

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14694

研究課題名(和文)動物型緊縮応答研究の幕開け

研究課題名(英文)The stringent response in animals

研究代表者

増田 真二(Masuda, Shinji)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで植物の解析に特化していたLC-MS/MSを用いたppGpp定量系を、ショウジョウバエ由来のサンプル解析を行えるように前処理を含め条件検討を詳細に行った。その結果、一定程度のppGppがショウジョウバエから検出されることを示唆する結果を得た。また、枯草菌由来のppGpp合成酵素Yjbmをショウジョウバエ中で発現させることに成功した。表現型解析から、ショウジョウバエ中にppGppが過剰蓄積すると、致死性を引き起こす可能性のあることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We previously established the quantification method for detecting ppGpp in plant tissues by use of LC-MS/MS technology. Here, we re-established the method to detect ppGpp in other organisms. As a results, we could detect some ppGpp not in plant tissues, but also algae and other organisms. We also try to express a bacterial ppGpp synthase in animal cells. We succeeded to obtain recombinant organisms that express the ppGpp synthase in different tissues. We found that over-production of ppGpp in the organisms results in significant behavioral responses in the organisms. This suggest that ppGpp-dependent stringent response could, at least, be operated in animals.

研究分野：分子生物学

キーワード：緊縮応答 栄養応答 ppGpp ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

緊縮応答は、栄養飢餓応答のシステムとして大腸菌を用いた研究により約 50 年前に発見された。その後の研究により、この応答は、栄養飢餓だけでなく、病原性/抗生物質耐性/バイオフィーム形成/光合成など多彩な機能を調節する細菌に普遍的なシステムであることがわかり、現在も活発に研究が行われている。

近年のゲノム解析の進展により、緊縮応答で中心的な働きをする核酸分子 ppGpp の合成と分解を担う酵素遺伝子が、植物や後生動物から発見された。一方、後生動物から見つかった遺伝子は、ppGpp の分解ドメインだけからなる小型のものであり、それ以外に ppGpp に関連した遺伝子(例えば ppGpp 合成酵素遺伝子)は見つかっていない。また、50 年来、様々な手法により動物細胞からの ppGpp 検出が試みられてきたが、成功した報告はこれまでになかった。これらのことから、動物細胞においては、バクテリア様の緊縮応答は存在しないと考えられてきた。

我々はこれまで、植物や光合成細菌を研究材料に、緊縮応答が光合成の調節や葉緑体の代謝にどのように関与するのかを調べてきた。その過程で、これまでの HPLC を用いた ppGpp 定量系に比し、数千倍の高感度で ppGpp を植物組織から定量できる系を構築した。LC-MS/MS を用いたこの方法により、ショウジョウバエからの ppGpp 検出を試みたところ、その存在の可能性を示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで研究代表者らが得た LC-MS/MS による ppGpp 定量結果を受け、動物に ppGpp が存在するのかを決定づけることを目標に研究を進めた。

3. 研究の方法

研究材料に、遺伝学的解析ツールが豊富なショウジョウバエを用いる。これまでに開発した LC-MS/MS を用いた方法は、植物由来のサンプルの解析に特化していた。そこで分析前のサンプルの前処理を含め、これまでの方法を、ショウジョウバエ由来のサンプル解析用に再度最適化を図った。

次に、細菌由来の ppGpp 合成酵素 YjbM をショウジョウバエ中で発現させ、ppGpp を過剰に作らせた。このハエ中の ppGpp を定量することで、上記 ppGpp 解析法の正しさを検証できると考えられる。また表現型を精査することで、ショウジョウバエにおける ppGpp の機能を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

研究代表者らは、LC-ESI-MS/MS を用いた ppGpp 高感度定量系を駆使し、動物細胞からの ppGpp の検出を試みるとともに、後生動物を用いて緊縮応答の存在を実証することを目的に研究を進めている。これまでに、ショウジョウバエの幼虫・さなぎ・成虫の各ステージにおいて一定量の ppGp が存在する可能性を示すデータを得た。また、同様の測定法により、酵母も一定量の ppGpp を持つ可能性のあることがわかった。

通常細菌内の ppGpp 量は栄養欠乏条件下において上昇することが知られている。ショウジョウバエでも同様なことが起こるのかを明らかにする目的で、ショウジョウバエを低栄養条件において同様の定量実験を行なった。しかしこれまでのところ、ショウジョウバエを低栄養条件においても ppGpp が高蓄積するデータは得られていない。このことから、ショウジョウバエ中の ppGpp は栄養条件に応じて変化することはないと考えられた。

ショウジョウバエ中で ppGpp を過剰に作らせた際の表現型を精査することで、ショウジョウバエにおける ppGpp の機能を明らか

にすることを試みた。枯草菌の ppGpp 合成酵素 YjbM 遺伝子を転写因子 Gal4 の制御領域 UAS の下流に接続し、そのベクターを、ゲノム中の特定のランディングサイトへ挿入した。この組換えショウジョウバエを、様々な組織で Gal4 を発現するショウジョウバエと掛け合わせることで、ppGpp を局所的に高蓄積するショウジョウバエを作出することができる。まず Gal4 を恒常的に発現するショウジョウバエを掛け合わせたところ、その子孫は全て胚性致死となりうる可能性を示唆する結果を得た。このことから ppGpp は動物細胞内で機能しうると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1) Shimizu, T., Shen, J., Fang, M., Zhang, Y., Hori, K., Trinidad, J.C., Bauer, C.E., Giedroc, D.P. and Masuda, S. (2017) The sulfide-responsive transcriptional repressor SqrR functions as a master regulator of sulfide-dependent photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 2355-2360. DOI: 10.1073/pnas.1614133114 (査読有)

