

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22780089

研究課題名(和文) ハンセンラ酵母をモデルにした真核生物モリブデン膜輸送システムの分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Molecular genetic analysis of eukaryotic molybdate transport systems in a model yeast *Hansenula polymorpha* and a model animal cell.

研究代表者

中西 洋一 (NAKANISHI YOICHI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：60362290

研究成果の概要(和文)：

モリブデン(Mo)は細胞内で酸化還元酵素の活性中心として働く元素で、広く生命活動に利用される。ところが、生物共通の超微量必須元素であるのにも関わらず、動植物など真核生物のモリブデン吸収・細胞内濃度調節に関わる膜輸送システムの実態は解明されていない。本研究では、単細胞真核生物のハンセンラ酵母(*Hansenula polymorpha*)をモデルとして、モリブデン膜輸送の仕組みを調べた。その結果、ハンセンラ酵母は少なくとも3種の異なる型のモリブデン輸送システムをもつことが分かった。また、独自に取得したドラフトゲノム情報からもモリブデン輸送体遺伝子を推定し、候補分子を3つまでに絞り込んだ。別の真核生物モデルとして、動物細胞HEK293Tのモリブデン膜輸送を解析した。細胞内のモリブデン酸濃度を観察するため、新たにモリブデンセンサー蛍光蛋白質を開発した。これを用いた *in vivo* 解析により、この細胞が硫酸イオン耐性、シュウ酸イオン感受性の新型モリブデン輸送体をもつことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Molybdenum (Mo) is an essential trace element for almost all living organisms. Whilst living cells are known to import inorganic molybdate oxyanion from the surrounding environment, the *in vivo* dynamics of cytosolic molybdate and/or transport systems remain poorly understood. We investigated molybdate transport system of a model unicellular yeast *Hansenula polymorpha* in this study. Results of genetic analysis suggested the yeast has at least three different type of molybdate transport. Also, we obtained three candidate genes for the molybdate transport those exhibited molybdate accumulation in heterologous expression systems. Furthermore, we developed a genetically encoded Förster-resonance-energy-transfer (FRET)-based nanosensor for molybdate. By using the nanosensor we demonstrated *in vivo* dynamics of molybdate in a model animal cell HEK293T. Analyses of the dynamics suggest that novel oxalate-sensitive- and sulfate-resistant- transporter(s) uptake molybdate in the cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、微量元素、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。(1) 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、(2) 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(2)の代表例である。

しかし、生物、特に高等動植物を含む真核生物の細胞が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かについては実はよく分かっていない。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には原核生物モリブデン輸送体のオルソログ分子がなく、モリブデン膜輸送システムの実態は不明であった。最近になって、モデル植物シロイヌナズナの硫酸イオン輸送体ホモログにモリブデン輸送能があることが明らかにされ (Tomatsu H, 2007, PNAS USA)、真核生物輸送システムの一部が明らかにされたことは朗報であるが、動物、菌類には類似分子がなく、モリブデン輸送機能を担う別の分子の存在が予想されている。

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、技術的な困難も挙げられる。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が

存在しないことは、モリブデン利用システムを理解する上で大きな障壁となっている。

2. 研究の目的

本研究では、生存にかかせない必須元素の吸収システムであるにもかかわらず、これまで知見に乏しい真核生物のモリブデン膜輸送システムを明らかにするための手がかりを得ることを目的とした。

そこで、モリブデンを利用する単細胞真核生物として知られている酵母 *Hansenula polymorpha* をモデルとして、分子遺伝学的手法により、酵母のもつモリブデン輸送システムの概容解明とモリブデン膜輸送に関する遺伝子の同定を目指した。また、ヒトを含む高等動物のモリブデン酸吸収の仕組みを理解するため、培養細胞をモデルとしてモリブデン酸輸送体の性質を明らかにすることを目的とした。さらに、モリブデン研究を強力に進めるための技術基盤として、モリブデンの生きた細胞内での動態を明らかにするための新規プローブ分子の開発を目指した。

