

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	高等植物シロイヌナズナにおける緊縮応答因子ppGppの機能解析
Title(English)	
著者(和文)	井原雄太
Author(English)	Yuta Ihara
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10085号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:増田 真二,太田 啓之,久堀 徹,田中 寛,今村 壮輔,増田 建
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10085号, Conferred date:2016/3/26, 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

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	博士 (理学) Doctor of
学生氏名： Student's Name	井原 雄太		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	増田 真二
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	太田 啓之

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

植物において葉緑体は、光合成を行うオルガネラとしてだけでなく、脂質合成やタンパク質合成、色素合成などの場としての役割も担っている。そのため、葉緑体機能の制御は植物にとって必須と考えられる。葉緑体は祖先型シアノバクテリアが、ホストとなる真核生物に共生して生じたと考えられている(Yagi and Shiina, 2014)。また、祖先型シアノバクテリアに由来とすると考えられる遺伝子が、植物の核内に数多く見つかっている (Martin et al., 2002)。核にコードされた遺伝子の幾つかは、発現した後葉緑体に移行しそこで機能する。すなわち、葉緑体機能の制御は、核と葉緑体との協調的な情報交換によって達成されている。

緊縮応答はバクテリアに広く保存された遺伝子発現・代謝調節機構として知られている (Braeken et al., 2006, Janin et al., 2006)。緊縮応答は、特殊な核酸分子、グアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸 ppGpp が介在することによって引き起こされる反応で、細菌にとって必須の細胞機能制御機構である (Braeken et al., 2006)。バクテリアにおいて、ppGpp によって制御される生体機能は生物種によって大きく多様化していることが知られている。アミノ酸欠乏や鉄欠乏などの飢餓応答や孢子形成、宿主への感染などが例として挙げられる (Braeken et al., 2006)。

近年のゲノム解析の進展により、ppGpp の合成/分解酵素 (RelA 及び SpoT) のホモログ RelA/SpoT Homologs (RSHs)をコードする遺伝子が、植物や藻類のゲノムに保存されていることがわかってきた (van der Biezen et al., 2000, Givens et al., 2004)。また、ppGpp が植物細胞から検出されたことに加え (Takahashi et al., 2004)、ヒメツリガネゴケの RSH 変異体で生育に変化が起こることが明らかとなった (Sato et al., 2015)。以上のことから、植物における ppGpp を介した緊縮応答機構の存在が示唆されている。

高等植物であるシロイヌナズナからは、4つの RSH が見つかっている(van der Biezen et al., 2000, Mizusawa et al., 2008)。これらはすべて葉緑体移行シグナルを持ち、葉緑体で機能することが予想されている(Masuda et al., 2008, Mizusawa et al., 2008)。4つの RSH はそれぞれ RSH1, RSH2, RSH3, CRSH と名付けられており、このうち RSH2 と RSH3 は極めて相同性が高いことから (>~80%) パラログと考えられる。また、ppGpp の合成/分解に関わるドメインは、RSH の N 末端側に保存されており、RSH1 は ppGpp の分解能のみをもち (合成活性に必要な Gly 残基が保存されていない)、RSH2/RSH3 は ppGpp の合成能と分解能の両方を持つことが示唆されている(Masuda et al., 2008, Mizusawa et al., 2008)。CRSH はカルシウムイオン存在下で ppGpp の合成活性のみ持つことが知られている (Masuda et al., 2008)。以上のようなシロイヌナズナの RSH 間のドメイン構造の違いが、1) 植物全体に保存されているのか、2) シロイヌナズナ特有の違いなのか、3) いつ多様化したのか、については予測の域を出ず(Atkinson et al., 2011,

Masuda, 2012)、植物の *RSH* の由来についても議論は定まっていない。

これまでに、シロイヌナズナの *RSH3* 過剰発現体の解析が行われ、この変異体はペイルグリーン  
の表現型を示すことや、栄養欠乏への耐性が上昇することが分かった。しかしながら、植物細胞内の *ppGpp* を定量する系が完全には確立されておらず、*RSH3* の過剰発現によって見られる表現型と *ppGpp* の蓄積量との相関を調べることができていなかった。また、先に報告された *ppGpp* の定量法では、約 20 グラムという多量の植物サンプルを必要とするため、*ppGpp* 蓄積の時間変化や、組織別に蓄積量を調べるのが困難であった。

