

氏名	小 川 和加野		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	葉 学		
学位授与番号	博乙第3877号		
学位授与の日付	平成15年 9月30日		
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)		
学位論文の題目	細菌細胞におけるイオン共役型輸送系の解析		
論文審査委員	教授 土屋 友房	教授 岡本 敬の介	教授 森山 芳則

学位論文内容の要旨

大腸菌 W3133-2 にファージを感染させ、セリンを単一炭素源として利用できない変異株 WAT9 を分離した。WAT9 は Na^+ /セリン輸送系欠損株であったが、 H^+ /セリン輸送系の活性は維持していた。

大腸菌 WAT9 を宿主とし pBR322 をベクターとしてセリン共輸送系遺伝子のクローニングを行った結果、嫌気条件下で発現するセリン-スレオニン輸送系遺伝子 *tdcC* のクローニングに成功した。pBR322 に *tdcC* 遺伝子を組み込み、活性を増幅することで、この輸送系が H^+ 共役型であることを示した。次にベクターを pMW119 に変更してクローニングを行い、pMST3 を分離した。WAT9/pMST3 はセリン-スレオニン型のセリン輸送活性を示し、さらに、セリン添加に伴う Na^+ の細胞内への流入が観察された。これは pMST3 に Na^+ /セリン共輸送系遺伝子がクローニングされたことを示している。サブクローニングの結果、*yjgU* が、 Na^+ /セリン共輸送系遺伝子であると推測され、これを *sstT* と命名した。 Na^+ /セリン共輸送系の活性は培地のトリプトファンにより低下することが報告されているが、この現象を Northern 法により調べた結果、培地のトリプトファンにより *sstT* の mRNA が減少していることが明らかになった。

大腸菌の3種類のセリン輸送系の性質を個別に解析するため、セリン輸送系破壊株を7種類作成した。これらの破壊株について 1 mM セリンに対する感受性（生育阻害）を調べたところ、WT8 と WTC85 は親株 W3133-2 と同程度セリンによる生育阻害を受けた。WA3、WC6、WAC33、WTA88 は、阻害はかかるものの、ある一定時間を過ぎると生育を始めた。WTAC8516 ではセリンによる生育阻害はほとんど観察されなかった。即ち、WTAC8516 では生育するのに十分なセリンが細胞内に取り込まれているが、その量は生育阻害を起こす濃度には達していないと考えられる。

論文審査結果の要旨

細胞膜におけるイオン循環は生物のエネルギー転換において極めて重要な役割を担っている。細菌細胞膜においては、ATP合成、栄養物質の輸送、イオンの輸送、運動などが H^+ や Na^+ の膜を介する電気化学的ポテンシャルによって駆動されている。この論文では、大腸菌を中心に、細菌細胞の栄養物質の能動輸送系、特に重要なアミノ酸の1つであるセリンの輸送系などの遺伝子クローニング、輸送系におけるイオン共役、性質などについて解析している。

これまでの解析により、大腸菌には少なくとも3つのイオン共役型セリン輸送系が存在することがわかっている。3つの系が共存する場合、個々に解析することは大変むずかしい。それら1つ1つについて詳しく解析するには、遺伝子クローニングと大量生産、遺伝子破壊などが有効な手段である。この論文では、いろいろな遺伝子操作の手法を用いて、3つのセリン輸送系SstT, SdaC, TdcCの遺伝子をクローニングし、それらを過剰発現させた上で個々の系のイオン共役や生化学的性質を明らかにしている。また、個々の遺伝子を破壊した株、複数の系を破壊した株などを構築し、輸送活性の変化や生育上の変化などを解析することにより、個々のセリン輸送系の役割を解析し、大変興味深い結果を得ている。筆者が構築したセリン輸送系破壊株はこの分野の研究者にとって大変有用なものであり、世界のいくつかの研究者から分与を依頼され、実際に使われ、興味深い成果を産みだすことに貢献している。

また、その他の細菌のイオン共役系についても解析し、興味深い成果を得ている。

この論文の成果は学術上大変興味深いものであり、博士の学位に値するものと判断する。