

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	シアノバクテリアSynechococcus elongatus PCC 7942の熱ショック応答と高温耐性の制御因子の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	長谷川葉月
Author(English)	Hazuki Hasegawa
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12337号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:田中 寛,久堀 徹,太田 啓之,和地 正明,増田 真二,吉田 啓亮
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12337号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

系・コース：	生命理工学	系
Department of, Graduate major in	生命理工学	コース
学生氏名：	長谷川 葉月	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	田中 寛	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：	吉田 啓亮	
Academic Supervisor(sub)		

要約

高温馴化と高温耐性は、生育環境における温度変化や高温を生き抜くために不可欠であり、すべての生物に保存されている。これらの機構には高度に保存された因子が存在する一方、生物種による固有の因子や制御メカニズムも関与していると考えられており、それらの十分な理解には至っていない。近年、地球温暖化による高温環境が、地球環境の維持に関わるさまざまな生物プロセスに悪影響を及ぼすことが懸念されている。光合成はその典型例であり、光合成生物における高温での生存・増殖メカニズムの解明は急務であると言える。そこで私は、酸素発生型光合成を行うシアノバクテリアの一種 <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 (以下、<i>S. elongatus</i>) を実験材料として、<i>S. elongatus</i> の高温順応と高温耐性の制御因子に関する機能解析を行い、その理解を目指した。具体的には、<i>S. elongatus</i> の高温馴化の制御、特に熱ショック応答に関与する 2 つのタンパク質の機能解析を行い、さらに高温での増殖に関与する 1 つの遺伝子を同定した。 熱ショック応答とは、高温に順応するために、急激な温度上昇直後にシャペロンなどの熱ショックタンパク質をコードする遺伝子群の一過的な発現が誘導される反応であり、高温馴化の初期段階と言える。当研究室の先行研究により、<i>S. elongatus</i> の熱ショック応答には二成分制御系 Hik2-Rre1 経路が関与していることが示されているが、その詳細な制御機構は未解明であった。当研究室では、シアノバクテリアにおいて、高度に保存された機能未知の遺伝子がゲノム上で <i>hik2</i> と head-to-head で隣り合うことを発見した。この遺伝子産物が主要シグマ因子 (RpoD1) と結合することから、<i>sinA</i> (Sigma Interacting Protein A) と命名した。<i>sinA</i> 欠損株が著しい高温感受性を示したことから、SinA が Hik2-Rre1 経路依存的な熱ショック応答に関与していると予想し、<i>sinA</i> 変異株を用いて解析を行った。その結果、SinA は確かに Hik2-Rre1 経路依存的な熱ショック応答における転写活性化を促進することが観察され、それによって高温馴化が促進されることが示唆された。さらに、SinA 欠損株では Rre1 の安定性が著しく上昇していたことから、<i>rre1</i> 過剰発現株を用いて温度依存的な増殖を観察した。その結果、<i>rre1</i> 過剰発現は通常培養温度 (30 °C) では増殖に影響を与えないものの、高温 (40 °C) では生育を阻害することが明らかとなった。したがって、高温馴化には SinA 依存的な Rre1 の量的制御が必要であり、SinA は高温馴化に必須な因子であることが示唆された。また、当研究室の先行研究により、<i>S. elongatus</i> における Hik2-Rre1 経路依存的な熱ショック応答転写は、熱ショック応答において新たに合成されるタンパク質によって抑制されることで、一過的であることが示唆されていた。しかし <i>S. elongatus</i> における熱ショック応答抑制因子は未同定であった。大腸菌などでは、Hsp70 型シャペロン (DnaK) が熱ショック応答の負の制御因子として知られていることから、<i>S. elongatus</i> に

における大腸菌 DnaK オルソログであり、Rre1 制御下遺伝子でもあるシャペロンの 1 種に着目した。その結果、この *dnaK* オルソログを過剰発現させると、熱ショック応答において、Rre1 リン酸化および Rre1 制御下の熱ショック応答遺伝子の発現が抑制された。また、光合成阻害剤である DBMIB 添加によっても Hik2-Rre1 経路が活性化されることがわかっていることから、この *dnaK* オルソログを過剰発現させた状態で DBMIB を添加したところ、熱ショック応答時と同様に、Rre1 リン酸化の抑制が観察された。したがって、この *dnaK* オルソログは Hik2-Rre1 経路活性化全般に抑制的に作用することが示唆された。一方、Rre1 制御下の別のシャペロンを過剰発現させると、熱ショック応答における Rre1 のリン酸化は抑制されないことがわかった。さらに、*in silico* 解析により、Hik2 とこの DnaK オルソログの相互作用が示唆された。したがって、*S. elongatus* において、この DnaK オルソログは、Hik2 との相互作用を介して、Hik2-Rre1 依存性転写の特異的な負のフィードバック制御因子であると考えられる。以上より、*S. elongatus* では、SinA 依存的な熱ショック応答遺伝子の発現促進と Rre1 の量的制御によって高温馴化が誘導され、DnaK オルソログ依存的な負のフィードバックによって熱ショック応答が抑制されるというモデルを提唱した。

当研究室で維持していた *S. elongatus* の保存株の中から、著しい高温感受性を示す変異株（以下、H1 株）を見出した。そこで、その高温感受性株で変異した原因遺伝子の特定を目指した。そして H1 株の全ゲノム解析の結果、tRNA-Leu(CAA)をコードする synpcc7942_R0040 の 1 塩基置換（G60T）を H1 の高温感受性を引き起こす変異として特定した。tRNA の二次構造予測から、この変異が、tRNA-Leu(CAA)の t-arm の長さを 5 塩基対から 4 塩基対に減少させていることが示された。H1 株に t-arm が 5 塩基対の tRNA-Leu(CAA)をコードする野生型遺伝子コピーを追加的に導入すると、H1 株の高温での増殖が回復した。興味深いことに、H1 株に t-arm が 4 塩基対の tRNA-Leu(CAA)をコードする変異型遺伝子コピーを導入しても、H1 株の高温での増殖がある程度回復した。さらに、H1 株の高温感受性が抑制された抑圧変異株を単離し、その全ゲノム解析から synpcc7942_1640 の欠損変異を抑圧変異として特定した。synpcc7942_1640 は機能未知遺伝子であるが、NYN ドメインを持つことから *nynA* と命名した。NYN ドメインは、tRNA/rRNA の分解に関与していると考えられている。そのため、H1 株において、t-arm が 4 塩基の tRNA-Leu(CAA)は高温で不安定であり、NynA によって分解されることで機能的な tRNA-Leu(CAA)が量的に不足し、翻訳が阻害される結果として増殖が阻害されることが示唆された。これにより *S. elongatus* の高温での生育には、tRNA-Leu の構造安定性が重要であることがわかった。以上より、本論文では、酸素発生型光合成細菌シアノバクテリア *S. elongatus* における熱ショック応答の制御モデルと、高温耐性における tRNA の重要性について論じた。