

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シアノバクテリアに普遍的に保存されるレスポンスレギュレーター Rre1による転写制御機構の解明
Title(English)	
著者(和文)	小林一幾
Author(English)	Ikki Kobayashi
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10587号, 授与年月日:2017年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 寛,今村 壮輔,久堀 徹,太田 啓之,増田 真二
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10587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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(博士課程)

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	小林 一幾		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	田中 寛	教授	審査員	今村 壮輔	准教授
	審査員	久堀 徹	教授			
		太田 啓之	教授			
		増田 真二	准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「シアノバクテリアに普遍的に保存されるレスポンスレギュレーターRre1 による転写制御機構の解明」と題し、全てのシアノバクテリア及び多くの光合成生物にとって重要な役割を持つと考えられる Rre1 について、モデル生物 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を用いて Rre1 の機能及び、Rre1 による制御機構を明らかにしたものであり、以下の 5 章で構成されている。

第1章「序論」では、シアノバクテリア及び二成分制御系について説明し、シアノバクテリアに保存された二成分制御系と先行研究による知見について述べ、全てのシアノバクテリアに保存される二成分制御系レスポンスレギュレーターRre1 の機能解明の意義を記述した。

第2章「Rre1 による転写制御機構の解明」では、Rre1 の支配下遺伝子の同定及び、その制御機構について述べている。まず、Rre1 の染色体上の結合領域を網羅的に同定する為に、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) とタイリングアレイを組み合わせた ChIP-タイリングアレイ解析を行い、高温下で Rre1 が染色体に結合することを見出し、その 15 領域を同定した。さらに、同定した 15 領域の下流に存在する遺伝子の転写産物量の変化についてノーザン解析を行い、10 遺伝子の転写産物が高温下で増加することを明らかにした。また、ヒスチジンキナーゼ Hik34 の遺伝子破壊株では、高温下における 10 遺伝子の転写産物量の増加が認められなかったことから、これら 10 遺伝子の転写産物量の増加は Hik34 を介したものであることを示している。次に Phos-tag を用いたウェスタン解析により、Rre1 は高温下において顕著にリン酸化レベルが上昇することを見出した。また、*hik34* 破壊株では高温下における Rre1 リン酸化レベルの上昇が起こらなかったことから、Rre1 は高温下において Hik34 によりリン酸化されることが明らかとなった。また、リン酸化状態を模倣するような変異を導入した

Rre1 (Rre1^{D58E}) を過剰発現し、Rre1^{D58E} により Rre1 支配下遺伝子の転写産物量が増加することを示している。これらの結果から、Rre1 支配下遺伝子の転写は Rre1 のリン酸化レベルに依存することを明らかにした。さらに、*rre1* 遺伝子 (Synpcc7942_1860) を別種のシアノバクテリアの *rre1* 遺伝子 (slr1783) に置換し、その影響について解析した。この置換株は通常培養条件下では Rre1 タンパク質発現量は低下しているものの、野生株と変わらない生育を示した。その一方で、置換株は高温感受性を示し、Rre1 リン酸化レベルの上昇も観察せず Rre1 支配下遺伝子も高温誘導を受けなかった。これらのことから Rre1 支配下遺伝子の正の制御は Rre1 にのみ依存することを明らかにした。最後にここまでの結果を総括し、高温下における Hik34-Rre1 システムのモデルを提案している。

第3章「Rre1-DNA 相互作用の解析」では、*in vitro* における Rre1^{D58E} タンパク質の DNA 結合活

性と Rre1 結合配列について述べている。まず、Rre1 結合領域をプローブとして、Rre1^{D58E} 精製タンパク質との相互作用を *in vitro* で確認した。その結果、Rre1 は 15 領域全てに結合活性を示した。さらに競合アッセイにより、これら結合が DNA 配列特異的であることを確認した。これらのことから、Rre1 はリン酸化に依存して配列特異的 DNA 結合活性を持つことを明らかにした。次に、Rre1 支配下遺伝子の *hspA* 遺伝子の転写開始点の同定と、*hspA*、*dnaK2*、*groESL-1*、*rpoD2* の Rre1 結合配列の解析を行い、その結果を述べている。プライマー伸長法により *hspA* の転写開始点を解析した結果、開始コドンの 33 bp 上流の一点のみから転写されることを見いだした。さらにゲルシフトアッセイにより *hspA*、*dnaK2*、*groESL-1*、*rpoD2* のそれぞれのプロモーター領域上流 20~30bp に Rre1 が結合することを明らかにした。最後に、これらの結果を総括し、共通した結合モチーフを提案し、そのモチーフが Rre1 結合領域に存在することを示した。

第 4 章では、様々な条件における Rre1 リン酸化状態の変化を、Phos-tag を用いたウェスタン解析により観察した結果を記述した。先行研究から Rre1 は強光、高塩濃度、高浸透圧ストレス応答に関与することが示唆されていた。解析の結果、これら 3 種のストレス全てで Rre1 リン酸化レベルは上昇した。また、*hik34* 遺伝子破壊株では強光における Rre1 リン酸化レベルの上昇は失われたが、高塩濃度、高浸透圧ストレスでは影響が見られなかった。このことから Rre1 は状況により Hik34 以外のヒスチジンキナーゼにもリン酸化されることが示唆された。また、明暗、暗明条件シフトにおいて、暗条件下でのみ Rre1 のリン酸化レベルは増加していた。これらのことから、Rre1 のリン酸化レベルの上昇は、光合成活性の低下によって引き起こされていると考察し、光合成阻害剤添加による Rre1 リン酸化状態の変化を解析した。その結果、3 種の光合成阻害剤 (DCMU、DBMIB、MV) の全てで Rre1 のリン酸化レベルの上昇が見られた。特に DBMIB で顕著に Rre1 がリン酸化されたことから、Rre1 はプラストキノールの還元状態を感知した 2 種類以上のヒスチジンキナーゼによってリン酸化されることが示唆された。これらの解析結果から、Rre1 のリン酸化に関わるヒスチジンキナーゼとその感知機構についての考察を記述した。

第 5 章「総合討論」では、各章で得られた結果を総括して、Rre1 の生理的意義とそれによる制御機構について議論し、Rre1 を介したシグナル伝達機構のモデルを提唱している。

以上を要するに、本論文は全てのシアノバクテリアに保存されるレスポンスレギュレーターの支配下遺伝子及びその制御機構を明らかにしたものであり、理学的に貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文を博士(理学)の学位論文として十分な価値があるものと認めた。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチポジトリ(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。