3. 研究の方法

研究開始の時点で得ていた、酵母 *Hansenula polymorpha* の変異株 2 群 (*nit* 硝酸同化能変異株、*wr* タングステン酸耐性変異株) について、経時的に変化する培地モリブデン濃度を詳細に調べ (1) 変異表現型の原因がモリブデン吸収能と関連するかしらべた。また、(2) モリブデン吸収能が対照の野生型株と異なるものについて分類し、酵素学的性質の異なるモリブデン吸収輸送体を推定した。

次に、*Hansenula polymorpha* のモリブデン輸送体遺伝子の探索を進めた。モリブデン関連変異株 (*nit*, *wr*) はゼオシン耐性マーカーをもつ遺伝子破壊ベクターの挿入により作製したものである。そこで、各変異株からゲノムDNAを調製し、ベクターにタグされた遺伝子座を決定した。さらに、独自に準備した *Hansenula polymorpha* のドラフトゲノム情報を活用し、タグ遺伝子座周辺に存在する膜輸送体遺伝子を候補遺伝子を検索した。これらを、順次クローニングしてパン酵母発現系、および動物細胞発現系で異種発現させてモリブデン輸送能の有無を検証した。

酵母やその他の生物の細胞内モリブデン酸濃度を可視化する、プローブ分子の開発を進めた。既知のモリブデン結合蛋白質を利用し、細胞内のモリブデン酸濃度に応じて構造変化が起こり、外部に Förster- resonance-energy- transfer (FRET) シグナルを出力する人工タンパク質を新たに設計した。大腸菌に発現させた人工タンパク質を、高度に精製してセンサー蛋白質としての性能を調べた。

新たに開発したモリブデンセンサー蛋白質をモデル動物細胞HEK293Tに導入し、*in vivo*でのモリブデン酸ダイナミクスを解析した。また、細胞内モリブデン酸濃度の上昇を指標として、HEK293T細胞のモリブデン酸輸送体の基質に対する親和性や阻害剤スペクトルなどの生化学的性質をしらべた。また、研究遂行中に別グループによって提案されたモリブデン酸輸送体HsMoT2と観察されたモリブデン酸吸収活性との関連性をsiRNAによるmRNA抑制実験で検証した。

4. 研究成果

ハンセヌラ酵母 (*Hansenula polymorpha*) の培地中のモリブデン酸濃度を調べると、モリブデン酸添加直後の急激な減少と、ある程度濃度が低下してからおこるゆっくりとした濃度減少の2相性があることが分かった。さらに、*nit*, *wr*変異株の培地モリブデン酸濃度のタイムコースを調べると、2相のうち前期相が失われたもの(グループa)、後期相が失われたもの(グループc)、中間的あるいは前期相がタイムラグをおいて生じるもの(グループb)などが存在した(図1)。これらの結果より、ハンセヌラ酵母のモリブデン酸膜輸送システムには(1)高速で基質親和性が低い型、(2)低速で基質親和性が高い型、(3)何らかの外環境にตอบสนองして誘導される型、の少なくとも3種類の膜輸送システムをもつことを明かにした。

HpMOT1~4の*H. polymorpha*のモリブデン輸送システムにおける役割

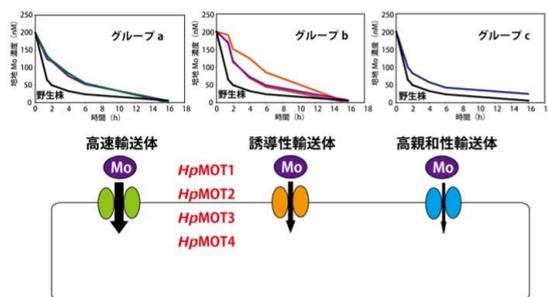


図1 ハンセヌラ酵母の培地モリブデン酸濃度変化から推定される膜輸送

次にこれらの膜輸送に直接関わる膜輸送体遺伝子の探索を進めた。独自のハンセヌラ酵母ドラフトゲノムデータを活用して、遺伝子破壊ベクターpREMIZにタグされる遺伝子座周辺に存在し、膜輸送体の構造的特徴(一次構造に複数回の膜貫通ドメイン)を示す候補分子を洗い出した。約30の候補遺伝子をパン酵母発現ベクターに組み込み、パン酵母

