

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	後生動物における内生ppGppの存在と機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	伊藤道俊
Author(English)	Doshun Ito
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11574号, 授与年月日:2020年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:増田 真二,太田 啓之,和地 正明,下嶋 美恵,鈴木 崇之
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11574号, Conferred date:2020/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

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 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	伊藤 道俊		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	増田 真二
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	

全ての生物は常に変動する環境に適応しなければならない。そのための仕組みの一つとして、緊縮応答と呼ばれる機構が存在する。緊縮応答はグアノシン 3', 5'-ビスピロリン酸またはグアノシン 5'-三リン酸 3'-二リン酸 ((p)ppGpp) によって制御される栄養・代謝応答であり、細菌の必須なストレス応答機構のひとつである。バクテリアがストレスにさらされると、ATP および GTP (または GTP) から (p)ppGpp が合成され、(p)ppGpp は転写や翻訳、代謝を制御することによってバクテリアの環境適応を促進する。

この (p)ppGpp および分解を制御するタンパク質は RelA・SpoT homologs (RSHs) と呼ばれている。近年この RSHs がヒトやマウス、ショウジョウバエといった後生動物にも保存されていることが確認され、それらは Metazoan SpoT homolog 1 (Mesh1) と命名された。Mesh1 は ppGpp の分解ドメインのみを持ち、その ppGpp 分解活性が試験管内および大腸菌内で確認されている。また、ショウジョウバエの *Mesh1* 変異体は飢餓条件下において生育の遅延が見られる。このことから、後生動物においても (p)ppGpp を介した緊縮応答の存在が示唆されていた。しかし、後生動物にはバクテリアの (p)ppGpp 合成酵素と相同性の高い遺伝子が保存されていない。また、これまで多くの研究者が ppGpp の検出を試みてきたものの、後生動物細胞における ppGpp の存在は確認されていない。これらのことから、後生動物細胞には ppGpp は存在しない、またはごく微量に存在していると考えられてきた。また最近、Mesh1 は細胞質における NADPH 脱リン酸化酵素として機能することが報告された。後生動物における ppGpp と Mesh1 の関係を議論するためには ppGpp の定量系を開発し、ppGpp 濃度が Mesh1 による制御を受けていることを示す必要があると考えられた。

そこで、本研究では、固相抽出による核酸精製と、超高速高分離液体クロマトグラフィー・質量分析計による検出系を組み合わせ、後生動物細胞からの高感度 ppGpp 定量系を開発を行った。その結果、ショウジョウバエとヒト培養細胞からの ppGpp 検出に成功し、後生動物細胞には内生 ppGpp が存在していることを明らかにした。この時の野生型のショウジョウバエ 3 令幼虫の ppGpp 濃度は約 65 nM であった。また、ショウジョウバエの *Mesh1* 変異体 3 令幼虫は、野生型の約 7 倍の濃度の ppGpp を蓄積しており、後生動物細胞における ppGpp 濃度が Mesh1 によって制御されていることが明らかとなった。

先に報告されていたように、*Mesh1* 変異体は飢餓条件下における発育に遅れが見られた。この表現型と ppGpp 量の関係性を明らかにするため、飢餓条件下における ppGpp を定量した。その結果、野生型の ppGpp 量は、通常条件と飢餓条件で生育させた場合でほとんど差がなく、*Mesh1 LOF* では、飢餓条件に晒すと ppGpp 濃度の上昇が解消され、野生型と同程度になっていた。

ppGpp の生理機能をさらに明らかにするため、枯草菌の ppGpp 合成酵素 YjbM を全身に過剰発現するショウジョウバエを作成した。この過剰発現体は、コントロール株の約 1200 倍もの ppGpp を蓄積し、成虫になる前の段階で致死性を示した。YjbM を眼のみで発現させたところ、眼や視神経の細胞死が誘導され、大過剰の ppGpp は細胞毒性を示すことが分かった。しかし、同様の表現型は *Mesh1* 変異体では確認されなかったことから、生物学的に意味のある表現型かどうかは明らかではない。

Mesh1 変異体および *Mesh1* 過剰発現体を用いてメタボローム解析を行ったところ、*Mesh1* 変異により、TCA 回路、トランススルフェーション経路、尿素回路などに代謝物量に変化することがわかった。一方で *Mesh1* 過剰体では、コントロール株に比べ、TCA 回路、尿素回路などに代謝物量の変化が見られた。特に *Mesh1* 変異体では、マレイン酸、フマル酸量が増大したのに対し、*Mesh1 GOF* では減少していたことから、*Mesh1* によって TCA 回路の機能が制御されていることが示唆された。

今回の研究により、後生動物にも ppGpp のシグナル伝達系が存在することが示唆されたが、検出されたショウジョウバエ幼虫の ppGpp 濃度はバクテリアと比較して低濃度であったことから、バクテリアとは異なる制御系を持つことが示唆された。バクテリアはストレスを受容すると大量の ppGpp を合成し、合成された ppGpp は直接ターゲットタンパク質に結合することで転写や翻訳、代謝の制御を行う。一方で、後生動物は ppGpp が結合するエフェクター分子を持ち、そのエフェクター分子がターゲットに作用することでシグナルを伝達していると考えられる。

ppGpp 分解における ppGpp に対する *Mesh1* の K_m 値は、NADPH 脱リン酸化活性における *Mesh1* の NADPH に対する K_m 値の約 20 倍であることから、細胞内の *Mesh1* は NADPH を主な基質にすると考えられる。実際、*Mesh1* ノックダウン体における NADPH 量は野生型の 1.3 倍と報告されている。しかし今回、*Mesh1* 変異体の幼虫における ppGpp 量は野生型の約 7 倍に増加しており、*Mesh1* は ppGpp の濃度調節に強い影響力を持っていた。これは ppGpp が局所的に高濃度になっている細胞や器官が存在することを示唆している。*Mesh1* が *in vivo* における ppGpp 分解酵素として機能していると明らかになったことは、後生動物における ppGpp の機能研究の発展にとって重要な意味を持つと考えられる。

本研究で開発された新たな ppGpp 定量系によって、動物細胞における ppGpp 定量が可能になった。この手法は、後生動物における ppGpp シグナル伝達系という新たな研究分野の開拓につながる。また、本研究によって数十年來の謎であった ppGpp とその代謝系が後生動物に保存されていることが明らかになった。今後、ppGpp の合成系や後生動物における機能が明らかになると期待される。