

学 位 論 文 題 名

クロロフィル合成酵素ビニルレダクターゼの遺伝子の同定と  
その酵素的性質から見たクロロフィル合成経路の提唱

学位論文内容の要旨

クロロフィルは、光合成生物にとって、光エネルギーを集め電子エネルギーに変換する重要な分子である。

クロロフィル合成経路の研究はモノビニルクロロフィルで主に行われ、クロロフィル合成酵素や、その酵素をコードしている遺伝子もまたほとんどが決定している。

しかし、その中で 3' 8-ジビニルプロトクロロフィライド *a* 8-ビニルレダクターゼ(DVR) は唯一未知の酵素であり、遺伝子が決定されていない。DVR の研究はキュウリの膜を用いた酵素的研究は行われてきたが、粗精製タンパク質での酵素活性の測定であり、他の膜物質による影響がある可能性が考えられる。そのため、DVR がクロロフィル合成中間体のどの段階で機能する酵素であるのかがわからず、現在のモノビニルクロロフィル合成経路は仮説であると言える。

本研究で、私は EMS 処理によってモノビニルクロロフィルではなくジビニルクロロフィルを蓄積する *A. thaliana* 変異株の原因遺伝子(At5G18660)を決定した。変異株の原因遺伝子はイソフラボンレダクテース遺伝子と相同性のある遺伝子であった。また、At5G18660 遺伝子をジビニルクロロフィルを蓄積する変異株に導入したところ、色素の組成はモノビニルクロロフィルに回復した。さらに At5G18660 の大腸菌発現タンパク質はジビニルクロロフィライド *a* をモノビニルクロロフィライド *a* に変換する DVR 活性を単独で持っていたことがわかった。この結果から、モノビニルクロロフィル合成遺伝子のすべてが決定したことになる。また、*in vitro*、*in vivo* での DVR の基質特異性の実験から、DVR の基質は主にクロロフィライド *a* であることが明らかになった。よって、DVR の基質がこれまで考えられてきたジビニルプロトクロロフィライド *a*、または複数のジビニル型のクロロフィル中間体ではなく、ジビニルクロロフィライド *a* であったことを踏まえ、本研究ではモノビニルクロロフィル合成の新たな経路を提案している。さらに、光合成生物で唯一ジビニルクロロフィルを光合成色素として利用する *Prochlorococcus* が DVR ホモログを持たず、その近縁種である *Synechococcus* sp. WH8102 が DVR ホモログを持っていたという結果から、*Prochlorococcus* は *Synechococcus* が DVR 遺伝子を失うことによって誕生したことを提案している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩  
副 査 教 授 森 川 正 章  
副 査 助 教 授 山 崎 健 一  
副 査 教 授 山 本 興 太 郎 (大学院理学研究科)

## 学位論文題名

### クロロフィル合成酵素ビニルレダクターゼの遺伝子の同定と その酵素的性質から見たクロロフィル合成経路の提唱

クロロフィルは、光合成生物にとって、光エネルギーを集め化学エネルギーに変換する重要な分子である。

クロロフィル合成経路の研究は、その中間体を蓄積するクロレラの変異体の解析から始まった。その後の活発な研究によって、クロロフィル合成酵素や、それらの酵素をコードしている遺伝子は、ほとんどが決定された。しかし、その中で3, 8-ジビニル(プロト)クロロフィリド  $\alpha$  8-ビニルレダクターゼ(DVR)が、唯一遺伝子が決定されていない酵素として残されていた。

DVR はクロロフィルの 8 位のビニル基をエチル基に変換する酵素である。DVR の研究は、キュウリのエチオプラストや葉緑体から精製された膜断片を部分的に精製した、粗精製タンパク質を用いて行われてきた。これらの研究結果から、DVR が 8 位にビニル基を持つ複数のクロロフィル合成中間体を基質にしている可能性や、基質の異なる複数の酵素の存在が指摘されている。

しかし、この粗精製タンパク質には、他の酵素や酵素活性に影響する物質の混入が考えられ、酵素活性が正確に測定できない可能性がある。そのため、DVR がクロロフィル合成経路のどの段階で機能する酵素か、さらには DVR だけがクロロフィルの 8 位のビニル基の還元に関わる酵素かは不明であり、未だクロロフィル合成経路も確定していない。

本研究では、EMS 処理変異株によってジビニルクロロフィルを蓄積する *A. thaliana* 変異株(dvr 変異株)を単離し、DVR をコードする遺伝子を決定した。

dvr 変異株のポジショナルクローニングの結果から、dvr 変異株の原因遺伝子は第 5 染色体上にある At5G18660 遺伝子であることを決定した。At5G18660 遺伝子はイソフラボンレダクターゼ遺伝子と相同性があった。また、*A. thaliana* 野生株の At5G18660 遺伝子をジビニルクロロフィルを蓄積する dvr 変異株に導入したところ、dvr 変異株の色

素がモノビニルクロロフィルに回復した。さらに At5G18660 の大腸菌発現タンパク質はジビニルクロロフィリド *a* をモノビニルクロロフィリド *a* に変換する DVR 活性を持つことがわかった。この結果から、At5G18660 遺伝子は DVR をコードすることが明らかになり、クロロフィル *a* 合成遺伝子のすべてが決定された。

さらに、DVR の基質を調べるため、ジビニルプロトクロロフィリド *a*、ジビニルクロロフィリド *a*、*b*、ジビニルクロロフィル *a*、*b* を用いて DVR 活性の測定を行った。その結果、DVR の基質はジビニルクロロフィリド *a* であり、これまで DVR の基質として考えられていたジビニルプロトクロロフィリド *a* に対する活性は検出限界以下であることがわかった。さらに、ジビニルプロトクロロフィリド *a* とジビニルクロロフィリド *a* を基質としたときの、*in vivo* での DVR 活性を調べた。暗所で生育した *A. thaliana* の野生株はジビニルプロトクロロフィリド *a* とモノビニルプロトクロロフィリド *a* を蓄積した。短時間の光照射によって、ジビニルプロトクロロフィリド *a* とモノビニルプロトクロロフィリド *a* は共にモノビニルクロロフィリド *a* に変化した。このとき、ジビニルクロロフィリドの蓄積が見られなかったことは、ジビニルプロトクロロフィリドがジビニルクロロフィリドに変換された後、DVR によって、すばやくモノビニルクロロフィリドに還元されたことを示している。また、再び暗所に戻した植物がモノビニルプロトクロロフィリド *a* を蓄積するまでには、長い時間がかかった。これらの結果から、DVR の主な基質はジビニルクロロフィリド *a* であり、ジビニルプロトクロロフィリド *a* に対する DVR の活性は非常に低いことを明らかにした。

これらの研究により、クロロフィルの 8 位のビニル基を還元する酵素は DVR だけ一つであり、DVR の基質はジビニルプロトクロロフィリド *a* やその他複数のジビニル型のクロロフィル中間体ではなく、ジビニルクロロフィリド *a* であることが明らかになった。そしてこれらの結果から、クロロフィル合成の新たな経路を提案した。さらに、光合成生物で唯一ジビニルクロロフィルを光合成色素として利用する *Prochlorococcus* が DVR ホモログを持たず、その近縁種である *Synechococcus* sp. WH8102 が DVR ホモログを持っていることを見出し、*Prochlorococcus* は *Synechococcus* が DVR 遺伝子を失うことによって誕生したことを提案した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（地球環境科学）の学位を授与される資格を有するものと判定した。