

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	奥村 憲史
論文題目	Studies on Structure-Function Relationship and Physiological Role of Bacterial Iron-Importing Efe System (細菌の鉄輸送Efe系の構造・機能相関と生理的役割に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
鉄は、全ての生物において、酸化還元に関わる酵素、電子伝達や酸素分子の運搬に関わるタンパク質などの補因子として必須の金属である。細菌による鉄の獲得戦略は、シデロフォアやヘムなどの鉄結合化合物を介した輸送機構および遊離二価鉄(Fe²⁺)を直接取り込む機構に大別される。鉄結合化合物依存的な獲得については、様々な輸送系が同定され、その分子機構や生理機能が明らかにされている。一方、Fe²⁺の直接輸送系としてFeo系とEfe系の二種が同定されている。Feo系に関しては、一部の細菌が病原性に関与することや分子機構の解析が進められていることが報告されているが、Efe系に関しては、その全体構造や生理的役割について不明な点が多い。 本論文は、Efe系の構造機能相関および細菌の環境適応におけるEfe系の生理的役割を明らかにすることを目指して、Efe系構成因子の構造と機能を解析するとともに、多様な環境に常在する<i>Pseudomonas</i>属細菌を対象としてEfe系の分布と生理機能を調査した結果をとりまとめたものである。 第1章では、生物における鉄の生理機能と動植物における鉄輸送系、並びに細菌におけるEfe系を含む種々の鉄輸送系および<i>Pseudomonas</i>属細菌の特性に関する先行研究について述べ、本研究の背景、目的および意義について説明している。 第2章では、種々のグラム陰性細菌を対象に、Efe系を構成する各タンパク質の構造と機能を解析した結果を述べている。Efe系はペルオキシダーゼEfeB、金属結合タンパク質EfeO（またはEfeO_IとEfeO_{II}）、膜輸送体EfeUの三種類から構成される。 EfeBについて、X線結晶構造解析により<i>Sphingomonas</i>属細菌A1株由来EfeBのヘムが結合した立体構造を決定した。本構造は、既報の<i>Escherichia coli</i>由来EfeB構造と類似していた。一方、<i>Sphingomonas</i>属細菌A1株由来EfeBは、鉄酸化活性を示さない<i>E. coli</i>由来EfeBとは異なり、<i>Bacillus subtilis</i>由来EfeBと同様の鉄酸化活性を示すことから、EfeBの鉄酸化活性が複数の細菌種で保存されていることを明らかにした。 EfeOについて、N-末端側cupredoxin（銅結合性の電子伝達タンパク質）様ドメインとC-末端側M75金属ペプチダーゼドメインの二つのドメインからなるEfeO_I、並びにM75金属ペプチダーゼドメインのみからなるEfeO_{II}がある。X線結晶構造解析により、<i>E. coli</i>由来EfeOの立体構造をEfeO_Iとして初めて決定した。cupredoxin様ドメイン中には金属との結合は認められなかったが、M75金属ペプチダーゼドメイン中には亜鉛との結合が認められた。亜鉛の結合残基（Glu156、Glu159、Asp173、およびGlu255）は、一次構造で予測されたモチーフと異なるが、<i>Sphingomonas</i>属細菌A1株由来EfeO_{II}の金属結合残基と一致していたことから、この結合サイトを新規な金属結合モチーフ“ExxE-/-D-/-E”として提唱した。 EfeUについて、<i>E. coli</i>由来EfeUを対象として、組換え大腸菌を用いた発現系を確立し、界面活性剤により可溶化した膜タンパク質から各種クロマトグラフィーにより			

EfeUを精製した。精製したEfeUの結晶をX線結晶構造解析に供してX線回折データを取得するとともに、AMED-BINDSの研究支援によるクライオ電子顕微鏡解析にも供して単粒子電子顕微鏡像を得た。これにより、EfeUの立体構造解明に向けた技術基盤を構築した。