異種発現系で機能を検証した(図2)。その結果、3つの候補遺伝子(#35, #38, #39)がパン酵母のモリブデン吸収活性を促進することを確認した。同様な実験を、動物細胞異種発現系でも行ったところ、上記3種の候補遺伝子の内、2種の遺伝子については宿主細胞のモリブデン吸収活性を向上させた。また、パン酵母発現系のスクリーニング結果と異なる候補分子も1種得られた。これら候補分子が、前述のハンセヌラ酵母モリブデン酸膜輸送活性を担っている可能性が高い。ただし、ハンセヌラ酵母は自然突然変異も高頻度で出現するため、遺伝子破壊ベクターでタグされていないモリブデン酸輸送体遺伝子が存在する可能性も配慮して、今後の研究を進める必要がある。

培地モリブデン酸濃度を低下させる能力を示した候補分子

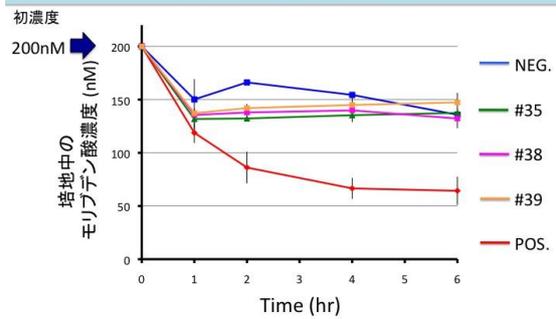


図2 ハンセヌラ酵母モリブデン酸輸送体候補分子のパン酵母での機能検定

本研究のような、モリブデン利用、モリブデン膜輸送システムの研究を進めるためには、生細胞内のモリブデン動態を可視化することが不可欠である。そこで、モリブデン濃度に応じて構造変化し、外部にその状態を知らせるレポーター分子の開発を行った。具体的には、大腸菌のモリブデン酸結合蛋白質ModEのモリブデン酸結合ドメイン(MoBD)と青色蛍光蛋白質(CFP)、黄色蛍光蛋白質(YFP)をペプチドリンカーで連結した人工タンパク質を作出した。モリブデン酸センサー蛋白質 MolyProbe は、モリブデン酸がMoBDに結合すると、分子内の2つのMoBDが会合し CFP-YFP 間の Förster-resonance energy transfer (FRET) 効率が上昇し、結果的に蛍光色が青色系から黄色系に変化する(図3)。

大領菌で発現させ、4段階のカラムクロマトグラフィーで高度に精製した MolyProbe は基質モリブデン酸(あるいはタングステン酸)に対する基質特異性が高く、一般アニオンのみならず、sp3混成四面体構造を共有する硫酸イオンであってもほとんど反応しな

かった。また基質に対する親和性は $K_d = 20\text{nM}$ と非常に高く、*in vivo* での微量なモリブデン酸の検出に十分な感度を示した。

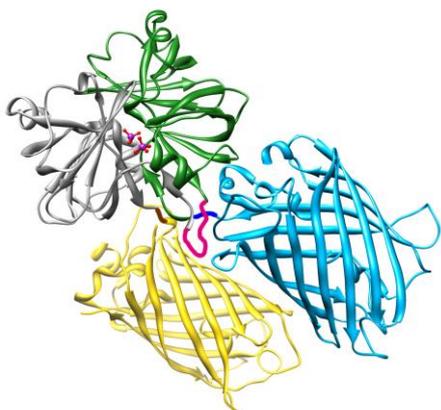


図3 新たに開発したモリブデン酸センサー蛋白質 MolyProbe

モリブデン酸センサー蛋白質 MolyProbe をモデル動物細胞 HEK293T に導入し、生きた培養細胞でのモリブデン酸ダイナミクスを可視化した。培地へのモリブデン酸の添加により細胞内の MolyProbe の青色：黄色レシオがリアルタイムに変化する様子を、共焦点レーザー顕微鏡で示すことができた (図4)。

