

氏名	中木原 江利
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第3929号
学位授与の日付	平成21年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	ラン藻 <i>Oscillatoria brevis</i> の <b>bxal</b> 遺伝子と <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の <b>sec19</b> 遺伝子の重金属耐性機構における機能解析
論文審査委員	准教授 江崎 文一 教授 積木 久明 准教授 中島 進

### 学位論文内容の要旨

本研究では、(I)糸状体ラン藻*Oscillatoria brevis*の重金属トランスポーター (CPx-ATPase) である**bxal**遺伝子と (II) *Saccharomyces cerevisiae*の小胞輸送関連遺伝子**sec19**の重金属耐性における役割についての研究を行った。

(I) まず、**Bxal**の重金属ストレス下での機能解析を大腸菌と酵母の形質転換体を用いて行った。大腸菌の**bxal**株はAg, Cd, Zn等の重金属に対して耐性を示したのに対し、酵母の**bxal**株はこれらに感受性であった。大腸菌の結果から、**Bxal**が確かに重金属耐性に関与している蛋白質であることが明らかとなった。一方、酵母では**Bxal**蛋白質は細胞内で核周辺のERと思われる場所に局在していた。ERに**Bxal**が局在するために、ER内に重金属を取り込み、蓄積することで重金属感受性になることが示唆された。

次に、**Bxal**のN末端領域の重金属ストレスに対する役割を明らかにするために、35個のアミノ酸部分を欠損させた**Δ35bxal**を作製し、Ag, Cu, Cd, Zn等の重金属感受性試験を行った。その結果、大腸菌の**Δ35bxal**株は**bxal**株よりも、どの重金属に対しても感受性になり、酵母の**Δ35bxal**株は、**bxal**株よりも耐性を示した。さらに酵母細胞内で**Δ35Bxal**は**Bxal**と同様にERに局在していたことも合わせて考えると、N末の35個のアミノ酸は、1価及び2価の重金属耐性に重要であることが明らかとなった。コントロール株 (pYES2株)、**bxal**株、**Δ35bxal**株を用いたinflux-efflux実験の結果も、このことを示唆していた。これまでにN末領域の重金属耐性における役割については、他のCPx-ATPaseでも研究されているが、今回の研究で初めて1価と2価両種の重金属イオン耐性に関与することが明らかになった。

さらに、**Bxal**のN末領域の重金属選択性について解析を行った。これまでN末領域のCys<sub>11</sub>-Cys<sub>12</sub>配列が1価の重金属、Hisリッチな領域が2価の重金属の選択に関与していると予想されてきた。そこで**Δ10bxal**、**Δ12bxal**を持つ大腸菌の形質転換体を作製し、重金属感受性を調べた。**bxal**、**Δ10bxal**、**Δ12bxal**株の間に1価、2価両種の重金属に対する感受性の差はなかったことから、N末のCys-Cys配列とHisリッチ領域は1価及び2価の重金属選択性には関与しないことが明らかとなった。

(II) 酵母のエキソサイトーシスに関与している**Sec19**と重金属耐性との関連についても研究を行った。**sec19<sup>+</sup>**株は、**sec19**株よりもAgとZnに対して耐性であった。一方、CuとCdに対しては**sec19<sup>+</sup>**株の方が、**sec19**株よりも感受性であった。これらの結果から、**sec19**が酵母の重金属耐性や感受性に関与していることが判明した。**sec19<sup>+</sup>**株と**sec19**株を用いて、influx-efflux実験を行ったところ、Ag, Cu, Cdの細胞内influx、efflux量に2株の間で違いはなかったが、Znの場合は**sec19<sup>+</sup>**株のZnのinflux、efflux量は、共に**sec19**株よりも多く、**sec19<sup>+</sup>**株では細胞外へのより多くのZnの排出が認められた。Zn特異的色素であるZinquinを用いてZnの細胞内動態を観察したところ、**sec19<sup>+</sup>**株では、細胞膜付近のZinquinで染色された小胞粒子が、速く消失するのに対し、**sec19**株の場合は**sec19<sup>+</sup>**株よりも遅かった。これらの結果から、酵母では**Sec19**の関連する小胞輸送系でもZnを排出し、細胞にZn耐性をもたらすことが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本研究では、(I)糸状体ラン藻 *Oscillatoria brevis* の重金属トランスポーター (CPx-ATPase) である *bxal* 遺伝子と (II) *Saccharomyces cerevisiae* の小胞輸送関連遺伝子 *sec19* の重金属耐性における役割についての研究を行った。

(I)まず、**Bxa1** の重金属ストレス下での機能解析を大腸菌や酵母の形質転換体を用いて行った。大腸菌の感受性試験の結果は、**Bxa1** が重金属耐性に関与することを示した。しかし酵母の場合には、これと全く逆の結果となった。これは酵母では **Bxa1** 蛋白質が細胞膜ではなく、核周辺の ER に局在することから ER 内に重金属を取り込み、蓄積させてしまうことで重金属感受性になるためと思われた。

次に、**Bxa1** の N 末端領域の重金属ストレスに対する役割を明らかにするために、N 末領域 35 個のアミノ酸を欠損させた大腸菌や酵母の  $\Delta 35bxal$  株を作製して解析した。その結果、この領域が 1 価と 2 価両種の幅広い重金属イオン耐性に重要であることが初めて明らかになった。さらに、**Bxa1** の N 末領域の重金属選択性について  $\Delta 10bxal$ 、 $\Delta 12bxal$  を持つ大腸菌の形質転換体を作製して解析した。その結果、N 末の Cys-Cys 配列と His リッチ領域は 1 価及び 2 価の重金属選択性には関与しないことが明らかとなった。

(II)酵母のエキソサイトーシスに関与している **Sec19** と重金属耐性との関連についても研究を行った。*sec19<sup>+</sup>*株と *sec19<sup>-</sup>*株を用いた重金属感受性試験や influx-efflux 実験結果から、**Sec19** 蛋白質を介した小胞輸送系が Zn の細胞外排出に関連していることが示唆された。さらに Zn 特異的色素である Zinquin を用いた Zn 処理した酵母での小胞の細胞内動態観察をおこなったところ、両株の間でその移動速度に違いが見られた。

これらの研究内容は、学位を与えるための要点を満たしていると思われたので、博士 (農学) を与えることに合と議決した。