

京都大学	博士（工 学）	氏名	山浦昂大
論文題目	Regulation of chromosome structure and survival mechanism at high temperature in <i>Thermococcus kodakarensis</i> (<i>Thermococcus kodakarensis</i> における染色体構造制御と高温適応機構)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> における Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) による染色体構造制御機構および Reverse gyrase (Rgy) による高温適応機構の解明を目指したものであり、その構成は序論、本編 4 章、結論から成る。 序論では、SMC 複合体の分類、SMC による真核生物、バクテリアおよびアーキアの染色体構造制御モデル、DNA トポロジー、DNA トポイソメラーゼの分類、Rgy の機能について現状の理解と未解決の問題、および本論文の意義等がまとめられている。 第 1 章では、<i>T. kodakarensis</i> において SMC 依存的に形成される 2 つの染色体ドメイン構造の一方の境界 (バウンダリー1) を解析した。バウンダリー1 結合タンパク質が SMC に対するバリケードタンパク質として機能すると考え、バウンダリー1 結合タンパク質を探索した。そこで、バウンダリー1 結合タンパク質として TrmBL2 および TK0795 を同定した。<i>trmBL2</i> および TK0795 破壊株に対しゲノム構造解析手法である 3C-seq を行うと、TK0795 破壊株ではバウンダリー1 が維持されていたのに対し、<i>trmBL2</i> 破壊株ではバウンダリー1 が完全に消失した。したがって、TrmBL2 がバウンダリー1 形成因子であることが明らかとなった。TrmBL2 が SMC による DNA ループ押し出し反応を止めることでバウンダリー1 が形成されるとしたら、両タンパク質はバウンダリー1 に共局在しているはずである。これを検証するためにゲノム上の標的タンパク質結合領域を検出できる手法である ChIP-seq を行った。その結果、SMC と TrmBL2 はバウンダリー1 で共局在していることが分かったが、バウンダリー1 以外の領域でも共局在していた。さらに、<i>trmBL2</i> 破壊株ではゲノム上の SMC 結合ピークが消失したため、TrmBL2 が SMC の進行を止めることが示唆された。SMC と TrmBL2 の共局在領域の特徴を調べると、バウンダリー1 は他の共局在領域よりも A トラクト配列を多く含んでいた。A トラクト配列は屈曲しにくいことが知られている。さらに、TrmBL2 はフィラメント状に DNA に結合し剛直な構造を形成することができる。これらの知見から、バウンダリー1 領域は潜在的に曲がりにくく、そこに TrmBL2 が結合することで非常に剛直な構造が形成され、SMC の DNA ループ押し出しがバウンダリー1 で完全に停止しドメイン境界が形成されるというモデルを提唱した。 第 2 章では、<i>T. kodakarensis</i> 染色体ドメイン構造のもう片方の境界 (バウンダリー2) を解析した。バウンダリー2 はキチン代謝関連遺伝子クラスター上に位置していた。このクラスターには type II toxin-antitoxin である VapB および VapC ホモログが含まれていた。VapBC 複合体は自身のプロモーター配列に結合し、その発現を抑制することが知られている。これらの知見から、「VapB および VapC が複合体としてバウンダリー2 に結合し、SMC の DNA ループ押し出し反応を止めることでバウンダリー2 構造形成に寄与する」という仮説を立てた。これを検証するために、<i>vapB</i> および <i>vapC</i> の単独および二重破壊株に対し 3C-seq を行った。その結果、どの破壊株でもバウンダリー2 構造が弱まり、VapB および VapC がバウンダリー2 形成に寄与することが示唆された。また、<i>vapBC</i> 二重破壊株において <i>vapBC</i> 遺伝子をプラスミド上で発現させた相補株ではバウンダリー2 構造が親株と同等にまで回復した。したがって、VapBC が直接バウンダリー2 形成に関与すると考えられる。さらに、ChIP-seq の結果、<i>vapBC</i> 二重破壊株ではバウンダリー2 の SMC 結合ピークが消失した。以上の結果から、バウンダリー2 に結合した VapBC が SMC の進行を止めることでバウンダリー2 構造が形成されると考えられる。			