2) Ito, D., Ihara, Y., Nishihara, H. and Masuda, S. (2017) Phylogenetic analysis of proteins involved in the stringent response in plant cells. *J. Plant Res.* 130: 625-634. DOI: 10.1007/s10265-017-0922-8. (査読有)

3) Sugimoto, Y., Nakamura, H., Ren, S., Hori, K. and Masuda, S. (2017) Genetics of the blue-light-dependent signal cascade that controls phototaxis in the

cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 58: 458-465. DOI: 10.1093/pcp/pcw218. (査読有)

4) Sato, R., Kono, M., Harada, K., Ohta, H., Takaichi, S. and Masuda, S. (2017) Fluctuating-Light-Acclimation Protein1, conserved in oxygenic phototrophs, regulates H⁺ homeostasis and non-photochemical quenching in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 58: 1622-1630. DOI: 10.1093/pcp/pcx110. (査読有)

5) Kawashima, R., Sato, R., Harada, K. and Masuda, S. (2017) Relative contributions of PGR5- and NDH-dependent photosystem I cyclic electron flow in the generation of a proton gradient in Arabidopsis chloroplasts. *Planta* 246: 1045-1050. DOI: 10.1007/s00425-017-2761-1. (査読有)

6) Honoki, R., Ono, S., Oikawa, A., Saito, K. and Masuda, S. (2017) Significance of accumulation of the alarmone (p)ppGpp in chloroplasts for controlling photosynthesis and metabolite balance during nitrogen starvation in Arabidopsis. *Photosyn. Res.* 135: 299-308. DOI: 10.1007/s11120-017-0402-y. (査読有)

[学会発表](計 12 件)

1) 伊藤道俊、宮崎寛之、松井彩、増田真二 (2016) 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の緊縮応答の解析。第 7 回日本光合成学会 5/27-5/28 東京理科大学葛飾キャンパス

2) 清水隆之、Shen, J., Giedroc, D.P., Bauer C.E., 増田真二 (2016) 初期型光合成電子伝達の制御に関する硫化水素応答性

転写因子の分子機構 第7回日本光合成学会 5/27-5/28 東京理科大学葛飾キャンパス

3) 佐藤諒一、河野優、太田啓之、高市真一、寺島一郎、増田真二(2016) Light Accimation Protein の関与する強光順化メカニズムの解析 5/27-5/28 東京理科大学葛飾キャンパス

4) 清水隆之、増田真二(2017) 初期型光合成電子伝達の硫化水素依存的な制御に関する転写因子 SqrR に結合するテトラピロール環の生理的役割 第58回日本植物生理学会 3/16-3/18 鹿児島大学

5) 佐藤諒一、有菌昴駿、原田喬平、増田真二(2017) シロイヌナズナ Day Length-dependended delayed greening1 (DLDG1) は非光化学的消光に関する 第58回日本植物生理学会 3/16-3/18 鹿児島大学

6) 川島凜也、佐藤諒一、中野雅裕、永井健治、増田真二(2017) プロトン濃度勾配の形成における光合成循環的電子伝達の寄与に関する in vivo 解析 第58回日本植物生理学会 3/16-3/18 鹿児島大学

7) 伊藤道俊、宮崎寛之、松井彩、増田真二(2017) 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における緊縮応答因子 ppGpp の機能解析 第58回日本植物生理学会 3/16-3/18 鹿児島大学

8) 小野すみれ、増田真二(2018) *Arabidopsis thaliana* におけるカルシウム依存型緊縮応答因子 CRSH の機能解析 第59回日本植物生理学会 3/28-3/30 札幌コンベンションセンター

9) 伊藤道俊、増田真二(2018) 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における新規緊縮応答遺伝子の機能解析 第59回日本植物生理学会 3/28-3/30 札幌コンベンションセンター

10) Masuda, S. and Sato, R. (2016) LIGHT ACCLIMATION PROTEIN1, conserved in oxygenic phototrophs, regulates ion homeostasis and non-photochemical quenching induction in chloroplasts. Light Harvesting Satellite Meeting of the 17th International Congress on Photosynthesis Research(国際学会) 8/4-8/7 Egmond aan Zee, The Netherlands

11) Sato, R., Kono, M., Ohta, H., Takaichi, S. and Masuda, S. (2017) A novel chloroplast membrane protein, conserved in oxygenic phototrophs, regulates ion homeostasis and non-photochemical quenching induction. The 17th International Congress on Photosynthesis Research(国際学会) :8/7-8/12 Maastricht, Netherlands

12) Shimizu, T., Shen, J., Giedroc, D.P., Bauer, C.E. and Masuda, S. (2017) Identification of the sulfide-responsive transcriptional factor SqrR regulating ancestral photosynthesis in purple bacteria. The 17th International Congress on Photosynthesis Research(国際学会) :8/7-8/12 Maastricht, Netherlands.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

増田 真二（MASUDA Shinji）

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：30373369

(2)研究分担者

鈴木 崇之（SUZUKI Takashi）

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：60612760

(3)連携研究者

なし

研究者番号：

(4)研究協力者

なし