

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	単細胞紅藻における新規ゲノム改変技術の開発とそれを用いた窒素同化系調節タンパク質CmACRの機能解析
Title(English)	
著者(和文)	竹村時空
Author(English)	Tokiaki Takemura
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11396号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 寛,太田 啓之,下嶋 美恵,若林 憲一,今村 壮輔
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11396号, Conferred date:2020/3/26, 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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学) Academic Degree Requested Doctor of
学生氏名： Student's Name	竹村 時空		指導教員 (主)： 田中 寛 Academic Supervisor(main)
			指導教員 (副)： 今村 壮輔 Academic Supervisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

植物や藻類などの光合成真核生物にとって最も重要な栄養素の一つである窒素の同化経路は明らかにされつつあるが、関与する酵素の数が多いことや、同化経路が複雑であることなどが要因で、その制御機構は未解明な点が多く残されている。本研究では、光合成真核生物における窒素同化系の基本的な制御機構を解明するため、原始的で単純な細胞構造を持つ単細胞紅藻、*Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾン) をモデル系として研究を行った。窒素同化経路の制御系が最もよく理解されていると考えられる大腸菌の例にとると、主要な窒素栄養状態のセンサーとして GlnD タンパク質が下流のタンパク質を制御することで、無機態窒素であるアンモニウムイオンを有機態窒素であるグルタミンへと同化する反応を触媒するグルタミン合成酵素 (GS) を制御していることが知られている。本研究ではシゾンにおいて GlnD タンパク質が持つグルタミン結合ドメインと高い相同性を有する CmACR に注目し、窒素同化における調節機構について解析した。また、シゾンは研究材料としての利点を多く有するにも関わらず、形質転換実験は煩雑である上、形質転換実験において選択マーカー遺伝子が 2 種類しか報告されていないため、単一株に対する形質転換実験は限られた回数しか行うことができなかった。そこで、本研究を進める上で、シゾンの核ゲノムを改変する新たな技術の開発も併せて行った。

従来から、相同組換えを用いたシゾンの核ゲノムへの外来 DNA の導入は行われてきたが、シゾンの形質転換実験は煩雑であり、かつ選択マーカー遺伝子の数が限られていることなどから改善すべき点も多かった。そこで本研究では、まず、簡便かつ単一株に対して繰り返し形質転換を行える形質転換実験系の開発を行った。ウラシル合成系において必須な遺伝子である *URA5.3* が既に遺伝子選択マーカーとしてシゾンの形質転換実験に用いられていた。形質転換時には、*URA5.3* を欠失した株を宿主株とし、*URA5.3* を選択マーカーとして形質転換体の選抜を行う。また、*URA5.3* は 5-FOA を、細胞毒性を示す 5-FU に変換するため、*URA5.3* はポジティブ・ネガティブの両方向に選択を行うことができる。本研究では、この点に着目し *URA5.3* の再利用系が構築できると考えた。*URA5.3* の Terminator 配列に相当する 462 bp をリピート配列として *URA5.3* 遺伝子の両側に配置した改変型選択マーカー *URA5.3-T* を構築し、リピート配列同士で相同組換えが起きやすくすることで、5-FOA 存在下において *URA5.3* 遺伝子欠失株を選抜できるようにした。実際に、一旦 *URA5.3-T* を選択マーカーとして導入した形質転換体から、5-FOA 選択により *URA5.3* マーカーを欠失した株を選抜することに成功した。さらにその株を宿主株として再度 *URA5.3-T* を選択マーカーとして形質転換体を選抜し、再度 5-FOA 選択により *URA5.3* マーカーを欠失した株を選抜することに成功した。以上により、シゾンにおいて複数箇所の核ゲノムの改変を行うことを可能とした。

この技術を用いて CmACR 欠損株および過剰発現株などの CmACR 変異体を構築し、主要な窒素同化酵素である GS (細胞質局在) とグルタミン酸合成酵素 (GOGAT、葉緑体局在) の挙動に注目して解析を進めた。実験結果から、野生株では GS と GOGAT が葉緑体包膜を挟んで近傍に局在するが、CmACR 欠損株では GS と GOGAT がそれぞれ細胞質、葉緑体内に広がって局在することが明らかとなった。野生株における CmACR の局在も GS や GOGAT と同様に細胞質と葉緑体の境界付近であることから、CmACR は GS および GOGAT を近傍に局在させるはたらしめがあることが示された。さらに、CmACR 欠損株では、転写産物量が増加しているにも関わらず、GOGAT タンパク質量が減少していることが見出され、CmACR が GOGAT タンパク質の安定性の維持に寄与することが示唆された。CmACR 過剰発現株では GS 活性が上昇しており、GS の活性化にも寄与すると考えられる。さらに、生体内の実験系における免疫沈降実験からは、CmACR は GS および GOGAT と結合することが示された。細胞分画による局在解析の結果から、CmACR が細胞質と葉緑体の両方に存在することも示されたことから、CmACR は細胞質局在である GS と葉緑体局在である GOGAT の両者と相互作用し、それぞれを細胞質と葉緑体の境界付近に局在させることで、窒素同化において非常に重要な役割を担う GS/GOGAT サイクルを統合的に調節する役割を持つことが示された。

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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位(専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	竹村 時空		指導教員(主)： Academic Supervisor(main)	田中 寛	
			指導教員(副)： Academic Supervisor(sub)	今村 壮輔	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Cyanidioschyzon merolae is a primitive red alga living in sulfuric hot springs, whose complete genome sequences of the nucleus, chloroplast and mitochondrion were determined. While the nuclear genome can be modified by homologous recombination with exogenously introduced DNA, it has been difficult to modify multiple genes because of the limited number of selection markers. In this study, a method to recycle the selectable marker *URA5.3* for nuclear transformation was developed. The 3'-flanking sequence of the *URA5.3* open reading frame was duplicated and located in the 5'-upstream of the *URA5.3* gene, which made direct repeat sequences on both ends of the *URA5.3* gene. This marker construct significantly increased the frequency of spontaneous deletion of the *URA5.3* gene by homologous recombination, which can be selected by 5-fluoroorotate. Various mutants were constructed so far using this marker gene *URA5.3T*.

Plant and algae frequently encounter various environmental changes such as nutrient shortage. While nitrogen is one of the most important nutrients for their growth and its assimilation pathways have been extensively investigated in plants and algae, fundamental regulatory mechanisms of the nitrogen assimilation still remain elusive. To reveal these mechanisms, I focused on the *CmACR* gene found in the nuclear genome of *C. merolae* encoding a homolog of the *Escherichia coli* GlnD protein for the glutamine sensor. Mutants for *CmACR* including the knockout mutant were constructed using above mentioned newly constructed marker gene and analyzed. As the results, the CmACR protein was found to localize both in the cytosol and the plastid, activates the glutamine synthetase (GS) activity in the cytosol, and stabilizes the glutamate synthase (GOGAT) in the plastid. Immunolocalization analysis revealed that the cytosolic GS and the plastid GOGAT were found around the boundary between the cytosol and the plastid, both of which were dispersed in each respective compartment in the *CmACR* knockout mutant. Thus, CmACR is likely to function as a scaffold to localize GS and GOGAT in the proximity, and works as an integrator of nitrogen assimilation in *C. merolae*.

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).