

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20780073
 研究課題名(和文) 真核生物におけるモリブデン膜輸送システムの研究
 研究課題名(英文) Analysis of mutants and genes related to eukaryotic molybdenum transport.
 研究代表者
 中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)
 名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
 研究者番号： 60362290

研究成果の概要(和文)：モデル酵母 *Hansenula polymorpha* およびモデル植物シロイヌナズナを用いて、真核生物の細胞レベルのモリブデン吸収、排出に関わる膜輸送システムを解析した。吸収に関わる膜輸送体には高速型、高親和性型、誘導性と異なるタイプの膜輸送装置の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated influx and efflux transport system of molybdenum in eukaryotic cells using a model yeast *Hansenula polymorpha* and a model plant *Arabidopsis thaliana*. Three different type molybdenum influx transporter were suggested such as high capacity, high affinity and inducible transporters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：モリブデン、膜輸送

1. 研究開始当初の背景

ほぼ全ての生物にとって、モリブデン(Mo)は極々微量必要であるが、欠乏あるいは過剰に摂取すると生命活動に害が及ぶ超微量必須元素の一つである。植物の場合、モリブデン欠乏土壌では、作物や果樹の生育不良が起こる。逆に、過剰土壌で生育した植物が体内にモリブデンを高濃度に蓄積すると、これを摂取した家畜がモリブデン中毒を起こすことが知られている。

モリブデン(Mo)は遷移金属であり、 $2+$ ～ $6+$ の酸化状態をとりうることから、いくつかの酸化還元酵素の活性中心として働き、電子伝達反応を担う。このようなモリブデン酵素は、元素の結合様式から次の二種類に大別される。ニトロゲナーゼなど、活性中心にモリブデン-鉄クラスターをもつ酵素、キサンチンオキシダーゼなど、モリブデンとモリブドプテリンが結合したモリブデン補酵素を活性中心とする酵素である。植物の窒素同化

の中心的役割を果たす硝酸還元酵素は、後者の代表例である。

では、生物はどのようにしてモリブデンを外界から取り込み、細胞内で利用しているのだろうか？生体膜でモリブデンの吸収に関わる分子装置に目を向けると、大腸菌やらん藻などの原核生物で研究が先行しており、ABC 輸送体（高親和性吸収）や非特異的アニオン輸送体（低親和性吸収）が、細胞内モリブデン濃度の調節に関与することが報告されている (Self WT, 2001, Res Microbiol)。これに対し、動物、植物、菌類などを含む真核生物のモリブデン膜輸送システムの実態は全く不明である。既知の真核生物ゲノムには、原核生物モリブデン輸送体のオルソログが見出されていない上に、モリブデン輸送機能を担う別の分子装置も同定されていない。

ヒトを含む真核生物共通の必須元素であるにもかかわらず、モリブデンに関する研究が少ない理由として、技術的な困難が挙げられる。通常、モリブデンは水溶液中ではモリブデン酸 (MoO_4^{2-}) として存在するが、生体含有量が $1 \mu\text{M}$ 以下の超微量成分でありかつ、適当な検出指示薬や扱いやすい放射性同位体が存在しないため、定量的解析が非常に難しい。近年、ICP-AES や ICP-MS などの特殊分析機器を用いた測定法が開発され、生物試料に適用されるようになったが、生きた細胞内のモリブデン濃度を測定する方法は存在しなかった。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、研究代表者が新たに開発した蛍光分子プローブを活用して、分子遺伝学的手法によりモリブデン膜輸送システムの概要解明と、輸送体遺伝子の同定を目指した。

蛍光分子プローブは、天然に存在する、モリブデン酸に依存して 2 量体化するモリブデン結合蛋白質を、青色蛍光蛋白質 (CFP)、黄色蛍光蛋白質 (YFP) と遺伝子工学により融合させたもので (図 1)、モリブデン酸濃度依存的に蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET) が生じて蛍光スペクトルが変化する。作製したプローブ分子は極めて特異的かつ高感度で、*in vitro* 実験では 2 nM 以上のモリブデン酸を定量測定できた (図 2)。また、大腸菌やパン酵母を発現ベクターで形質転換することで、細胞質モリブデン酸濃度の推定も可能であった。

