

学 位 論 文 題 名

Studies on the properties of iron uptake system
and ferric chelate reductases in *Vibrio anguillarum*.

(*Vibrio anguillarum* における鉄シオンの取り込みシステムの
性質と鉄還元酵素に関する研究)

学位論文内容の要旨

In general, for growth and survival the majority of the microorganisms use iron uptake systems that involve siderophores (iron carriers). After being transported to cytosol as Fe^{3+} -siderophore complexes via cell surface receptors, iron must be released from the complexes for mobilization. It can occur in two major pathways: in the destruction of siderophore or in the enzymatic reduction of iron. The later pathway is probably more feasible because siderophores have a rather low affinity towards ferrous forms of iron. Many of such ferric chelate reductases have been reported in different microorganisms. Concerning *V. anguillarum*, a plasmid-mediated iron uptake system is well characterized and is reported to have strong relation to its pathogenicity. The presence of ferric chelate reductases in *V. anguillarum* has been also reported, however, its property was hardly characterized. It is of growing interest that the ferric chelate reductases can play vital roles in iron uptake and in release of iron from siderophore complexes after uptake. In this study, the author characterized a major ferric chelate reductase in the soluble fraction of *V. anguillarum* E6-5. In addition, some of the iron uptake properties were also studied.

Supplement of iron in the growth medium did not give a clear effect on the total activity of ferric chelate reductase, whereas the cellular distribution of enzyme activity was considerably changed. In cells grown in CM9 medium without iron supplement, the most of the enzyme activity (47%) was found in the cytoplasmic fraction with an increase of its specific activity. On the other hand, in cells grown in the same medium with supplement of iron, most of the activity was recovered in the membrane fraction but its specific activity was unchanged. The above result suggests that supplement of iron may be unrelated to regulation in the synthesis of basal ferric chelate reductase, however, it may lead to alteration in the cellular distribution of enzyme.

Gel electrophoresis revealed the presence of at least five bands with ferric reductase activity in the crude enzyme preparation. One of the ferric reductases, that probably contributed to the

major activity in soluble fractions of *V. anguillarum* E6-5, was partially purified to about 500-folds in a good yield (about 40%) by conventional chromatographic procedures. The enzyme was stable in range of pH 6.5-8.5 and showed optimum pH of activity at pH 7.4. The enzyme activity was strongly inhibited by Cu^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , or Zn^{2+} at 1 mM.

By using partially purified enzyme preparation, we tried to clarify previously unexplained stimulatory effects of flavins. When NADH was used as an electron donor, ferric citrate was reduced at a rate of 280 nmol/mg/min in the absence of FMN, whereas the reduction rate remarkably increased to 4210 nmol/mg/min when FMN was externally added. Riboflavin as well as FAD also gave similar stimulatory effects. On the other hand, when NADPH was as the electron donor, the ferric reduction was observed in the presence of FMN or riboflavin, and not with FAD. The reason for poor potential of FAD is still unknown, however, it may be explained by steric hindrance that disallows the transfer of electron from NADPH to ferric iron via FAD. The enzyme showed lower apparent K_m for NADH than that for NADPH, accompanying with much higher apparent V_{\max} . The apparent K_m for NADH did not differ much even in the absence of flavin, however, the V_{\max} was greatly reduced. These results suggest a possibility that the present enzyme preparation may contain both enzyme activities of NADH-dependent ferric reductase and NADH (NADPH)-dependent FMN reductase, and the latter plausible reaction product, FMNH_2 , can serve as an electron donor in a spontaneous (nonenzymatic) reduction of ferric iron. This may be the reason why this enzyme could reduce many ferric chelates such as ferric citrate, or ferric-EDTA. Now, whether a single enzyme or two separate enzymes can catalyze the above two enzyme reactions was unknown. Considering rather constant ratios of the ferric reduction with or without FMN through purification steps, a single enzyme may catalyze both reactions.

The major enzyme activity in Sephacryl S-100 gel filtration was corresponded to a size of about 26 kDa. The molecular size was similar to those for flavin reductases from *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio fischeri*. N-Terminal sequence of 26 kDa polypeptide showed a high homology with the N-terminal sequences of flavin reductases from *V. harveyi* and *V. fischeri*. Above data can provide a possibility that the 26 kDa polypeptide chain may correspond to ferric chelate reductase. Several degenerated probes were designed in combination of N-terminal sequence information obtained in this study and several reported DNA sequences encoding a C-terminal consensus for similar enzymes (bacterial ferric or flavin reductases). Isolation of ferric chelate reductases and their molecular cloning can provide better knowledge in the understanding biological roles of ferric chelate reductase.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 木 義 雄

副 査 教 授 西 則 雄

副 査 助 教 授 奥 山 英 登 志

学 位 論 文 題 名

Studies on the properties of iron uptake system
and ferric chelate reductases in *Vibrio anguillarum*.

