

氏名	かん じょう なお こ 官 上 真 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2533 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科 生物学専攻
学位論文題目	大腸菌ヘム生合成系変異株の解析

論文調査委員 (主 査)
教授 井口 八郎 教授 岡 穆宏 教授 七田 芳則

論 文 内 容 の 要 旨

ヘムはシトクロム、カタラーゼなど多くの酵素の補酵素として働き、呼吸と活性酸素消去に重要な役割を果たす分子である。それ以外にも細胞内及び細胞外の状態を感知するためのセカンドメッセンジャーとしての機能も報告されている。ヘムの前駆体である δ -aminolevulinic acid (以下 ALA と略す) は、動物及び菌類に於いては、グリシンとサクシニル CoA から C4 経路で生成される。一方大腸菌を始めとする原核生物及び植物に於いては、ALA はグルタミン酸から、グルタミル tRNA, glutamate-1-semialdehyde (GSA) を経る C5 経路で生成される。ALA 以降のヘム生合成経路は全ての生物に於いて高度に保存されており、7段階を経てプロトヘムとなる。ヘム生合成経路の中間体である uroporphyrinogen III (UROGEN III) からは、システイン生合成に関わる Siroheme や、メチオニン生合成に関わる VitaminB12 が生成される。また、植物が行う光合成に於いて中心的役割を担うクロロフィルもヘム生合成経路から分岐して合成される。

本論文は二部構成となっており、第一部では、大腸菌 VS101 株 (*hemH* partial defective mutant) の光感受性を相補するダイズ cDNA クロンの単離とその相補機構について調べた。その結果、選択されたファージクローンに含まれていたダイズ cDNA の 2 つの ORF のうち、ORF296 遺伝子がコードするタンパク質が、ALA 以降のあるステップ (おそらく HemB) をブロックすることにより、光感受性の原因となる protoporphyrin IX (PROTO IX) の蓄積量を低下させるために、光感受性を弱く相補することができることと結論した。さらに本論文では、ORF296 タンパク質の大腸菌のホモログ (YicL) を見出し、この YicL にも同様の阻害機能が備わっていることを見出した。ORF296 と *yicL* 遺伝子にコードされるタンパク質は、その予想アミノ酸配列からして、どちらも DUF6 モチーフを持っている。DUF6 は膜貫通モチーフであって、機能未知の多くの膜タンパク質がこれを保持していることがわかっているが、ORF296 タンパク質と YicL タンパク質も膜に結合し、同じく膜結合タンパク質と考えられるヘム生合成経路の一つの酵素、ALA dehydratase (HemB) の発現或いは活性に何らかの影響を与えるものと推測した。

第二部では、大腸菌における新奇なポルフィリン生合成経路について調べた。1998年に偏性嫌気性菌である硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris*) において、新たなポルフィリン生合成経路が報告されたが、大腸菌においてもそれに似た経路があることを示した。すなわち、大腸菌の *hemE* 遺伝子の破壊株を分離し、その株からヘム合成が可能な復帰株を分離することに成功した。この復帰株では UROGEN III から分岐して、*cysG* 遺伝子がコードする S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III - methyl transferase (SUMT) を経て coproporphyrinogen III (COPRO III) → PROTO IX へと生成されると推測した。これを証明するため、復帰株の菌体内に蓄積するポルフィリン類を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより中間産物を調べると共に、UROGEN III を基質とし、放射性同位元素で標識された S-[methyl-³H]-(SAM) を用いて、復帰株の whole homogenate による *in vitro* での酵素反応を試みた。その結果、僅かではあるが COPRO III に [methyl-³H]-(SAM) 由来の ³H-標識されたメチル基が検出され、SUMT によるバイパス経路で COPRO III が合成されると結論した。

論文審査の結果の要旨

細胞にとってはヘムは必須の重要物質であるが、VS101 変異株で見られるように、その前駆体のポルフィリン類の中には光照射によって活性酸素を生成するとか、生体高分子物質に結合するといったことで、その蓄積が生体に害になるケースが知られている。余分なものは分解してしまうというメカニズムと並行して、そうした危険な物質は適量しか作らないという制御メカニズムは、生体にとっては非常に重要なことである。ポルフィリンとクロロフィルは同じ経路で作られるので、植物ではポルフィリン生合成経路はよく動いていて、必然的に細胞内の前駆体の量も多いと考えられる。加えて、光合成を行うため日光を良く浴びるので、ポルフィリン生合成経路の中間体によって活性酸素が発生する危険性も高いはずである。このため、植物では大腸菌にはみられないような強力な活性酸素消去剤や、ポルフィリン生合成経路のより巧妙な制御システムの存在が予想できる。本論文の第一部では、そのような機構に関わる遺伝子を選択する目的で、大腸菌ミュータントの光感受性の性質を分子遺伝学的に巧みに利用して、ダイズ cDNA ライブラリーから新奇な遺伝子をスクリーニングした。選択されたファージクローンに含まれていたダイズ cDNA 上の 2 つの ORF のうち *ORF296* 遺伝子を導入すると、大腸菌菌体内の PROTOIX の蓄積量が低下し、活性酸素の発生が減少するためそのミュータントが光に非感受性になること、PROTOIX の蓄積量の低下は、PROTOIX の合成が生合成経路の上流部でブロックされることを生化学的な実験から明らかにした。さらに興味深いことに、*ORF296* の大腸菌のホモログを発見し、そのホモログの *YicL* にも同様の機能があることを明らかにした。アミノ酸配列のコンピューターによる解析から、*ORF296* と *yicL* にコードされるタンパク質には DUF6 モチーフがあることを見出し、その性質から遺伝子の機能を推察・議論した。本研究は、遺伝子産物そのものの分子メカニズムには迫っていないが、テーマの着眼点がすばらしく、多彩な研究手法を駆使してユニークな発見をしたことは高く評価される。

第二部の研究においては、大腸菌ミュータントを利用して、「大腸菌にも偏性嫌気性菌である硫酸還元菌と似たポルフィソン生合成経路がある」という発見をした。硫酸還元菌は大量のヘムとシトクロムを生合成し、嫌気呼吸によりエネルギーを作り出しているが、この菌の培養は嫌気性であるが故に難しく、悪臭を伴うなどの困難がある。本研究により、大腸菌にも硫酸還元菌と同じ新奇なポルフィリン生合成経路があるということが示されたので、今後は取り扱いが容易な大腸菌でもって実験が進むと予想され、本研究がこの研究分野の進展に大きく貢献するものと期待される。導かれた結論は、大腸菌の *hemE* 遺伝子の破壊株を作製し、この遺伝子をバイパスするミュータントを分離したことに端を発しているが、分子遺伝学的な解析に留まらず、生化学的に中間産物の抽出、同定した一連の研究は、この結論を確固たるものになっている。

よって、第一部、第二部からなる本論文は、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

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