

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	初期型光合成の制御に関わる硫化水素応答性転写因子の同定と機能解析
Title(English)	
著者(和文)	清水隆之
Author(English)	Takayuki Shimizu
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10586号, 授与年月日:2017年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:増田 真二,太田 啓之,駒田 雅之,久堀 徹,中戸川 仁,松浦 克美
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10586号, Conferred date:2017/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム	専攻	申請学位（専攻分野）： 博士 Academic Degree Requested	（ 理学 ） Doctor of
学生氏名： Student's Name	清水隆之		指導教員（主）： Academic Advisor(main)	増田真二
			指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

光合成が地球上に誕生した初期の段階では、水よりも酸化が容易な硫化水素などのイオウ化合物を電子供与体にして光合成が行われていたと考えられている。実際、硫化水素を電子供与体にして光合成を行う細菌種が現在も多数同定されている。硫化水素濃度が変動する環境は自然界に多く存在する。光合成細菌はそうした環境に合わせて、硫化水素の酸化に関わる酵素の発現を、その濃度に応じて制御していると考えられる。硫化水素に反応した光合成電子伝達系の制御に関する報告は存在するが、硫化水素応答性の制御因子は同定されておらず、詳しい制御機構は解明されていない。急激な生物進化には、遺伝子構造の変化よりも遺伝子制御系の変化の方が重要だと考えられている。硫化水素の応答機構は、初期の光合成の進化にとって重要であったと考えられる。

硫化水素は、光合成細菌や化学合成細菌にとってエネルギー源・電子供与体として利用される資源であるが、哺乳動物をはじめとした多くの真核生物やその代謝能を持たない原核生物にとっては毒物である。しかし、近年、硫化水素が一酸化炭素、一酸化窒素に次ぐ第 3 のガス状生理活性シグナル伝達分子であることがわかってきた。その生理作用は原核生物から真核生物まで普遍的に存在し、様々な生理機能に関与する。動物では、血管新生、小胞体ストレス調節、インスリン分泌や神経伝達の調節などに関与する。細菌では、抗生物質抵抗性の調節に関与する。この生理機構において、硫化水素自体はシグナル伝達分子ではなく、活性イオウ分子種 (RSS) がシグナル伝達に関わると考えられている。RSS は非常に反応性の高い物質で、スルフヒドрилラジカル (HS \cdot)、システインスルフェン酸 (Cys-SOH)、有機低分子ヒドロジスルフィド (パースルフィド)、RSSH (システインパースルフィド; Cys-S-SH やグルタチオンパースルフィド; GSSH)、無機パースルフィド分子種 (HS $_2$ H) などを含む。哺乳動物細胞において、パースルフィド化 (S-スルフヒドリル化) タンパク質が同定されており、その修復経路も解明されているが、タンパク質および酵素のパースルフィド化の機能的影響は、まだ一般的には明らかではない。硫化水素によるシグナル伝達は、いまだ研究途上の段階にあり、詳しい制御機構については不明な点が多い。

本研究では、硫化水素応答機構が発達していると考えられる紅色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* を用いて、硫化水素応答性の制御因子を同定し、その機能解析を行うことで、細胞が硫化水素濃度を感知する分子機構の解明を試みた。

本研究において私は、紅色光合成細菌 *R. capsulatus* から、硫化水素依存的な光合成のマスターレギュレーターとして機能する硫化水素応答性転写因子 SqrR を同定した。*R. capsulatus* の SqrR は 3 つのシステイン残基を持ち、そのうちの 2 つ (Cys41 と Cys107) は異なる細菌種の SqrR ホモログ間に保存されていた。LC-ESI-MS/MS 等の解析により、SqrR は、Na $_2$ S と酸化型グルタチオン (GSSG) で同時処理することで、Cys41 と Cys107 の間で分子内テトラスルフィド結合を形成することがわかった。テトラスルフィド結合を形成した SqrR は、修飾を受けていない状態と比較して、標的オペレーター領域への DNA 結合親和性が低くなった。保存された 2 つのシステイン残基の各点変異株 (C41S および C107S) は、硫化水素応答性を失い、標的遺伝子の発現を常に抑制していた。溶液中において Na $_2$ S は速やかに HS $^-$ となり、共存している GSSG は、HS $^-$ によって酸化能力が高いグルタチオンパースルフィド (GSSH) に変換されることが知られている。これらの結果から SqrR は、硫化水素依存的に生成される GSSH をはじめとした活性イオウ分子種 (RSS) を認識し、硫化水素代謝に必要な遺伝子発現を誘導するリプレッサーとして機能していることがわかった。

さらに、SqrR が、試験管内においてヘムを結合することを明らかにした。SqrR の標的オペレーターへの DNA 結合親和性は、ヘムが結合することで低下した。このことから SqrR は、DNA 結合能力を硫化水素濃度だけでなく、ヘム濃度にも依存させることで、RSS 代謝機構の制御のダイナミクスをより向上させている可能性が示唆された。本研究の遂行により、硫化水素代謝に関わる遺伝子群の硫化水素依存的な転写制御の分子機構が明らかとなった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名 : Student's Name	清水隆之		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	増田真二	
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Sulfide was employed as an electron donor early in the evolution of photosynthesis, with many extant photosynthetic bacteria still capable of using sulfur compounds such as hydrogen sulfide (H_2S) as a photosynthetic electron donor. Although enzymes involved in H_2S oxidation have been characterized, mechanisms of regulation of sulfide-dependent photosynthesis have not been elucidated. In this study, I have identified a sulfide-responsive transcriptional repressor, SqrR, that functions as a master regulator of sulfide-dependent gene expression in the purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. SqrR has three cysteine residues, two of which, C41 and C107, are conserved in SqrR homologs from other bacteria. LC-ESI-MS/MS analysis reveals that SqrR forms an intramolecular tetrasulfide bond between C41 and C107 when incubated with the sulfur donor glutathione persulfide. SqrR is oxidized in sulfide-stressed cells and tetrasulfide crosslinked SqrR binds more weakly to a target promoter relative to unmodified SqrR. C41S and C107S *R. capsulatus* SqrRs lack the ability to respond to sulfide and constitutively repress target gene expression in cells. These results establish that SqrR is a sensor of H_2S -derived reactive sulfur species that maintain sulfide homeostasis in this photosynthetic bacterium and reveal the mechanism of sulfide-dependent transcriptional de-repression of genes involved in sulfide metabolism. I also found that SqrR binds heme at a near one-to-one ratio with a high binding-constant that is similar to that of catalase. The binding affinity of the heme-bound SqrR to the target operator region is weaker than that observed for heme-unbound SqrR. Interestingly, cellular heme concentration is significantly decreased upon sulfide treatment. From these observations, I conclude that SqrR responds to both sulfide and heme concentrations in vivo to regulate sulfide-dependent photosynthesis.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).