

氏名(本籍)	お ばた とし ひろ 小 幡 年 弘 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 3717 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	The Metabolism of Selenium in a Coccolithophorid, <i>Emiliana huxleyi</i> (円石藻 <i>Emiliana huxleyi</i> におけるセレン代謝)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	白 岩 善 博
副 査	筑波大学教授	理学博士	井 上 勲
副 査	筑波大学教授	理学博士	漆 原 秀 子
副 査	筑波大学教授	理学博士	鎌 田 博

論 文 の 内 容 の 要 旨

ハプト植物門に属する単細胞藻類である円石藻は、細胞表面に円石と呼ばれる炭酸カルシウム結晶より構成される殻を有することが特徴である。円石藻の代表種の一つである *Emiliana huxleyi* は海洋に広く分布し、大規模なブルームを形成する。増殖した細胞は光合成と石灰化の 2 種の反応によって、大量の炭素を固定するため、円石藻の増殖制御因子の解析は大気-海洋間における炭素循環を考える上で重要な意味を持つ。しかし、これら海洋微細藻類の増殖がいかなる要因によって制御されているのかについては多くの研究がなされてきたが、円石藻 *Emiliana huxleyi* における微量元素セレン (Se) の代謝及び Se の生理機能を明らかにすることにより、Se がいかにして円石藻の増殖を制御するかについて解明することを研究目的とした。

本論文は 3 章から成る。第一章では、*E. huxleyi* の Se 蓄積能を評価するため、*E. huxleyi*, 非石灰化ハプト藻 *Isochrysis galbana* および緑藻 *Dunaliella tertiolecta* を 10 nM の亜セレン酸を含む人工海水培地で培養し、細胞内元素含量を Particle induced X-ray emission (PIXE) 法により測定した。*E. huxleyi* の細胞内 Se 濃度は培地中のその 1600 倍であり、他 2 種と比べて高い Se 蓄積能を有することを明らかにした。更に、Ca, Sr, および Mn を他の 2 種の 10 倍以上に蓄積する事を明らかにした。また、Se 欠乏により細胞増殖が停止した後に S 及び Mn の細胞内含量が増加したことから、円石藻に特異的な Se 及び Mn 蓄積機構の存在と、Mn 及び S が Se と機能的に関連していることを強く示唆した。

第二章では *E. huxleyi* に特異的な Se 蓄積機構の詳細を明らかにするために、⁷⁵Se-亜セレン酸を基質として与えて細胞内の Se 蓄積の速度論的解析を行った。細胞への Se 取り込みは、細胞内への亜セレン酸取り込み速度とその後の Se 代謝速度を反映する 2 相性を示した。また、反応速度論的解析により、高親和性の培地中亜セレン酸濃度上昇に対して飽和する成分と、低親和性で培地中亜セレン酸濃度に比例して直線的に増加する成分の 2 成分に分解できた。飽和成分は ATP 合成阻害剤により阻害されたのに対し、直線成分は阻害されなかったことから、亜セレン酸取り込み段階には高親和性のエネルギー依存型輸送系と低親和性の受動輸送系が関与する事を明らかにした。亜セレン酸や、そのアナログである亜硫酸のエネルギー依存型輸送系はこれまでに報告が無く、*E. huxleyi* は特異的かつ高効率の亜セレン酸取り込み機構を有していること

を明らかにした。次に、Se代謝経路を明らかにするため、⁷⁵Seラベラーパルスーチェイス実験により、細胞内に取り込まれた亜セレン酸はアミノ酸誘導体やタンパク質等に速やかに代謝されることを明らかにした。本研究により、円石藻は高親和性のエネルギー依存型輸送系で取り込んだSeを低分子Se含有化合物の形態で蓄積し、Seの機能態であるSe含有タンパク質の合成に利用することにより、海水中に存在する微量のSeを効率よく利用していることを示した。

第三章では、*E. huxleyi*におけるSeの生理機能を調べるために*E. huxleyi*のセレノプロテインの同定を行った。本研究で開発した⁷⁵Se/³⁵Sダブルラベル検出法を用いた解析により、6種の⁷⁵Se-ラベルタンパク質(EhSEP1-6)を検出した。この中で、最も豊富に存在したEhSEP2の部分アミノ酸配列は多くの生物のProtein disulfide isomerase (PDI)と有意な相同性を示したため、RT-PCRによるEhSEP2 cDNAのクローニングを行った。その結果、EhSEP2は一つのチオレドキシンドメインを含む新規のPDI様セレノプロテインである事が明らかになり、セレノシステインをコードするTGAコドンは活性中心システインに対応する位置に見出された。しかし、cDNA上に既知のセレノシステイン導入配列が存在しなかったことから、タンパク質へのSe導入に未知のセレノシステイン導入配列もしくは全く新規の導入機構が関与することが示唆された。また、Northern blot解析の結果、EhSEP2の転写産物量はSeの存在量に依存した。一般に、PDIは小胞体内でジスルフィド結合の転位を触媒し、タンパク質の立体構造形成を促進することから、*E. huxleyi*においてSeがPDI活性の必須因子として新規合成タンパク質の成熟過程に関与する可能性を示した。SeはPDIの活性中心に配位し、その酵素活性を向上させる役割を果たすことにより、効率的なタンパク質生産を可能とし、円石藻の増殖や生存に有利な条件を賦与するものと推測した。本研究の成果は微細藻類におけるSe利用の多様性を示唆するものであり、今後多くの微細藻類において解析が行われることで、生物一般におけるSeの生理機能の解明につながると期待できる。

審査の結果の要旨

海洋に広く分布し、大規模なブルームを形成する円石藻 *Emiliania huxleyi* の増殖がいかなる要因によって制御されているかを、微量元素セレン (Se) の代謝及びSeの生理機能の推定に基づいて解明した優れた研究である。まず、*E. huxleyi* が特異的なSe蓄積機構によりSeを細胞内に濃縮することを明らかにした。Se蓄積の速度論的解析により、高親和性のエネルギー依存型輸送系で取り込んだSeを低分子Se含有化合物の形態で蓄積し、Seの機能態であるSe含有タンパク質の合成に利用することを明らかにした。更に、独自に開発した⁷⁵Se/³⁵Sダブルラベル検出法を用い、6種の⁷⁵Se-ラベルタンパク質(EhSEP1-6)を検出し、最も存在量の多いEhSEP2の部分アミノ酸配列は多くの生物のProtein disulfide isomerase (PDI)と有意な相同性を示し、EhSEP2 cDNAのクローニングの結果、EhSEP2は一つのチオレドキシンドメインを含む新規のPDI様セレノプロテインである事を示した。セレノシステインをコードするTGAコドンが活性中心に位置し、タンパク質へのSe導入に未知のセレノシステイン導入配列もしくは全く新規の導入機構が関与することを示唆した。一般的なPDIの機能から推定し、*E. huxleyi*においてSeがPDI活性の必須因子として新規合成タンパク質の成熟過程に関与する可能性を示した。SeはPDIの活性中心に配位し、その酵素活性を向上させる役割を果たすことにより、効率的なタンパク質生産を可能とし、円石藻の増殖や生存に有利な条件を賦与するものと推測した。本研究の成果は微細藻類におけるSe利用の多様性を示唆するものであり、生物一般におけるSeの生理機能の解明につながる研究である。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。