

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)	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 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)	

### 要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

グアノシン 3', 5'-ビスピロリン酸 (ppGpp) はバクテリアが外部環境にตอบสนองして自身の生理機能を適応する際に機能する必須のセカンドメッセンジャーの一種である。バクテリアがアミノ酸欠乏などのストレス条件にさらされたとき、RelA/SpoT homologs (RSHs) が ATP と GTP (または GDP) からこの特殊な核酸分子 ppGpp を合成し、転写や翻訳、代謝など細胞内の様々な反応の調節を行うことでストレス防御応答を促進する。この ppGpp 依存的な代謝調節のことを緊縮応答と呼び、アミノ酸欠乏などの栄養欠乏だけではなく、抗生物質耐性や宿主への感染などでも重要な働きをすることが報告されており、バクテリアの生存や繁殖に必須の因子となっている。近年、RSH のホモログが動植物を含む真核生物でも保存されていることが分かってきた。動物では Metazoan SpoT homologs 1 (Mesh1) が保存されている。Mesh1 は ppGpp 分解ドメインのみを持ち、in vitro における ppGpp 分解活性に加え、大腸菌内でも ppGpp 分解酵素として機能することが確認された。また、ショウジョウバエの飢餓条件下における生育に重要であることが明らかとなった。以上のことから、動物も内生の (p)ppGpp を合成していること、また、その濃度が Mesh1 依存的に調節されることで、環境応答を行っていることが示唆されている。しかし、動物にはバクテリアの RSHs と相同性のある ppGpp 合成酵素が保存されていないこと、また多くの研究者が試みてきたものの ppGpp の検出に成功した例がないことから、ppGpp や Mesh1 が動物においてどのように機能しているかについては長らく謎のままであった。

そこで、本研究では、後生動物における 内生 ppGpp の存在とその機能解明を目的として、後生動物における ppGpp 定量系の確立および、それを用いた ppGpp や Mesh1 の機能解析を行った。まず、当研究室で開発されていた植物の ppGpp 定量系を応用したところ、ショウジョウバエとヒト細胞からの ppGpp 検出に成功し、内生の ppGpp が動物細胞内に存在していることを見出した。Mesh1 変異体 (*Mesh1 LOF*) のショウジョウバエ 3 令幼虫における ppGpp 量は野生型の約 7 倍になっており、ショウジョウバエ体内の ppGpp 量は Mesh1 によって調節されていることが明らかになった。

Mesh1 の機能について明らかにするために、*Mesh1 LOF* を飢餓条件で生育する実験を行ったところ、*Mesh1 LOF* では、飢餓条件における蛹化に遅れが見られ、先行研究同様に飢餓条件における生育に異常が見られた。しかし、このときの ppGpp 量を定量すると、野生型の ppGpp 量は飢餓条件においても通常条件と変化がなく、*Mesh1 LOF* では通常条件でみられた過剰な ppGpp 蓄積がなくなり、野生型と同程度となっていた。

ppGpp 蓄積の影響を明らかにするため、枯草菌由来の ppGpp 合成酵素 YjbM を導入したショウジョウバエを作成したところ、コントロール株の 1200 倍の ppGpp を蓄積した。この株は致死性を示し、正常な発生をすることはできなかった。YjbM を眼特異的に発現させ、ppGpp の高濃度蓄積の影響をさらに解析したところ、眼や視神経の細胞死が確認された。このことから、大過剰の ppGpp は細胞毒性を示すことが示唆された。

*Mesh1 LOF* の代謝解析を行ったところ、TCA 回路、ペントースリン酸経路、グルタチオン代謝系などの代謝物量に変化が見られた。このことから、Mesh1 は動物細胞における恒常性の維持に重要な役割を持っており、その代謝系の制御に ppGpp が関与している可能性が示唆された。

最近、Mesh1 が NADPH 脱リン酸化酵素として機能することが報告された。そのことを踏まえると、Mesh1 は in vivo での ppGpp 分解活性および NADPH 脱リン酸化活性の両方を保持しており、Mesh1 変異体の表現型が、どちらの酵素活性の不全によるものであるかは決定することはできなかった。今後の研究により、動物細胞内ではどちらの酵素として機能しているのかについては詳細な検討が必要である。

以上、本研究により、動物細胞における ppGpp 定量が可能となり、後生動物の ppGpp シグナル伝達系という新たな研究分野が開拓された。また、動物細胞内での ppGpp の存在および in vivo での Mesh1 の ppGpp 分解能が証明され、後生動物が ppGpp 代謝系を持つことが示唆された。

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).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 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	伊藤 道俊		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	増田 真二	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Guanosine 3',5'-bisphosphate (ppGpp) is one of the essential second messenger for bacteria to accommodate its physiological condition to environment. If bacteria are faced to stress condition such as amino acid starvation, RelA/SpoT homologs (RSHs) synthesize ppGpp from ATP and GTP (or GDP), and ppGpp induce stress response by regulating various reaction such as transcription, translation, and metabolism. Recently, one of the RSHs was found in eukaryote and named as Metazoan SpoT homologs 1 (Mesh1). Mesh1 works ppGpp hydrolase *in vitro* and important for growth under starved condition. Thus, it was suggested that ppGpp was synthesized in metazoa and the concentration was regulated by Mesh1. However, the function of ppGpp and Mesh1 in metazoa has been still unknown because a ppGpp synthase which is homologous to bacterial RSHs is not conserved in metazoan and no researchers succeeded to detect ppGpp from metazoan cell.

Here, to elucidate the function of endogenous ppGpp in metazoan, we established the ppGpp quantification method for metazoa and analyzed the roles of ppGpp and Mesh1 by using the method. We succeeded to detect endogenous ppGpp from *Drosophila melanogaster* and human cells by using high performance liquid chromatography attached with mass spectrometry (LC-MS/MS). *Mesh1* mutant in *Drosophila* 3<sup>rd</sup> instar larvae accumulated about 7-fold higher ppGpp than wild type. Furthermore, ppGpp accumulation induced metabolic changes and lethality in *Drosophila*. These results suggested that endogenous ppGpp is synthesized in metazoan cell and the regulation of the concentration of ppGpp by Mesh1 is important for metazoan physiology.

Our research enabled to quantify ppGpp and provided the first evidence of the existence and ppGpp metabolic system in metazoan cells. This result should provide useful insights for future studies to understand about ppGpp function in metazoan cells.

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).