞外セルロース合成系

背景と目的

好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* は低温青色光条件下で細胞外セルロースを蓄積して細胞凝集することが知られている。先行研究により、バクテリアのセルロース合成酵素 BcsA と相同なタンパク質 Tll0007 (Kawano *et al.*, 2011)と、光受容体タンパク質 SesA などが青色光に応答して蓄積するセカンドメッセンジャー分子 c-di-GMP (Enomoto *et al.*, 2015)がセルロース合成に必要なことが明らかにされていた。これをふまえ、Tll0007 と c-di-GMP 以外の細胞外セルロース合成に必要な因子と、低温誘導の原因を探ることを目的とした。

結果と考察

Tll0007 と恒常的な c-di-GMP 合成酵素の二重過剰発現株を作製したが、その細胞凝集とセルロース蓄積は野生株が誘導条件(低温青色光)で示す程度には及ばず、さらに別の因子の寄与が推察された。シンテ

シー解析により、*hlyD* 様遺伝子 *tlr0903* とエンドグルカナーゼ様 *tlr1902* を見いだした。それぞれの破壊株は誘導条件で細胞凝集を示さなかった。また、これらの転写量を定量 PCR で調べ、*tlr0903* の転写が低温で大きく上昇することを見出した。c-di-GMP 合成酵素と *tlr0903* の二重過剰発現株は、通常培養条件でありながら、野生株の誘導条件と同等の非常に強い細胞凝集と高いセルロース蓄積を示した。これらの結果から、青色光と低温という環境要因はそれぞれ、SesA などによる c-di-GMP 合成を介した Tll0007 の活性化と、*tlr0903* の転写誘導によりセルロース合成を実現しているといえる。これらの因子からなるシアノバクテリアの細胞外セルロース合成酵素を Xcs (extracellular cellulose synthase) と命名した。そして、XcsA(Tll007)は BcsA とは異なり、XcsB(Tlr0903)と XcsC(Tlr1902)とセルロース合成酵素複合体を形成するという新しいモデルを提唱した。

3章 *Synechocystis* sp. PCC 6803 運動性株における細胞外硫酸多糖合成系

背景と目的

私は *Synechocystis* の運動性株の培養液を静置培養すると、ブルーム様の細胞塊を形成する現象を発見した。そこで、この現象と EPS の関係性と、その合成メカニズムを明らかにすることを目的とした。

結果と考察

細胞の培養液を静置培養に移すと、細胞が緩く集合し気泡とともに浮上し、ブルーム様の細胞塊を形成した。この現象は暗所や DCMU 添加条件では生じなかった。このことから、菌体が生産した細胞外粘性物質が光合成による酸素気泡や菌体細胞とからまり浮上すると考えられる。この細胞外の仕組みによるブルーム形成は、既知の細胞内のガス胞によるブルーム形成と異なる新しいものである。

この粘性物質を回収して分析した結果、タンパク質は含まれず、ほぼ多糖であった。組成分析の結果、糖の約 10%を硫酸基で修飾された硫酸多糖であった。また、複数の膜貫通性糖転移酵素の破壊株を作製し解析することで、この多糖の合成遺伝子クラスター *xss* (extracellular sulfated polysaccharide synthase) を同定した。個々の遺伝子の破壊株を解析した結果、ほぼ全ての遺伝子の多糖合成への関与、2つの硫酸基転移酵素の重要性の差、二成分制御系 XssR-S による多糖合成系の制御が明らかとなった。特に、ヒスチジンキナーゼ XssS の破壊株では多糖の量が野生株の約 19 倍になり、硫酸基置換率が約 27% に上昇した。*xssR* の隣には DNA 結合ドメインをもつ *xssQ* が存在していたため、定量 PCR によりクラスター内の転写変動を調べた。多糖が蓄積しない XssQ 破壊株では一部の糖鎖合成・修飾関連遺伝子の転写が著しく低下しており、多糖を異常蓄積する XssS 破壊株ではそれらの遺伝子の転写が上がる傾向が見られた。この結果から、二成分制御系による XssQ を介した転写制御が示唆される。

Xss はキサントガム合成系と類似性があり、Wzx/Wzy 型複合体を形成している可能性がある。今後は硫酸多糖の合成と制御メカニズムの詳細説明を目指す。

総括

本研究により、新しいタイプの UDP-Glc PPase (CugP) や GDP-Glc PPase 活性のみをもつ初の酵素、新しいタイプのセルロース合成酵素遺伝子 (*xcsABC*)、微生物の硫酸多糖合成系として初の遺伝子セット (*xssA~S*) を同定できた。これらがユニークであるのは、シアノバクテリアがバクテリアの中でも特異な位置を占めていることによると思われる。遺伝子の系統解析から、CugP はシアノバクテリア起源で

あり、一部のバクテリアに水平移動していることが推定される。またセルロース合成酵素は、シアノバクテリアが起源であり、*xcsABC*タイプから酢酸菌などの酵素が進化した可能性も考えられる。一方、硫酸多糖は多くのシアノバクテリアで報告されているが、*xssA~S*と全体が相同なクラスターはデータベース上にない。しかし、個々の遺伝子と相同な遺伝子は多数存在するので、本研究の知見をもとに、シアノバクテリアや藻類の多様な硫酸多糖の合成系が将来解明される可能性がある。なお細胞外多糖は、モデル生物を研究室での一般的な条件で培養してもあまり蓄積されないことが多いが、環境中の微生物の生態や多様性に密接に関わると考えられ注目されている。本研究はこのような研究の発展に貢献するものと期待したい。また、本研究が同定した Xss 系は、硫酸多糖の人工的な生産と改変の研究のブレイクスルーになりえるだろう。