

氏 名 加 藤 大 和

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第98号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 ラン藻の鉄輸送機構の研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 大隅 良典  
教授 村田 紀夫  
教授 長谷部 光泰  
教授 小川 晃男 (名古屋大学)

## 論文内容の要旨

鉄は生体に必須の元素であり地球上で豊富に存在するが、その化学的性質のため生物は常に十分な鉄を利用できるわけではない。そこで生物は様々な方法で微量の鉄を有効に利用し、また鉄欠乏条件下でも生存できるようにその形態や生理を変化させる能力を発達させてきた。光合成微生物の鉄欠乏ストレスに対する応答機構は古くから研究されてきたが、鉄輸送体遺伝子の同定はされていなかった。本研究はゲノムの全塩基配列が決定された単細胞性ラン藻 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 を用いて、逆遺伝学的手法により光合成微生物において初めて鉄輸送体遺伝子を同定し、また PCC 6803 の鉄輸送機構を分子レベルで解析したものである。

### 1. *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 の輸送体遺伝子の機能解析

推定アミノ酸配列内に ATP 結合モチーフを持つ 32 個の輸送体遺伝子に着目し、各遺伝子の破壊株を作製してそれらの表現型の解析を試みた。種々の栄養素欠乏培地上での生育実験の結果から、*sll1878* (*futC*) を含む 4 つの遺伝子について機能を推定することができた。特に  $\Delta$  *sll1878* 株は鉄欠乏培地上で生育が非常に抑えられたことから、この株を用いて野生株と三価鉄の輸送活性を比較したところ、明らかに三価鉄輸送活性が低下していた。以上の結果から *sll1878* (*futC*) が ABC 型の三価鉄輸送体の ATP 結合タンパク質サブユニットをコードしているであろうと考えられた。野生株において細胞を鉄欠乏処理することにより三価鉄の輸送活性が上昇することも示された。また、PCC 6803 の三価鉄輸送において光は必要でないことが示された。

### 2. *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 の鉄輸送体遺伝子と鉄輸送機構

本ラン藻には、非光合成生物で同定された鉄輸送体の相同体遺伝子が多数存在する。PCC 6803 の鉄輸送機構においてこれら相同体遺伝子がどのような役割を持っているか解析するために、各遺伝子の破壊株を作製して、細胞の生育特性と鉄輸送活性を調べた。第 2 章で得られた  $\Delta$  *sll1878* ( $\Delta$  *futC*; M1) 株と同様な生育特性及び鉄輸送活性を示した変異株は、 $\Delta$  *slr0327* (*futB*; M2)、 $\Delta$  *sll1878*  $\Delta$  *slr0327* ( $\Delta$  *futC*  $\Delta$  *futB*; M5)、 $\Delta$  *slr1295*  $\Delta$  *slr0513* ( $\Delta$  *futA1*  $\Delta$  *futA2*; M6) であった。この結果と推定アミノ酸配列の解析結果から、これら 4 つの遺伝子が単一の三価鉄輸送体をコードしていると推定された。また、 $\Delta$  *slr1392* (*feoB*; M10) 株は、生育特性は野生株と同じだがアスコルビン酸で化学的に還元した二価鉄の輸送活性が明らかに低下していることが示された。したがって PCC 6803 は二価鉄輸送体を持っており、*slr1392* (*feoB*) が膜貫通領域と ABC 領域を持つサブユニットをコードしていることが示された。また、*ssr2333* が *slr1392* (*feoB*) と共転写されることから、*E. coli* の *feoA* 遺伝子の相同体であろうと考えられた。これらの結果と RT-PCR 法による mRNA 発現パターンの解析から、本ラン藻は三価鉄輸送体 (Fut 輸送体) に加えて二価鉄輸送体 (Feo 輸送体) を持ち、Fut 輸送体は通常の BG-11 培地上で発現し、鉄欠乏ストレスによって発現量が増加すること、また Feo 輸送体は鉄欠乏ストレスに応答して発現することが示された。さらに ATP 合成阻害剤を用いた実験から、どちらの鉄輸送体も ATP 加水分解エネルギーを必要とする ABC 型輸送体であることが示された。また、各種金属による輸送活性阻害実験から両輸送体はそれぞれ三価鉄あるいは二価鉄に対する親和性が高いことが示された。

### 3. 鉄輸送体タンパク質 FutA1 の鉄結合活性の解析

細菌の ABC 型輸送体は一般に基質結合タンパク質を必要とする。推定アミノ酸配列から *futA1/A2* が Fut 輸送体の鉄結合タンパク質サブユニットをコードすると推定された。そこで、リコンビナント FutA1 タンパク質 (rFutA1) を作製して分光学的手法により FutA1 の鉄結合活性を解析した。溶液中で鉄と結合した rFutA1 は波長 453 nm に吸収のピークを持つスペクトルを示し、鉄イオンと rFutA1 タンパク質がモル比 1 : 1 で結合することが示された。rFutA1 の鉄に対する結合定数はクエン酸を競合剤として用いた実験条件下でおよそ  $1 \times 10^{19}$  程度と見積もられた。アミノ酸一次配列の比較から FutA1 および FutA2 は *H. influenzae* の鉄結合タンパク質 HitA とよく似た機構で鉄イオンを配位することが推定された。これらの結果から Fut 輸送体は Hit/Fbp ファミリーに属する高親和性のフリー鉄イオン輸送体であることが明らかになった。