第3章では、*Pseudomonas*属細菌をゲノム構造に基づいて系統的に分類し、本菌におけるEfe系の生理的役割を解析した結果を述べている。*Pseudomonas*属細菌320種を対象に、81種類のハウスキーピング遺伝子を用いた多遺伝子座配列解析法による系統解析およびパンゲノム解析で得られた遺伝子有無情報に基づく主成分分析を実施し、両者の結果を統合した。その結果、*Pseudomonas*属細菌は*P. aeruginosa*グループ（98種）、*P. putida*グループ（49種）、*P. syringae*グループ（47種）、および*P. fluorescens*グループ（126種）の4グループに分類された。そこで、Efe系の分布を調べたところ、Efe系は植物に関連する株の多い*P. syringae*グループと*P. fluorescens*グループから高頻度（> 75%）で検出された。

Efe系が植物への適応に寄与することを実証するため、植物生育促進菌*P. fluorescens*を対象に、野生株および遺伝子破壊により育種したEfeU欠損（ Δ *efeU*）株の植物（シロイヌナズナ）表面における生育を比較した。その結果、野生株は Δ *efeU*株よりも平均1.47倍多く検出されたことから、Efe系は植物表面における*Pseudomonas*属細菌の生育に重要であることを明らかにした。

第4章では、第2章Efe系構成タンパク質の構造機能相関と第3章*Pseudomonas*属細菌におけるEfe系の生理的役割を総括している。

以上のように、本論文は、グラム陰性細菌を対象に、鉄輸送Efe系構成タンパク質の構造機能解析を通して、EfeBの鉄酸化活性が複数の細菌種において保存されていること、およびEfeOにおいて新規な金属結合モチーフが存在することを見いだし、膜輸送体EfeUの発現・精製系の確立によりEfeUの構造解析に向けた技術基盤を構築した。また、*Pseudomonas*属細菌において、Efe系が植物由来株を多く含む*P. syringae*グループと*P. fluorescens*グループに偏在することを見いだし、Efe系が植物表面における*Pseudomonas*属細菌の生育に重要であることを示したことにより、Efe系の生理的役割を細菌において初めて明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

鉄は全生物の生存に必須の元素である。細菌も生育環境に応じて種々の鉄輸送系を使い分ける。遊離 Fe^{2+} 輸送系の一つであるEfe系は、ペルオキシダーゼEfeB、金属結合タンパク質EfeO（またはEfeO_IとEfeO_{II}）、および膜輸送体EfeUから構成される。このEfe系は、EfeUと相同性を示すタンパク質が真核生物にも保存されているため、その重要性が指摘されているが、いまだ全容解明には至っていない。本論文は、Efe系の構造機能相関とその生理的役割を明らかにすることを目的として、Efe系構成タンパク質の構造と機能、および多様な環境に常在する*Pseudomonas*属細菌におけるEfe系の分布と生理機能を解析した。評価すべき主要な点は以下の三つに要約される。

1. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株由来 EfeB のへムを含む立体構造を決定するとともに、本タンパク質の鉄酸化活性を実証し、EfeB の鉄酸化活性が細菌種間で保存されていることを明らかにした。
2. *E. coli* 由来 EfeO の立体構造を EfeO_Iとして初めて決定し、金属結合部位を特定することにより新規な金属結合モチーフを提唱した。また、*E. coli* 由来 EfeU について、大腸菌発現系の可溶化膜画分より精製するとともに X 線回折データを与える結晶と単粒子電子顕微鏡像を取得し、構造解析に向けた技術基盤を構築した。
3. 多様な環境に常在する *Pseudomonas* 属細菌をゲノム構造に基づいて 4 つのグループに分類し、植物由来株を多く含む *P. syringae* グループと *P. fluorescens* グループに Efe 系が偏在することを見いだした。また、*P. fluorescens* において、Efe 系が植物表面における本菌の生育に重要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、細菌の鉄輸送Efe系構成タンパク質EfeBとEfeOの構造機能相関を明らかにするとともに、EfeUの立体構造解明に向けた技術基盤を構築し、植物由来株を多く含む*Pseudomonas*属細菌において、Efe系が植物表面における本細菌の生育に重要であることを示したものである。これらの成果は、生物機能変換学、酵素化学、並びに応用微生物学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和8年1月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）