(2) この蛍光分子プローブを用いて、モリブデン要求性の単細胞真核生物である、ハン

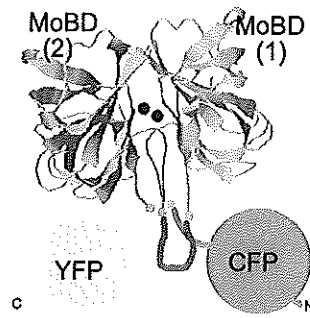


図1 蛍光分子プローブの模式図
モリブデン酸(●)結合で MoBD が二量化し、CFP と YFP 間の FRET 効率が変化する

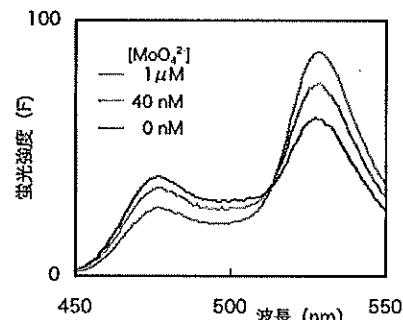


図2 水溶液中のモリブデン酸濃度に応じた分子プローブの蛍光スペクトル変化

セヌラ酵母 (*Hansenula polymorpha*) の膜輸送システムの概要解明を目標とした。

(3) また、モデル植物シロイヌナズナのゲノム情報を基にした逆遺伝学的手法で、モリブデン膜輸送に関わる分子群の概要解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ハンセヌラ酵母の変異体ライブラリより、モリブデン関連変異株として硝酸を窒素源として利用できない変異株 (nit, 47 株)、モリブデンと同属元素のタングステンに耐性をもつ変異株 (wr, 55 株) を単離した (図 3)。

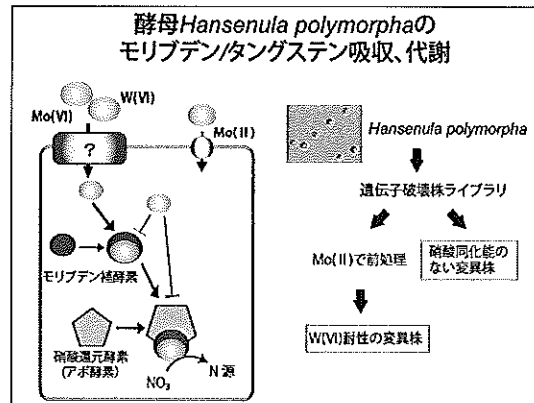


図3 モリブデン関連変異株の単離

(2) 次に、酵母培地のモリブデン濃度を蛍光分子プローブを用いて経時的に測定し、その減少速度を野生株と比較、分類することで、ハンセヌラ酵母のモリブデン輸送システムを推定した。

(3) また、当初予定していた連携研究者のもつ近縁種酵母ゲノム情報が利用できなくなったため、あらたに、ピロシーケンス法で酵母 *Hansenula polymorpha* JCM3620 のドラフトゲノムを決定し、遺伝子破壊ベクターでタグされた配列と比較した。

(4) 並行して、植物のモリブデン輸送体遺伝子も検索した。モデル植物シロイヌナズナの膜輸送体候補遺伝子群を、動物培養細胞で総当たり式に発現させ、モリブデンの細胞内濃度に影響する膜輸送体遺伝子を探した。