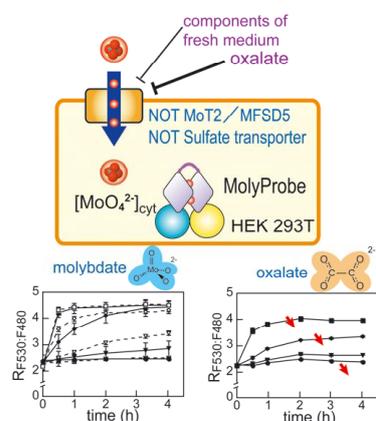


図4 動物細胞 HEK293T の細胞内モリブデン酸の可視化、新型モリブデン輸送体

また、MolyProbe を導入した HEK293T 細胞の蛍光比タイムコースをより詳細に解析すると、この細胞のモリブデン膜輸送体が約 $1\ \mu\text{M}$ の基質親和性を有すること、輸送活性が硫酸イオンに耐性を示すこと、その一方でシュウ酸イオンに感受性を示すことを明らかにした。こうした性質は、従来動物細胞で知られていた硫酸イオン感受性モリブデン輸送活性と異なり、新型のモリブデン輸送体を示唆するものであった。なお、研究中にスペインのグループが緑藻クラミドモナスより

新型モリブデン輸送体 MoT2 を発見した。この輸送体のホモログ HsMoT2 が動物細胞モリブデン酸輸送体であるとの主張を踏まえ、RNAi による検証実験をおこなったが、HsMoT2 と本研究で示唆されたシュウ酸感受性輸送体は別物との結論をえた。

これらの成果について、論文発表1件、学会発表5件を行った。

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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Nakanishi, Y., Iida, S., Ueoka-Nakanishi, H., Niimi, T., Tomioka, R., Maeshima, M. Exploring dynamics of molybdate in living animal cells by a genetically encoded FRET nanosensor. PLoS One. 2013;8(3):e58175. doi: 10.1371/journal.pone.0058175.

[学会発表] (計5件)

- ① 中西洋一、飯田俊太郎、川嶋輝美、藤原徹
生きた植物細胞のモリブデン濃度イメージング、第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館(京都)
- ② 前田道子、中西洋一
2色発光モリブデンセンサー蛋白質による酵母細胞内のモリブデン濃度測定
第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 パシフィコ横浜(横浜)
- ③ 中西洋一、川嶋輝美、中西華代、新美友章、前島正義
FRETナノセンサーを用いた動物細胞のモリブデン酸吸収システムの解析、第35回日本分子生物学会大会 2012年12月12日 福岡国際会議場
- ④ 川嶋輝美、飯田俊太郎、藤原徹、中西洋一
イメージ解析による植物モリブデン酸膜輸送システムの研究
第35回日本分子生物学会大会 2012年12月13日 福岡国際会議場
- ⑤ Nakanishi, Y., Kawashima, T., Iida, S., Fujiwara, T., Maeshima, M.
Imaging analysis of molybdate in vivo

by a genetically encoded FRET
nanosensor, International Workshop on
Plant Membrane Biology XVI 2013年
3月28日, Kurashiki Geibunkan,
Kurashiki

[その他]
ホームページ等

<http://celld.agr.nagoya-u.ac.jp/nakanishi/130312paperNakanishi.html>

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

(3) 連携研究者

前島 正義 (MAESHIMA MASAYOSHI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 80181577

藤原 徹 (FUJIWARA TORU)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 80242163

新美 友章 (NIIMMI TOMOAKI)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 30377791

富岡 利恵 (TOMIOKA RIE)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号: 40456588

中西 華代 (NAKANISHI HANAYO)
愛知医科大学・学際的痛みセンター・研究員
/名古屋大学・理学研究科・研究員

前田 道子 (MAEDA MICHIKO)

川嶋 輝美 (KAWASHIMA TERUMI)
以上2名、名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生

飯田 俊太郎 (IIDA SYUNTARO)

鵜飼 杏奈 (UKAI ANNA)
以上2名、名古屋大学・農学部・学部学生