

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	物質電子化学	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 (理学)
学生氏名： Student's Name	小林 一幾		指導教員 (主)： 田中 寛 Academic Advisor(main)
			指導教員 (副)： 今村 壮輔 Academic Advisor(sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

シアノバクテリアは、植物等と同様の酸素発生型光合成を行うグラム陰性細菌であり、葉緑体との共通祖先を持つといわれている。地球上の太陽光の届くあらゆる場所で見いだすことができ、環境適応能力に優れた生物であると考えられる。バクテリアの環境感知機構の一つである二成分制御系のうち、全てのシアノバクテリアに保存される二成分制御系因子は7つ (Hik2、Hik34、NblS、SasA、RpaA、RpaB、Rre1) 存在している。NblS-RpaB 及び SasA-RpaA はそれぞれ光合成、概日リズムに深く関わる事が報告されている。残る Rre1 に関してはその機能はほとんどが明らかになっていない。本研究では、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 *S. elongatus* を用いて Rre1 の機能を解明することを目的として、本博士論文研究を行った。

はじめに、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、高温下における Rre1 結合領域として、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うち、主要なシャペロン遺伝子を含む 10 遺伝子が高温下において転写産物量が増加した。二成分制御系はリン酸基の受け渡しにより、シグナルを伝達する。そこで、高温下における Rre1 リン酸化状態を検証した結果、Rre1 は高温下において顕著にリン酸化レベルが上昇していた。また、Rre1 のパートナーであることが示唆されていたヒスチジンキナーゼ Hik34 の遺伝子破壊株では、これら 10 遺伝子の高温ストレス応答及び、Rre1 リン酸化レベルの上昇が失われていた。これらの結果から、Rre1 は高温下において Hik34 によりリン酸化され、支配下遺伝子の転写を活性化させることが示唆された。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}) を過剰発現することにより、Rre1 支配下遺伝子の転写産物量が増加したことから、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が明らかになった。

さらに、本来の *rre1* 遺伝子 (Synpcc7942_1860) を別種のシアノバクテリアの *rre1* 遺伝子 (slr1783) に置換した株は、通常培養条件下では野生株と変わらない生育を示したが、高温下では高温感受性を示した。さらに、Rre1 リン酸化及び Rre1 支配下遺伝子高温ストレス応答も失われていた。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が明らかになった。

次に Rre1 の結合モチーフの探索を行った。in vitro のゲルシフトアッセイでは、Rre1^{D58E} 精製タンパク質は同定した 15 領域全てのプローブに対して単独で結合活性を示した。さらに競合アッセイにより Rre1^{D58E} は特異的に DNA に結合することが明らかとなった。これらの結果から、Rre1 はリン酸化に依存して、単独で、特異的に DNA に結合活性を持つことが明らかになった。さらに、Rre1 支配下遺伝子の *hspA* 遺伝子の転写開始点の同定と、*hspA*、*dnk2*、*groESL-1*、*rpoD2* の Rre1 結合配列の解析を行った。その結果、*hspA*、*dnk2*、*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。また、これらの領域には GTTCGG 繰り返し配列が共通して存在していた。

Rre1 がリン酸化される条件を探索する為に、様々な条件下における Rre1 リン酸化状態を検証した。解析の結果、強光、高塩濃度、高浸透圧ストレス、暗条件で Rre1 リン酸化レベルは上昇した。また、*hik34* 破壊株は、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 Hik34 を含む 2 種類以上のヒスチジンキナーゼによりリン酸化されることが示唆された。また、光合成阻害剤 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。

これらの結果から、Rre1 は様々なストレス下において主要なシャペロン群を制御するマスターレギュレーターであると考えられる。これまでにシアノバクテリアに一般的な熱ストレス応答機構は知られておらず、Hik34-Rre1 はシアノバクテリアの熱ストレス応答を司る普遍の機構として、初めての報告である。

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).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	物質電子化学	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	小林 一幾		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	田中 寛
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)	今村 壮輔

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Tens of two-component signal transducing modules, histidine kinases (HKs) and response regulators (RRs), are encoded by cyanobacterial genome in general, and responsible for acclimation to changing environments at the transcriptional level. While the number and composition of these modules are rather diverged among cyanobacteria, two RRs containing DNA binding domains, RpaB and Rrel, are found in all sequenced cyanobacterial genomes and were shown essential for viability. While RpaB is known to negatively or positively regulate high light and other stress-responsive gene expression, little has been known for Rrel, and we here investigated the Rrel direct regulatory targets in a cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) in combination with a high-density tiling array analysis identified Rrel binding sites on the chromosome, which includes promoter regions for chaperone genes such as *dnaK2*, *groESL1*, *groEL2*, *hspA* and *htpG* as well as the group 2 sigma factor gene *rpoD2*. *In vivo* and *in vitro* analyses revealed that Rrel phosphorylation level, DNA binding activity and adjacent gene transcriptions were increased in response to heat stress, and these responses were much diminished in a knock out mutant of Hik34, which is a previously suggested heat shock regulator. Taken together, we here identified Hik34-Rrel as the heat shock responsive signaling module directly regulating major chaperone and other genes in this cyanobacterium.

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).