

氏名	李 鎮雄		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 10318 号		
学位授与年月日	令和 4 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	Study on a novel pathway for phosphate uptake in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の新奇なリン酸取り込み経路に関する研究)		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	鈴木 石根
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	石田 健一郎
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中山 剛
副査	産業技術総合研究所招聘研究員	理学博士	岩田 康嗣

論 文 の 要 旨

リンはリン酸として全ての生物の生存において様々な役割を持つ必須な元素の1つである。またリンは、現在の人類社会の維持と発展に不可欠な多様な産業に欠かせない天然資源でもある。特に食糧を生産する農業分野においては、リン酸を含む肥料は安定した収量を維持するために必要である。今日、リン資源は地球上の極限られた地域でのみ採掘されるリン鉱石から供給され、且つ可採可能なリン鉱石は年々減少している。安定したリン資源の獲得は大きな課題である。一方で人類の活動に伴う水圏環境へのリン酸の過剰な排出は、富栄養化による環境悪化の主要な原因である。自然状態では水圏のリン濃度は極めて低く、リン酸の過剰な供給により一次生産者である微細藻類の異常な生育を引き起こし、生態系の均衡を攪乱することによって富栄養化が起こる。そのため廃水の処理工程では多くのエネルギーを投入し、廃水中の有機物とともにリン酸を回収している。しかしそれらはリン資源としてリサイクルされることはなく、廃棄物として処理されている。持続可能な社会の構築のためには、効率的なリン資源のリサイクル手法の開発が望まれている。このような背景を踏まえ、筆者は本論文の研究において淡水性のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のリン酸代謝の詳細を研究した。

まず第1章では、遺伝子改変を施した *Synechocystis* を用いて新規なリン酸回収システムの開発に取り組んだ。先行研究により、*Synechocystis* はリン酸欠乏条件でリン酸のセンサータンパク質 SphS が活性化され、高親和性のリン酸輸送体遺伝子の発現を誘導すること、SphS のシグナル検知ドメインに存在する PAS ドメインを欠損した SphS を発現する株 (Δ PAS 株) は、リン酸の有無にかかわらず常にリン酸輸送体遺伝子を発現することがわかっていた。そこで筆者は、リン酸が存在する条件で Δ PAS 株は野生株より多くのリン酸を細胞内に取り込むと考えた。通常のリン酸濃度 (180 μ M) を含む培地中で Δ PAS 株は野生株の約4倍速く培地からリン酸を吸収できた。より高いリン酸濃度 (4 mM) の条件でも Δ PAS 株は同様に速いリン酸の取り込み速度を示した。しかしながら Δ PAS 株の早いリン酸の取り込みは培養開始から2日間しか継続しなかった。この時点でなぜリン酸の取り込みが停止してしまうかについての原因はわからなかった。それに対して野生株では、4 mM リン酸条件でも2日目までは180 μ M の条件とほぼ同じリン酸の取り込み速度であったが、その後、4 mM リン酸条件でのみ3日から5日目にかけて異常に高いリン酸の取り込みが見られ、その後細胞が白化するにつれて培養液のリン酸濃度が再び上昇するという、これまでの知見からは全く説明のつかない現象を見出した。そこで筆者はこれらの現象について第2章でさらに詳細に解析を行った。

野生株のリン酸取り込み速度は、培養開始2日間までは通常の180 μ M と高リン酸濃度の4 mM の条件でいずれも1日あたり80-90 μ M 程度リン酸濃度を低下させるもので大きな差はなく、通常の培養条件ではほぼ全てのリン酸が2日間で吸収されていることがわかった。それに対して4 mM リン酸条件では3日から5日目のリ

ン酸吸収速度は1.3 mM/dと14倍以上活性化されていることを見出した。筆者はこの奇妙な現象を引き起こす原因が2日間の培養による培地成分の変化に起因するのではないかと考え、通常の培地からその成分を1つずつ欠乏させた高濃度リン酸培地を調製し、野生型の*Synechocystis*を培養することで、硫酸マグネシウムの欠乏が類似の症状を示すことを見出した。さらに筆者は、硫酸イオンとマグネシウムイオンの欠乏を別々に評価することによって、硫酸の欠乏が急激なリン酸の取り込みを誘導すること、マグネシウムイオンの欠乏が細胞の白化と細胞の破壊を誘引しその結果培養液中のリン酸濃度が上昇することを明らかにした。硫酸の欠乏条件では、硫酸イオンの輸送体をコードする遺伝子群の発現が誘導されるが、筆者はこの硫酸欠乏で誘導される輸送体オペロンを欠損した変異体を作製し、この変異体では硫酸欠乏条件での急速なリン酸の取り込みが大幅に抑制されることを見出した。先行研究では様々なバクテリア・微細藻類・植物の細胞で、硫酸欠乏条件で細胞内にリン酸を高濃度に蓄積する現象が報告されている。しかしながら、それに関わる輸送体はこれまで明らかにされていなかった。細胞膜を介した物質輸送は基質特異性の高い特定の輸送体がそれぞれ関わると考えられてきたが、筆者は本論文で硫酸イオンの輸送体は硫酸非存在下でリン酸イオンを高速に輸送できることを初めて明らかにした。マグネシウムイオンは細胞内でポリリン酸の対イオンとして機能し、高濃度リン酸の蓄積に寄与すると考察され、マグネシウムイオンの欠乏条件ではリン酸が細胞内に過剰に蓄積して細胞を破壊し、培養液の白化と培地中へのリン酸の放出が起こると説明された。

筆者はさらに第1章で発見した、 Δ PAS株のリン酸吸収が培養開始後2日間で停止してしまうことが、十分な濃度の硫酸マグネシウムの添加によって緩和され、リン酸を連続的に吸収することも明らかにし、この株を用いることで高濃度リン酸を含む溶液から連続的にリン酸を回収する仕組みを構築できる可能性を示した。さらに興味深いことに、硫酸イオン輸送体遺伝子の発現が Δ PAS株では誘導されないことも見出しており、輸送体の基質特異性だけでなく、遺伝子発現の制御機構にもリン酸と硫酸のシグナルの統合が存在することが示唆されたことは、構造の良く似た硫酸とリン酸の代謝が実際の生体内で強く相互に関連している可能性を示すものであった。

審 査 の 要 旨

本論文で筆者は、偶然に見出したユニークな実験結果に着目し、その原因を緻密に解析することによって、本来硫酸の輸送に関わるタンパク質がリン酸も輸送できること、リン酸を細胞内に高濃度に保持するためにマグネシウムイオンの添加が必要であることという新規な知見を明らかにした。これらの発見は、基質特異性が高いというこれまでの生物の物質輸送の概念を覆すものであり、また微生物を用いた水中からの新規なリン酸回収システムの構築に応用できる基礎的な知見である。以上の成果は当該分野の理解と発展に斬新で且つ大きな貢献を果たしており高く評価できるものである。

令和4年1月24日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。