京都大学	博士（工 学）	氏名	山浦昂大
第3章では、Rgy がどのように超好熱菌の高温適応に寄与しているのかを解明する糸口を掴むために、Rgy がゲノム高次構造にどう影響するのかという観点から解析を行った。3C-seq 解析により、至適生育温度（85℃）で培養した <i>rgy</i> 破壊株では 100 kb 以内の近位の DNA-DNA 間相互作用頻度が減少したことが分かったが、この変化は軽微であった。続いて高温ストレス（95℃）を与えた条件で 3C-seq を行くと、<i>rgy</i> 破壊株では AT リッチ領域同士が強く相互作用しクラスター構造を形成した。したがって、Rgy が高温下で起こる AT リッチ領域のクラスター構造を抑制することが示唆された。次に、AT リッチ領域のクラスター化が Rgy による正の超らせん導入反応の欠失に由来するかを検証するために、Rgy の触媒残基変異株を作製した。この変異株は <i>rgy</i> 破壊株と同様に 95℃ で増殖できなかった。また、触媒残基変異株に対し 3C-seq を行くと、<i>rgy</i> 破壊株と同様に 85℃ では 100 kb 以内の DNA-DNA 間相互作用頻度が減少し、95℃ では AT リッチ領域がクラスター構造を形成した。以上より、Rgy の正の超らせん導入反応は超好熱菌の高温適応に必須であり、高温ストレス下で起こる AT リッチ領域のクラスター構造形成を抑制することが示唆された。 第4章では、<i>rgy</i> 破壊株で見られた AT リッチ領域のクラスター構造が、AT リッチ領域の熱変性によって引き起こされている可能性を検証した。一本鎖 DNA 結合タンパク質である Replication Protein A (RPA) に対する ChIP-seq を行い、間接的にゲノム上の一本鎖領域を検出した。その結果、高温ストレス下の Rgy 破壊株では RPA が AT リッチ領域に蓄積していた。これは AT リッチ領域が一本鎖に変性していることを示唆する。次に、RPA に対して 3C-seq と ChIP-seq を組み合わせた手法である HiChIP を実施することで実際に RPA 結合領域同士が相互作用するのかを調べたところ、RPA 結合領域のクラスター化シグナルが検出された。これらの結果から、高温下の Rgy 破壊株では AT リッチ領域が熱変性し、そこに RPA が蓄積することで RPA-一本鎖 DNA 複合体同士が相互作用してクラスター化することが示唆された。この RPA 依存的なクラスター化領域を Heat Induced Clustering Region (HICR) と名付けた。次に、HICR のクラスター化が RPA 依存的に形成されるのかを検証した。Rgy と RPA サブユニットである Rpa14 との二重破壊株に対し 3C-seq を実施すると、<i>rgy-rpa14</i> 二重破壊株では <i>rgy</i> 破壊株よりも HICR 間の相互作用頻度が低下した。これは RPA が HICR クラスター形成に関与することを示唆する。次に、<i>rgy</i> および <i>rpa14</i> の単独および二重破壊株に熱ショックを与え、その生存率を比較した。その結果、熱ショック後に <i>rpa14</i> 破壊株の生存率に変化はなかったが、<i>rgy</i> 破壊株の生存率は低下し、<i>rgy-rpa14</i> 二重破壊株の生存率は <i>rgy</i> 破壊株よりも低下した。<i>rgy-rpa14</i> 二重破壊株が <i>rgy</i> 破壊株よりも高い高温感受性を示したため、RPA が Rgy 非存在下で超好熱菌の熱耐性に寄与することが示唆された。以上より、Rgy は正の超らせん導入反応を介して AT リッチ領域の熱変性を未然に防ぐことで超好熱菌の高温適応に寄与するというモデルを提唱した。また、<i>rgy</i> 破壊株における RPA による HICR クラスター構造形成はゲノムの熱耐性に貢献している可能性がある。 結論では、本論文で得られた成果について要約している。			