

氏名	なか ひがし けん じ 中 東 憲 治
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 1323 号
学位授与の日付	平 成 3 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	大腸菌の可視光感受性変異株に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 竹市雅俊 教授 吉澤 透 教授 志村令郎

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、可視光感受性の*E. coli*の変異株を分離し、これらの変異株を解析することにより、光合成や視覚といった高等生物でみられる「光受容」のプロトタイプを、*E. coli*を使って研究することを目的としている。

最初に分離した変異株 (*vis A* と命名) は、蛍光灯を光源として、約7500ルクスの光を照射した場合、2時間後には生存率が約1/10となる。遺伝子操作により、この遺伝子のクローン化・塩基配列の決定を行い、この遺伝子がヘム生合成の最終段階で、プロトポルフィリンIXをヘムに変換するフェロケレターゼをコードすると予測した。この確証を得るため、申請者は、まず、*vis A* 遺伝子の大部分を失った欠失変異株を分離し、この株が光感受性であることを確認した後、光抵抗性の復帰株を多数分離・解析した。その結果、ほとんどの変異がヘム生合成系の遺伝子にあること、これらヘム生合成系の変異株 (= $\Delta vis A$ 復帰株) に、ヘム合成中間産物を補うと再び光感受性になることを示した。こうした実験結果より、*vis A* 変異株の光感受性は、フェロケレターゼの基質であるプロトポルフィリンIXが細胞内に蓄積する為であると結論している。

次に、申請者は *vis A*⁺/*vis A*⁺ 部分二倍体より、新たに光感受性を示す変異株 (*vis B*) を分離している。*vis B* 変異株は *vis A* 変異株に比べて弱い光感受性を示すこと、染色体地図上の位置は *vis A* の11分付近に対して、63分の異なった位置にマップされることを明らかにした。この *vis B* 遺伝子もクローン化・塩基配列の決定を行い、予想されるアミノ酸配列を解析し、この遺伝子産物がFADを含むモノキシゲナーゼであると推測した。*E. coli*染色体上で、この遺伝子が位置する付近にユビキノン生合成に関与する遺伝子の *ubi H* が、フラビンを含むモノオキシゲナーゼであること、*vis B*⁺ 遺伝子を *ubi H* 変異株に導入した時、その表現型が相補されること等から、*vis B* が *ubi H* と同一遺伝子であると結論している。そして申請者は、*vis B* 変異株の光感受性も、*vis A* 変異株と同様、生合成中間産物の蓄積によると推測している。また、*vis B* 遺伝子のすぐ後には、アミノ酸レベルで約30%の相同性をもつ遺伝子 (*vis C*

と命名)が存在すること、この遺伝子はユビキノン合成には必須ではないが、遺伝子を欠失した大腸菌はやはり光感受性であることを示した。

光感受性のメカニズムを知る上での興味ある事実として、これらの変異株は酸素分子のない条件下では光感受性を示さないことを見出した。そして、申請者は光感受性の機構として次のモデルを提出している。すなわち、上述の変異株細胞中に蓄積した前駆体(たとえばプロトポルフィリンⅨ)に光があたると、これらの前駆体が一種の光増感剤として働き、「活性酸素」を産出し、これが細胞を死に至らしめるというモデルである。酸素分子から直接発生する活性酸素としては、スーパーオキシド、過酸化水素、一重項酸素等が挙げられるが、前の二者によって誘導を受ける遺伝子(たとえば、スーパーオキシドデスムターズの遺伝子)が上記の変異株では、光によって誘発されるか否かを調べている。本論文の光感受性株では、そのような活性酸素によって誘発される遺伝子の誘発はみられず、このことから申請者は、一重項酸素が細胞致死の原因になっているのではないかと推察している。

参考論文1は光受容や活性酸素に関する最近の研究成果に、本論文で記述していた知見を加え、総説として発表したものであり、参考論文2は本論文の *vis A* 遺伝子の同定を行ったものである。その他(5篇)は、本論文とは直接関係ないが、塩基配列の決定法や遺伝子操作を習得した点で、本論文の完成に大きく寄与している。

論文審査の結果の要旨

大腸菌は紫外線に対しては感受性であり、その研究は分子遺伝学の進展に大きく貢献してきた。しかし、可視光に対しては、大腸菌は元来腸内という暗所に棲息し、光には無縁のものと思われがちであった。本論文はこれまでのそうした見解に反し、研究材料として大腸菌を用いて、「生物の光受容」—それは光合成や視覚といった高度に進化したものではなく、光応答現象のプロトタイプと言うべきものではあるが—を研究している点がまず非常にユニークであり、国内・外に例を見ない。

申請者は、分離した光感受性変異株の *vis A* が、ヘム生合成系の最終段階に働くフェロケレターズの遺伝子であって、この遺伝子の欠損がヘム前駆体のプロトポルフィリンⅨの蓄積をもたらし、これが光感受性の原因であることをつきとめた。*vis A* 遺伝子の欠失株から光非感受性の復帰株を分離し、それらを解析し現象のメカニズムに迫るという分子遺伝学的手法を巧みに用いて、これを確証している。

プロトポルフィリンⅨが原因で光感受性になる例として、骨髄性プロトポルフィリン症と呼ばれるヒトの遺伝病がある。この病気はプロトポルフィリンⅨが血中などに多量に蓄積し、表皮近くでは光を受けて溶血などの有害な現象を引き起こす光過敏症であるが、本論文における *vis A* 変異株の光感受性は、大腸菌でのプロトポルフィリン症ということができ、今後、幅広い分野からこの系での研究成果が目ざされよう。

申請者はこうした光感受性変異株が単に一種類だけではないと考え、*vis A*⁺/*vis A*⁺ 部分二倍体から、新たに光感受性変異株 *vis B* を分離し、その解析を行っている。この *vis B* は大腸菌染色体の63分付近に位置し、同じ位置にマップされている *ubiH* と同一遺伝子であり、ユビキノン生合成に関与するフラビンを含むモノキシゲナーゼをコードしていること、さらに *vis B* 遺伝子のすぐ後にアミノ酸配列で相

同性の高い *vis C* 遺伝子を発見した。そしてこの *vis C* 遺伝子の欠失株も光感受性になるという興味ある事実を見い出している。

申請者はこれらの変異株に関して、単に遺伝子の遺伝的・生化学的解析に終止するのではなく、光感受性のメカニズムについても深く研究している。すなわち、これらの変異株の光感受性が酸素分子存在下でのみ見られること、抗酸化剤の効果が観察できることなどから、遺伝的ブロックによって蓄積したある種の生合成中間物質（たとえばプロトポルフィリンIX）に光があたると、それが光増感剤として働き、活性酸素を放出し、細胞を死に至らしめると考えている。活性酸素の関与を調べるための系も、巧妙な分子遺伝学的手法を駆使したものであり、ネガティブな結果からではあるが、一重項酸素の関与を示唆している点が注目される。なお、本研究で得られたヘム生合成経路の各ステップの変異株からの知見は、この合成経路の全貌を理解する上にも大きく寄与するものと考えられる。

よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。