

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学研究科
専攻 Division	農生命科学専攻
学生番号 Student No.	77D22602
氏名 Name	岡田 航輝

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

珪藻のシリカ被殻形成およびヒザラガイの磁鉄鉱歯形成に関わるタンパク質の機能解析

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

バイオミネラリゼーションは、生物が鉱物を形成する反応のことであり、形成された鉱物はバイオミネラルと呼ばれる。バイオミネラルの代表例として、貝殻、脊椎動物の歯や骨、海綿の骨格、植物のプラントオパール、磁性細菌のナノ磁石などが挙げられる。一般にバイオミネラルは、無機物と微量の有機物から成る無機-有機複合材料である。バイオミネラル中の有機物は、バイオミネラリゼーションの過程で、元素の濃縮、結晶核の生成、結晶成長の制御等に関与していると考えられている。その中でもこれまでに、複数のバイオミネラル形成関連タンパク質が同定され、その機能が明らかにされている。特に、貝殻や脊椎動物の歯や骨を対象とした研究により、炭酸カルシウムやリン酸カルシウムの形成を制御するタンパク質が多く報告されている。一方で、地殻において豊富な元素であり、機能性材料の原料として長い間利用されてきたケイ素や鉄をベースとするバイオミネラル形成を制御するタンパク質の報告例は少ない。特に、真核生物における酸化鉄鉱物形成の分子メカニズムは未解明である。本研究では、珪藻のシリカ被殻とヒザラガイ類の磁鉄鉱歯の2種類のバイオミネラルに着目し、シリカ被殻形成関連タンパク質の機能解析を目的とした珪藻の遺伝子組換え技術の確立と、ヒザラガイ類に保存された磁鉄鉱歯形成関連タンパク質の同定及び機能解析を行った。

第2章では、シリカ被殻形成関連タンパク質の機能解析を目指した *Nitzschia* 属珪藻の形質転換系の確立を行った。シリカを主成分とした珪藻の被殻は、種特異的な微細構造を持ち、ナノテクノロジー分野での応用が期待されている。現在、珪藻の被殻形成機構に関する研究は、小型のモデル珪藻 *Thalassiosira pseudonana* を中心に行われているが、詳細な機構の解明には至っていない。当研究室では、細胞分裂速度が緩やかな中型の珪藻を用いて、被殻の形成過程を詳細に観察することで、被殻形成機構の解明を目指しており、環境中に最も多く生息する中型の *Nitzschia* 属珪藻を対象に解析を行っている。本研究では、*Nitzschia* 属珪藻を対象に、研究の基盤技術となる形質転換系の確立を試みた。*Nitzschia* 属珪藻由来のプロモーター下流に、薬剤耐性遺伝子 (*nat*) 及び GFP 遺伝子 (*gfp*) を組み込んだ DNA 断片を、エレクトロポレーション法を用いて、環境中から新たに分離した珪藻 *Nitzschia* sp. NIES-4635 株に導入した。また、*gfp* を発現させるプロモーターを検討した。検討したプロモーターは、珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* 由来の *fcpA* プロモーター、珪藻 *Chaetoceros lorenzianus* に感染するウイルス由来のプロモーター CIP4、及びその 3'側領域 (CIP4 3'region) の3種類である。形質転換の結果、薬剤

氏名 Name	岡田 航輝
------------	-------

耐性を示し、明瞭な GFP 蛍光を有するクローンの獲得に成功し、珪藻 *Nitzschia* sp. NIES-4635 株の形質転換系を確立できた。形質転換効率は最大 365 transformed colonies/ 10^8 cells だった。また、CIP4 3' region 制御下で発現させた GFP 蛍光が最も強かった。本研究で確立された形質転換系は、*Nitzschia* 属珪藻を用いた被殻形成関連タンパク質の機能解析への利用が期待される。

第 3 章では、ヒザラガイ類が形成する磁鉄鉱歯形成関連タンパク質の機能解析を行った。ヒザラガイ類は歯舌と呼ばれる摂餌器官を持ち、その歯の歯冠部に酸化鉄の一種である磁鉄鉱を沈着させる。先行研究において、ヒザラガイ類の一種であるオオバンヒザラガイ *Cryptochiton stelleri* を対象に実験が行われ、磁鉄鉱の沈着した歯冠部に特異的に含まれ、磁鉄鉱形成への関与が示唆される 22 個の歯冠部特異的タンパク質が同定された。22 個の歯冠部特異的タンパク質のうちの 1 つである歯舌歯マトリックスタンパク質 1 (RTMP1) は、既知のタンパク質に相同性を示さない新規タンパク質であった。そこで本研究では、この RTMP1 の機能を明らかにすることを目的として実験を行った。まず、新たに 3 種のヒザラガイ類歯舌の比較トランスクリプトーム解析を行い、RTMP1 のホモログが他のヒザラガイ類でも保存されていることを示した。免疫蛍光染色法による RTMP1 の局在解析の結果、RTMP1 は、歯に鉄が沈着する以前に、歯の周囲の上皮細胞で高発現し、鉄が沈着する部位にあらかじめ局在することが明らかとなった。また、*in vitro* での機能解析の結果、組換え RTMP1 断片の存在下において酸化鉄が形成される事が確認された。以上の結果より、ヒザラガイ類で保存された RTMP1 は歯への酸化鉄の沈着に重要な役割を果たしていることが示された。本研究は、ヒザラガイ類に保存された磁鉄鉱歯形成関連タンパク質の機能を初めて明らかにし、ヒザラガイ類の磁鉄鉱歯形成機構に新たな知見を与えた。またこの知見は、環境に優しい磁鉄鉱合成法の開発につながることを期待される。