4. 研究成果

(1) ハンセヌラ酵母よりモリブデン関連変異株を多数得ることが出来た。

(2) ハンセヌラ酵母野生株と変異株の培地モリブデン濃度変化を、比較した結果、モリブデンの高速輸送、高親和性輸送、誘導性輸送の存在が予想された (図4、図5)。

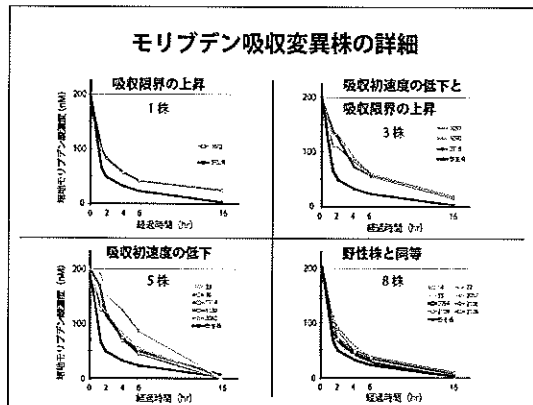


図4 酵母野生株と変異株の培地モリブデン濃度変化

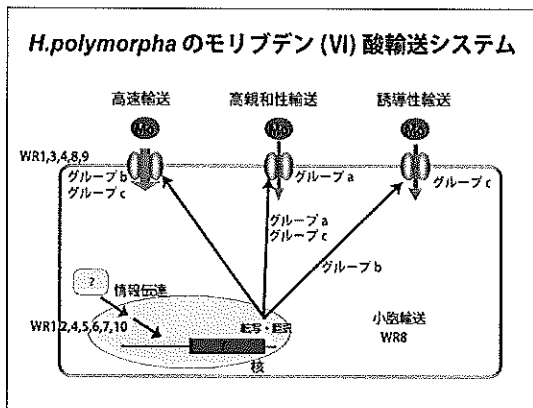


図5 ハンセヌラ酵母のモリブデン吸収膜輸送システムの概要

(3) さらに、実験に用いるハンセヌラ酵母のドラフトゲノム解析を行い、99%以上の領域の塩基配列データを得た (図6)。

酵母 *H. polymorpha* JCM3620 のドラフトゲノム解析

ゲノムサイズ 9~10Mb 染色体数 7		次世代シーケンサ ロシユGS FLXシステムによる解析	
ピロシーケンス結果	解読したDNA断片の数	542,264 (read)	
	1断片当たりの平均リード長	387 (b)	
アセンブルの結果	解読塩基数の合計	210,194,340 (b)	
	コンティグに統合されたDNA配列の数	514,008 (read)	
全コンティグ	統合に失敗したDNA配列の数	5,791 (read)	
	コンティグ数	1,587	
大きなコンティグ (1,000 b以上かつ冗長さ5以上)	統合されたDNA配列	514,008 (read)	
	構成塩基数	★ 9,501,176 (b)	
大きなコンティグ (1,000 b以上かつ冗長さ5以上)	コンティグ数	132	
	統合されたDNA配列	497,184 (read)	
大きなコンティグ (1,000 b以上かつ冗長さ5以上)	構成塩基数	★★ 8,925,445 (b)	

ドラフトゲノムデータ (精度99.9%) でゲノムの95%程度をカバー

図6 ハンセヌラ酵母のドラフトゲノム

変異株において、薬剤耐性遺伝子のベクター挿入位置を、ドラフトゲノムと比較して調べたところ、約 40 の遺伝子座とモリブデン膜輸送との関連性が推定された (図7)。

nit、wr 変異株でタグされる遺伝子座

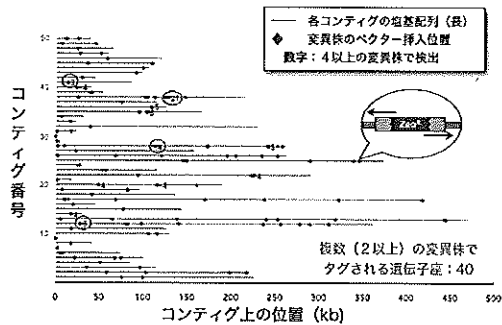


図6 モリブデン関連変異と関連する遺伝子座

(4) 植物のモリブデン膜輸送遺伝子ライブラリより、モリブデンの吸収型輸送、排出型輸送、オルガネラ蓄積型輸送に関わる分子の候補を絞り込むことが出来た (図7)。

Use of sensor protein to assay molybdate transport activity of Amethyst

host mammalian cell (293T)

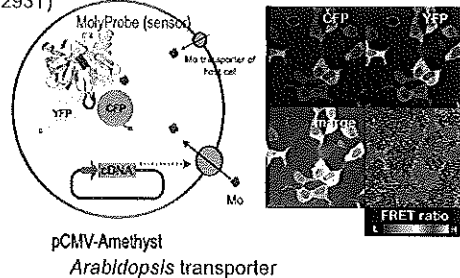


図7 植物モリブデン膜輸送体の機能評価

今後、以上の成果をさらに発展させ、モリブデン膜輸送を行う分子実体の解明に結びつけたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

- ① 中西 洋一、ハンセヌラ酵母のモリブデン関連変異株の吸収表現型とゲノム解析、2010年度農芸化学会大会、2010年3月28日、東京大学、東京都
- ② 中西洋一、動物細胞で発現する植物膜輸送体遺伝子ライブラリとその総当たりスクリーニング、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18日、熊本大学、熊本市
- ③ 中西洋一、植物膜輸送体遺伝子ライブラリからの細胞内モリブデン濃度調節因子の探索、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、パシフィコ横浜、横浜市
- ④ 中西洋一、酵母のモリブデン吸収変異株の解析、日本農芸化学会2009年度大会、2009.3.29、マリンメッセ福岡、福岡市
- ⑤ 中西洋一、モリブデン酸を検出するバイオプローブ、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、2008.12.11、神戸ポートアイランド、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：60362290