

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

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	井原 雄太
		氏 名	職 名	
論文審査 審査員	主査	増田 真二	准教授	今村 壮輔
	審査員	太田 啓之	教授	増田 建
		久堀 徹	教授	
		田中 寛	教授	

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「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」と題し、緊縮応答と呼ばれる細菌に普遍的に見られる細胞機能制御システムの植物における進化過程とその生理的重要性を初めて明らかにしたものである。

第 1 章では、本博士論文研究の背景を、これまでの緊縮応答研究の変遷と共に概説している。具体的には、1) 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おり葉緑体機能の制御は植物にとって必須と考えられること、2) 葉緑体は祖先型シアノバクテリアがホストとなる真核細胞に共生して生じたと考えられていること、3) 祖先型シアノバクテリアに由来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こと、4) 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こと、等から、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ことを指摘している。一方、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おり、この応答は、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こと、また、バクテリアにおいて、ppGpp によって制御される生体機能は細菌種によって大きく多様化していることを述べている。また、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り、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が、その起源や機能に関しては不明な点が多いことを述べている。

第 2 章では、植物型緊縮応答の起源を明らかにするべく行った RSH の系統解析結果を示している。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。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。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 は極めて相溶性が高いことから (>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。CRSH はカルシウムイオン依存的な ppGpp の合成活性のみを持つことが知られている。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、植物の RSH の由来についても議論は定まっていなかった。本章の解析によって、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を報告している。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、灰色藻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 *RSH1* はデイノコッカス・テルムス門を由来にすると考えられた。得られた結果から、RSH の起源は、植物細胞誕生の最初期である灰色藻類の時点ですでに獲得されており、その起源は、共生したシアノバクテリアではなく、デイノコッカス・テルムス門始原菌であったことを報告している。

第 3 章では、植物内 ppGpp 量の定量系の構築について報告している。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。またサンプル数が少ない組換え植物体の解析も行うことができていなかった。そこで質量分析計を用いた植物由来の ppGpp の新規定量法の確立を進めている。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、シロイヌナズナ葉緑体の ppGpp 濃度は夜間に一過的に上昇し、その最大濃度は約 3 μ M であることを明らかにしている。

第 4 章では、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結果を報告している。シロイヌナズナの *RSH3* 過剰発現体はペイルグリーン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ていた。しかしながら、*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。第 3 章で確立した方法により、この変異体の ppGpp 量を調べたところ、*RSH3* 過剰発現体は ppGpp の高蓄積が根本的な原因であることを明らかにしている。ppGpp を一過的に細胞質内に蓄積する組換え体を単離し、解析したところ、植物の成長が著しく阻害されることも明らかにしている。この結果を受け、ppGpp は葉緑体内だけでなく、細胞質内でも機能する可能性を議論している。

第 5 章では、得られた結果を総括し、植物型緊縮応答が、植物細胞の進化の歴史の中で果たしてきた役割を議論すると共に、ppGpp に依存した植物型緊縮応答の機能モデルを提案している。

以上を要するに、本論文は、植物細胞がデイノコッカス・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したものであり、理学上貢献するところが大きい。よって、本論文が博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

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。