

氏 名	小山 陽亮
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	博理工甲第 860 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	単細胞性紅藻 <i>Cyanidioschyzon merolae</i> の核及び色素体ゲノムにコードされたタンパク質輸送因子 SecA の機能
論文審査委員	委員長 准教授 原 弘志 委員 教授 松本 幸次 委員 教授 大西 純一 委員 教授 金子 康子

論文の内容の要旨

SecA は、タンパク質膜透過装置 Sec translocase の主要構成因子の一つであり、細菌における細胞外タンパク質分泌経路及び植物細胞における葉緑体チラコイド内腔への膜透過経路に保存されている。これらの経路において SecA は、ATP 加水分解反応と膜透過反応とを共役させる駆動因子として機能している。遺伝子が同定されて以来、ほとんどの細菌と植物は *secA* 遺伝子を 1 コピーのみコードすると考えられてきた。しかし近年、一部の細菌（mycobacteria, listeria, corynebacteria など）ゲノム上に 2 つの *secA* 相同遺伝子が同定された。これらの細菌における 2 つの SecA は、機能的に分化していることが分かってきた。特に、第二の SecA (SecA2) を介する accessory Sec system は、mycobacteria の病原性獲得に必要な膜透過システムであり、生育必須の SecA (SecA1) とは異なる基質タンパク質を分泌していることから、近年注目されている。一方、植物細胞において 2 つの *secA* 遺伝子の機能に焦点を当てた研究成果は、*Arabidopsis thaliana* を除いてほとんど報告されていない。

様々な植物のゲノムが解読されたことで、*A. thaliana* 以外にも 2 つの *secA* 相同遺伝子をコードする植物がいることが分かってきた。その一つが、高温高酸性環境下で生息する単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (和名：イデユコゴメ) である。*A. thaliana* の 2 つ *secA* 相同遺伝子は共に細胞核ゲノムにコードされていたが、興味深いことに、*C. merolae* がコードする 2 つの *secA* 相同遺伝子は核ゲノムと色素体（葉緑体）ゲノムの各々にコードされていた。本研究は、*C. merolae* の核ゲノムにコードされた *secA* 遺伝子 (Genome project ID, CMQ393C, *secA*(nuc)) と色素体ゲノムにコードされた遺伝子 (Genome project ID, CMV071C, *secA*(pt)) の機能及び生理的意義を解明することを目的とする。

C. merolae がコードする 2 つの *secA* 相同遺伝子は転写されていることから、偽遺伝子ではなく、何らかの機能を有していると考えられる。SecA(nuc) の N 末端には transit peptide と思われる配列が存在し、この配列を融合した GFP はタマネギ表皮細胞内でプラスチド局在性を示した。この結果から、*C. merolae* 細胞内で SecA(nuc) は葉緑体に局在していると考えられる。系統解析を行ったところ、これら 2 つの SecA

は系統学的に近縁ではないことが分かった。Mycobacteria や listeria において、SecA1 と SecA2 も系統学的に近縁ではなかったことから、*C. merolae* において 2 つの SecA が何らかの異なった機能を有する可能性が示唆された。大腸菌組換えタンパク質として 2 つの SecA タンパク質を発現・精製し、それらの ATPase 活性を測定した。その結果、2 つの SecA において ATPase 活性の温度依存性が明確に異なっていることが分かった。SecA(pt) は比較的低温環境下 (30 ~ 40℃) で高い活性を示したのに対し、SecA(nuc) は高温環境下 (40 ~ 60℃) でより高い活性を示した。

以上の結果から、*C. merolae* がもつ 2 つの SecA は有意に機能する『温度』が異なっていると考えられ、特に SecA(nuc) は高温環境下での膜透過反応に必要なのではないかと考えられた (発表論文 1)。

SecA(nuc)・SecA(pt) 各々に特異的に存在する配列をエピトープとする抗体を作製した。これらの抗体を用いて発現解析を行ったところ、SecA(nuc) の発現量は高温環境へのシフトアップにより約 4 倍に増加することが分かった。一方、SecA(pt) の発現量の増加は 2 倍以下であり、温度による変動は比較的小さいことが分かった。細胞内量比を算出した結果、低温環境下 (30℃) では SecA(nuc) : SecA(pt) \doteq 1 : 1 であったが、高温環境下 (40, 50℃) では SecA(nuc) : SecA(pt) \doteq 2.5 : 1 であった。免疫蛍光法及び免疫電子顕微鏡法により、*C. merolae* において 2 つの SecA が葉緑体に存在していることを明らかにした。ドット状の蛍光及び金粒子の集合が確認できたことから、SecA(nuc) と SecA(pt) は葉緑体内でクラスターを形成することが示唆された。さらに、高温環境下でのチラコイド膜の増加も確認した。以上の結果から、高温環境下でのチラコイド膜透過反応において SecA(nuc) が重要な役割を担っていることが示唆された (発表論文 2)。

本研究成果から、*C. merolae* の SecA(nuc) は高温環境下での、SecA(pt) は低温環境下での膜透過反応により重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、特に高温環境下での SecA(nuc) の役割に注目し、温度環境への適応戦略という観点から 2 つの SecA をもつ生理的意義を考察している。