培地中のクエン酸は細胞の鉄輸送活性および生育に複雑な影響を与えることが示された。これは PCC 6803 の鉄輸送機構において Fut 及び Feo 輸送体以外の他の因子の関与を示唆するものであり、更なる解析が必要とされた。

## 論文の審査結果の要旨

鉄は生体に必須の元素であり地球上で豊富に存在するが、その化学的性質のため生物は常に鉄欠乏環境下に置かれている。生物はこのような条件下でも生存できるように鉄輸送機構を発達させてきた。申請者はゲノムの全塩基配列が決定されたラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、光合成生物としては初めて鉄輸送体の同定と機能解析を行った。論文は次の4章から構成されている。

第1章：緒論 さまざまな種類の生物からの多様な ABC 型輸送体の機能、構造、遺伝子発現の調節、生理学的役割および鉄イオン輸送体研究の現状について詳細に記述した上で、本研究の目的を述べている。

第2章： *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 の輸送体遺伝子の機能解析

推定アミノ酸配列内に ATP 結合モチーフを持つ 32 個の輸送体遺伝子についての遺伝子破壊株のうち、 $\Delta sll1878$  株は鉄欠乏培地上で生育が非常に抑えられ、また、 $Fe^{3+}$ 輸送活性が低下している事を見出した。これらの結果、 $sll1878$  ( $futC$ ) が ABC 型の  $Fe^{3+}$ 輸送体の ATP 結合タンパク質サブユニットをコードしている事を明らかにした。

第3章： *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 の鉄輸送体遺伝子と鉄輸送機構

*Synechocystis* 6803 ゲノム中に存在する非光合成生物で同定された鉄輸送体の相同体遺伝子の破壊株を作製して、細胞の生育特性と鉄輸送活性を調べた。その結果  $\Delta slr0327$  ( $futB$ ; M2)、 $\Delta sll1878 \Delta slr0327$  ( $\Delta futC \Delta futB$ ; M5)、 $\Delta slr1295 \Delta slr0513$  ( $\Delta futA1 \Delta futA2$ ; M6) が  $\Delta sll1878$  ( $\Delta futC$ ; M1) 株と同様な生育特性及び鉄輸送活性を示す事を明らかにした。また、 $\Delta slr1392$  ( $feoB$ ; M10) 株の  $Fe^{2+}$ 輸送活性が低下していることが示された。さらに、 $ssr2333$  が  $slr1392$  ( $feoB$ ) と共転写されることから、*E. coli* の  $feoA$  遺伝子の相同体であろうと考えられた。これらの結果と RT-PCR 法による mRNA 発現パターンの解析から、本ラン藻は  $Fe^{3+}$ 輸送体 (Fut 輸送体) に加えて  $Fe^{2+}$ 輸送体 (Feo 輸送体) を持ち、どちらの鉄輸送体も ATP 加水分解エネルギーを必要とする ABC 型輸送体であることが示された。

第4章：鉄輸送体タンパク質 FutA1 の鉄結合活性の解析

推定アミノ酸配列から  $futA1/A2$  が Fut 輸送体の鉄結合タンパク質サブユニットをコードすると推定された。そこで、リコンビナント FutA1 タンパク質 (rFutA1) を作製して分光学的手法により FutA1 の鉄結合活性を解析し、鉄イオンと rFutA1 タンパク質がモル比 1:1 で結合することが示された。アミノ酸一次配列の比較から FutA1 および FutA2 は *H. influenzae* の鉄結合タンパク質 HitA とよく似た機構で鉄イオンを配位することが推定された。これらの結果から Fut 輸送体は Hit/Fbp ファミリーに属する高親和性のフリー鉄イオン輸送体であることが明らかにされた。

なお、以上の研究成果のうち第2章と第3章の内容はそれぞれ *J. Bacteriol.* 誌に、また、第4章の内容は *Plant & Cell Physiol.* 誌に掲載された。

本研究は、光合成生物からはじめて  $\text{Fe}^{3+}$  輸送体と  $\text{Fe}^{2+}$  輸送体を同定し、それらの機能を解析したものであり、ラン藻における鉄イオン取込みについて極めて重要な知見を与えるのみならず、高等植物の鉄輸送体のホモログの機能を解明する上で有用な情報を提供している。したがって、学位論文として十分な内容を有すると判断し、合格と判定した。

審査委員会は、専門領域と関連領域に関する口述試験を行った。その結果、審査員は一致して、加藤大和の研究内容、専門分野に関する知識と理解が学位取得の条件を十分にみたすものと判断した。

英語に関しては、数遍の英語原著論文を發表しており、博士として十分な能力を備えていると判断した。