(*Vibrio anguillarum* における鉄シオンの取り込みシステムの
性質と鉄還元酵素に関する研究)

一般に、微生物はその増殖と生存に必須な鉄イオンを確保するために siderophore と呼ばれる有機化合物を鉄イオン運搬体として利用し、安定な鉄-siderophore 複合体を形成し、細胞内へ取り込み、鉄イオンを必要とする各種のタンパク質の生合成に活用していると予測されている。また、鉄イオンを細胞内へ取り込む機構の一つとして、微生物の細胞表面に存在する特異的な受容体分子を介して鉄-siderophore 複合体を細胞質に輸送する経路が報告されている。この場合、細胞質への輸送後に、安定な複合体から鉄イオンの遊離が必要となる。可能な鉄イオンの遊離機構として、鉄イオン運搬体の分解または結合している鉄イオンの還元を伴う経路が予測されている。前者の遊離機構に関しては、多くの研究が行われており、その詳細な機構が提案されているが、鉄イオン運搬体の分解を含んでおり、エネルギー的には不利な機構であると予測されている。他方、後者の還元を伴う鉄イオン遊離機構の関与を示唆する報告は多数存在するが、結論に至っておらず、さらに、不明な点が数多く残されている。

本論文では、魚類病原菌の一つである *Vibrio anguillarum* における鉄イオンの取り込みシステムの解明を研究目的としている。第1に、8菌株の *V. anguillarum* における siderophore 生産能と鉄キレート剤(EDDA)の最小阻害濃度(MIC)を決定し、また、プラスミドの存在を検討し、それらの関連性を検討している。その結果、検討した8菌株は全て siderophore を生産するが、その生産量に大きな差異が存在することが判明した。また、その内の2菌株はプラスミドを欠損するが、高い MIC 値を示し、これらの菌株の siderophore 生産

はプラスミド上ではなく、染色体 DNA 上にコードされている可能性が強いことを明らかにした。これらの結果に基づいて、*V. anguillarum* V-116 および E6-5 を代表菌株として選択し、鉄イオンの濃度変化が及ぼす影響をさらに検討し、鉄イオンが siderophore 生産を抑制する方向に作用することを明らかにしている。また、これらの菌株の外膜および内膜に存在する鉄輸送に関与すると予測されるタンパク質の発現が鉄イオン欠乏に伴い増加することを明らかにしている。

第 2 に、鉄-siderophore 複合体として細胞質に輸送された安定な複合体から鉄イオンを遊離させる機構に関与すると推測される鉄還元酵素(ferric chelate reductase)を精製・分離して、その酵素的特徴を検討し、その存在の明確化に成功している。研究対象の酵素は極めて精製が困難な酵素として知られており、また、多様な細胞内局在性を示す類似の鉄還元酵素が存在することからもその精製・分離の困難さが予測されていた。しかし、さまざまな工夫を行い、約 500 倍にまで精製した。この部分精製酵素を利用することで、これまで不明であった電子供与体が NADH であり、各種フラビン誘導体がこの還元反応を促進することを明らかにしている。さらに、精製した酵素のアミノ末端配列を部分的に決定している。

第 3 に、上記のペプチド配列の情報と既知のフラビン還元酵素に保存的な配列情報に基づいて、DNA プローブを作成して、鉄還元酵素をコードする遺伝子の分子クローニングを実施している。その結果、部分的ではあるが、標的とする鉄還元酵素をコードする遺伝子の存在を確認している。

これらの研究成果を踏まえて、今後、細胞内局在性を異にする鉄還元酵素群の分離・同定を行い、さらに、それら遺伝子の分子クローニング・転写発現制御機構の解析を発展させることで、これまで不明であった鉄イオンの取り込みシステムにおける鉄還元酵素の機能を明らかにする大きな手がかりとなるものと判断される。このような鉄還元酵素群の機能性を解明することは、微生物の病原性発現、宿主動物の組織内での増殖、加えて、海洋環境における鉄イオン獲得機構の解明に大きく寄与するものと思われる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。