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 24 年 2 月 8 日に公開で開催し、論文内容の発表と質疑応答の後、審査委員の意見交換を行ない、論文内容を審査した。以下に研究概要と審査結果を要約する。

SecA タンパク質は、タンパク質膜透過装置 Sec translocase の主要構成因子の一つとして、ATP 加水分解と膜透過反応を共役させる駆動因子として機能しており、細菌における細胞外タンパク質分泌経路・植物細胞における葉緑体チラコイド内腔への膜透過経路に保存されている。細菌と植物は *secA* 遺伝子を 1 コピーのみコードすると考えられてきたが、近年、一部の細菌（mycobacteria, listeria, corynebacteria など）ではゲノム上に 2 つの *secA* 相同遺伝子が同定され、2 つの SecA が機能的に分化している例があることが分かってきた。Mycobacteria や listeria では第二の SecA（SecA2）を介する accessory Sec system は、病原性獲得に必要な膜透過システムであり、生育に必須である SecA（SecA1）とは異なる基質タンパク質を分泌している。

さまざまな植物のゲノムが解読されたことで、2 つの *secA* 相同遺伝子をコードする植物もあることが分かってきたが、その機能に焦点を当てた研究成果は、ごく最近になって *Arabidopsis thaliana* について報告された例を除いて、ほとんど報告されていない。

本論文で研究対象とする *Cyanidioschyzon merolae*（和名イデユコゴメ）は、高温高酸性環境下で生息する単細胞性紅藻である。*A.thaliana* の 2 つ *secA* 相同遺伝子はともに細胞核ゲノムにコードされているが、興味深いことに、*C. merolae* がコードする 2 つの *secA* 相同遺伝子は核ゲノムと色素体（葉緑体）ゲノムの各々にコードされている。本論文は、*C. merolae* の核ゲノムにコードされた *secA* 遺伝子（Genome project ID: CMQ393C; *secA*(nuc)）と色素体ゲノムにコードされた遺伝子（Genome project ID: CMV071C; *secA*(pt)）の機能と生理的意義を解明することを目的としている。

序論では、Sec translocase について概説し、*C. merolae* の 2 つの *secA* 遺伝子がともに転写されていて偽遺伝子ではないこと、明暗周期下ではともに明期に強く発現していることなど、学位申請者が研究を開始する時点で知られていた情報を紹介している。

第 1 章では、2 つの SecA タンパク質のアミノ酸配列を解析して、SecA タンパク質一般に特徴的なドメイン構造が保存されていること、さらに系統解析にもとづいて、これら 2 つの SecA が系統学的に近縁ではないことを示している。Mycobacteria や listeria において異なる機能をもつ SecA1 と SecA2 も系統学的に近縁ではなかった。*C. merolae* において 2 つの SecA が何らかの異なった機能を有する可能性を示唆すると考えられる。

第 2 章では、SecA(nuc) タンパク質どうし、SecA(pt) タンパク質どうし、さらに両タンパク質の間で相互作用があることを pull-down assay で示している。SecA タンパク質の機能に重要とされている二量体形成を反映するものと考えられる。次に、SecA(nuc) タンパク質・SecA(pt) タンパク質を大腸菌細胞で発現させて精製し、ATPase 活性を検出し、ATPase に保存されている WalkerA・B モチーフに人為的に変異を導入すると ATPase 活性が失われることを確認している。さらに、2 つの SecA の ATPase 活性の温度依存性が明確に異なっていることを発見している。SecA(pt) は比較的低温 (30 ~ 40℃) で高い活性を示したのに対し、SecA(nuc) は高温 (40 ~ 60℃) で高い活性を示した。

第3章では、SecA(nuc)・SecA(pt)それぞれに特異的に存在するアミノ酸配列をエピトープとした抗体を作成し、発現量を解析している。SecA(nuc)の発現量は高温へのシフトアップにより約4倍に増加した一方、SecA(pt)の発現量の増加は2倍以下であること、細胞内量比は、低温（30℃）ではSecA(nuc):SecA(pt) \simeq 1:1であったが、高温（40, 50℃）ではその比は2.5:1であることを明らかにしている。

第4章では、SecA(pt)は勿論のこと、SecA(nuc)も葉緑体に局在することを確認している。まず、まずSecA(nuc)のN末端の色素体移行のための transit peptide と思われる配列に緑色蛍光タンパク質（GFP）を融合したものをコードする遺伝子をタマネギ表皮細胞で発現させると、色素体局在性を示した。次に、免疫蛍光法・免疫電子顕微鏡法により、両SecAが葉緑体に局在していることを明らかにし、クラスターを形成している可能性を指摘した。

本論文は、*C. merolae*の2つのSecAタンパク質について、SecA(nuc)は高温環境下で、SecA(pt)は低温環境下で重要な役割を果たしていると考えられることを示し、特に高温環境下でのSecA(nuc)の役割に注目して、温度環境への適応戦略という観点から2つのSecAをもつ生理的意義を考察しており、博士論文として十分な内容を有すると判定した。

学位申請者は、本論文の成果にもとづいて、筆頭著者として国際誌に2報の発表を行なっている。

以上のことから、当審査委員会は、本論文を博士（理学）の学位を授与するに値するものと判断し、合格とした。