そのため本研究では、1) 遺伝子構造やアミノ酸配列を基にした植物型 *RSH* の系統解析、2) 質量分析計を用いた植物由来の *ppGpp* の新規定量法の確立、3) 確立した定量系を用いてシロイヌナズナの *RSH3* 過剰発現体や *ppGpp* を一過的に蓄積する組換え体の解析、を行った。

その結果、バクテリアの *RelA/SpoT* ホモログに保存されている TGS ドメインは、すべての植物種の *RSH1* ファミリーに保存されていることがわかった。またバクテリアの *RelA/SpoT* ホモログに見られる ACT ドメインは、シアノホラを除く藻類の *RSH1* ファミリーに保存されていた。このことから、*RSH1* は他の *RSH* に比し比較的バクテリアの *RelA/SpoT* ホモログに近い構造をしていることがわかった。また系統解析の結果から、植物の *RSH* はダイノコッカス・テルムス門を由来にすると考えられた。次に、固相抽出カラムの使用や pH を 9-10 に調整したジメチルヘキシルアミン水溶液を用いることで、LC-MS/MS による植物由来の *ppGpp* の定量を新鮮重約 0.1 g から可能にした。この測定系を用いることで、1) シロイヌナズナ葉緑体の *ppGpp* 最大濃度は約 3  $\mu\text{M}$  であること、2) *RSH3* 過剰発現体を示す表現型は *ppGpp* の高蓄積が根本的な原因であること、3) *ppGpp* が細胞質ゾル内で高蓄積すると生育遅延を引き起こすことが分かった。これらのことから、植物細胞が、ダイノコッカス・テルムス門始原菌から獲得した *RSH* を、共生したシアノバクテリア (すなわち葉緑体) の制御システムとして進化させてきた様子を示すと同時に、植物における *ppGpp* の生理作用を初めて明らかにすることができた。

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 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).

## 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 (理学)	Doctor of
学生氏名 : Student's Name	井原 雄太		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	増田 真二	
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	太田 啓之	

### 要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Stringent response is known as a bacterial regulatory system that modulates several processes such as transcription and translation (Braeken et al., 2006, Janin et al., 2006). This response is stimulated by Guanosine 5' -diphosphate 3' -diphosphate (ppGpp) and Guanosine 5' -triphosphate 3' -diphosphate (pppGpp), and induced under amino acid starvation for instance (Braeken et al., 2006).

Recently, RelA/SpoT Homologs (RSHs), which catalyze (p)ppGpp synthesis and hydrolysis, were identified in plants and algae (van der Biezen et al., 2000, Givens et al., 2004). Additionally, ppGpp was detected in plants, suggesting that stringent response exists in plants (Takahashi et al., 2004, Sato et al., 2015).

*Arabidopsis thaliana* has four *RSHs* that are encoded in nucleus (van der Biezen et al., 2000, Mizusawa et al., 2008). All of them have the chloroplast transit peptide, suggesting that they function in chloroplasts. Four *RSHs* are categorized into three families, *RSH1*, *RSH2/RSH3*, and Ca<sup>2+</sup>-activated *RSH* (*CRSH*) (Masuda 2012; Tozawa and Nomura 2011). *RSH1* catalyzes ppGpp hydrolysis and *CRSH* catalyzes ppGpp synthesis, whereas *RSH2* and *RSH3* catalyze ppGpp hydrolysis and synthesis. However, following questions are remained unclear; 1) whether differences observed between *RSHs* in *Arabidopsis* are conserved in plants? 2) are these differences specific in *Arabidopsis*?, and 3) when *RSHs* are varied? (Atkinson et al., 2011, Masuda, 2012)

Previously, *RSH3* overexpressor of *Arabidopsis* showed pale green and increase resistance for starvation (Maekawa 2015). However, quantification method of ppGpp from plants is not fully developed and it was difficult to investigate relationship between ppGpp accumulation and phenotype of *RSH3* overexpressor.

In this thesis, I achieved 1) Analysis of gene structure and amino acid sequence of *RSHs* in plant, 2) development of new quantification method of ppGpp derived from plants, and 3) physiological analysis of *Arabidopsis* mutants that accumulate ppGpp excessively.

Consequently, it was revealed that 1) *RSHs* in plants were expected to originate from *Deinococcus-Thermus*, 2) new quantification method of ppGpp derived from plants was established and calculated ppGpp concentration in chloroplasts at night was estimated to be ~3.0 μM, which is possible to inhibit GTPase, and 3) over accumulation of ppGpp in cytosol showed growth arrest in *Arabidopsis*. From these, it was revealed that physiological effect of ppGpp is exist in plants and showed evolution process of *RSHs* in plants as chloroplast regulation system.

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).