

学位論文題名

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来プロトポルフィ
リノーゲン IX オキシダーゼ遺伝子の同定と機能解析

学位論文内容の要旨

ヘムやクロロフィルなどのテトラピロール化合物は、呼吸や光合成において重要な役割を担っている。テトラピロール生合成経路のうち、初期の5-アミノレブリン酸 (ALA) から、プロトポルフィリン IX (Proto IX) までの6段階の酵素反応は、ほとんど全ての生物に共通の反応であると考えられている。

今回研究の対象とするプロトポルフィリノーゲンIXオキシダーゼ (Protox) は、この共通合成経路の最終段階において、プロトポルフィリノーゲンIX (Protogen IX) から6個の電子を奪ってプロトポルフィリンIXを合成する鍵酵素である。

これまでの研究により、真核生物および好気性細菌は *HemY* 遺伝子にコードされるおよそ 55 kDa の Protox を、大腸菌やサルモネラ菌は *HemG* 遺伝子にコードされるおよそ 21 kDa の Protox を持っていることが明らかになっている。

しかし、ゲノム配列の解析されたラン藻の多くの種や、Proteobacteria 等のバクテリアおよび古細菌においては *HemY* または *HemG* のホモログは見つかっていない。また、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、*HemY* 型の Protox の阻害剤であるジフェニルエーテル系除草剤に耐性を示す。これらのことから、ラン藻はこれまで報告されているタイプとは異なる新規の Protox を有していると考えられる。ラン藻 Protox の解明は、光合成色素系の進化の過程を探る上でも重要であり、さらには本遺伝子を高等植物へ導入することにより除草剤耐性植物の作出など産業面への応用も期待できる。そこで、本研究ではラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Protox 遺伝子を同定し、その遺伝子産物について機能解析することを目的とした。

まず、遺伝子探索の手法として、Protox 欠損大腸菌を用いた相補的なスクリーニングを実施した。同手法は、シロイヌナズナやタバコ等の Protox 研究において実績のある方法であったが、この手法ではラン藻 Protox 遺伝子を同定することはできなかった。

そこで、遺伝子探索の手法をトランスポゾンを利用したラン藻変異株スクリーニングへと変更した。Protox は生物にとって必須であると考えられるため、トランスポゾン処理により、Protox 活性を失ったラン藻変異株はヘムやクロロフィルを合成することができず、死滅してしまうことが予想された。そうなれば変異株を見つけ出すことは不可能である。この問題を解決するために、あらかじめシロイヌナズナ由来 *HemY* 型 Protox 遺伝子を導入したラン藻形質転換株 (AT 株と命名) を作成し、AT 株に対してトランスポゾンを用いたランダムな遺伝子破壊を行った。この手法の最大の利点は、仮にラン藻の Protox が破壊された場合においても、事前に導入した植物の Protox によってその機能が相補され、通常条件では生育が可能なことである。

得られた遺伝子変異株については、*HemY* 型の Protox の阻害剤であるジフェニルエーテル系除草剤 Acifluorfen に対する感受性を指標にスクリーニングを実施した。その結果、Acifluorfen の存在下で特異的に死滅する変異株が得られ、トランスポゾンタグの入った遺伝子として機

能未知のタンパク質をコードする *slr1790* 遺伝子を特定した。*slr1790* 遺伝子は膜貫通構造を有することが予想され、呼吸に関連するタンパク質 NADH dehydrogenase complex I のサブユニットのひとつである NuoM と類似していた。

確認のため、ラン藻野生株についても *slr1790* 遺伝子の破壊株の作成を試み、形質の確認を行った。その結果、ラン藻野生株に対しては部分的な遺伝子破壊株 (WTSK 株と命名、heteroplasmic) しか得られず、*slr1790* 遺伝子はラン藻の生育に必須であり、その機能欠損は導入したシロイヌナズナ由来 Protox 遺伝子によって相補されることが確認できた。

加えて、作成した遺伝子破壊株について HPLC による色素分析を行ったところ、WTSK 株では Protox 変異株に特徴的な Proto IX の異常蓄積が認められた。更に、光合成細菌 *Rhodobacter spaeroides* の *slr1790* ホモログタンパク質 (Rs-*slr1790* タンパク質) を大腸菌の組換えタンパク質生産系を用いて調製し、*in vitro* で Protox 酵素活性を確認することができた。以上の結果より、ラン藻 Protox 遺伝子として *slr1790* 遺伝子を同定し、命名法に従い *hemJ* 遺伝子と名付けた。

slr1790 (hemJ) ホモログの生物間分布をラン藻について調査した結果、ラン藻の多くは *hemJ* ホモログを持つことがわかった。*hemJ* ホモログを持たないラン藻は *hemG*、あるいは *hemY* ホモログを持ち、興味深いことに原始ラン藻である *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 は *hemJ* ホモログと *hemY* ホモログの両方を持っていた。ラン藻間において *hemJ*、*hemY*、*hemG* の分布パターンがこのような排他的であるのは、それぞれが同じ機能を有し、*hemJ* が Protox をコードすることを支持する結果と考えられた。

更に、ゲノム配列が公開されている全生物を対象に相同性検索を行った結果、*hemJ* ホモログは Bacteroidetes や Proteobacteria に広く分布することがわかった。それらの多くはこれまで Protox 遺伝子が不明の生物であった。一方、大部分の古細菌およびいくつかのバクテリア群 (Acidobacteria、Actinobacteria 等) のゲノムにおいて、3 種類 (*hemJ*、*hemY*、*hemG*) の Protox のいずれのホモログも見つからなかった。従って、これらの生物はまだ同定されていないタイプの Protox 遺伝子を持つ可能性が考えられる。

テトラピロール生合成の進化の歴史の中で、このように 3 種類以上の異なった Protox 遺伝子が存在するのは非常に興味深い点である。本研究において、*hemJ* 型 Protox の詳細な反応機構までは立証できなかったが、今後 *hemY*、*hemG* も含め、それぞれの Protox の酵素学的な特性が更に明らかになれば、例えば各 Protox の酸素に対する感受性や、Protox の前後の段階を触媒する酵素との親和性等により、Protox をコードする遺伝子がモザイク状に分布する進化を遂げた理由を解明する起点になるものと期待される。

また、*slr1790* 遺伝子をシロイヌナズナへ導入し、Protox 阻害剤 Acifluorfen をドッキング処理した検討において、形質転換植物の除草剤耐性を確認することができた。*slr1790 (hemJ)* ホモログは、真核生物の持つ *hemY* ホモログとは全く構造が異なることから、除草剤耐性作物の創出の他に、*hemJ* を標的酵素とした抗バクテリア剤の探索にも利用できると考えられ、応用研究への発展にも期待が持たれた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 歩
副 査 教 授 山 本 興太朗
副 査 准教授 田 中 亮 一

学位論文題名

ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 由来プロトポルフィ リノーゲン IX オキシダーゼ遺伝子の同定と機能解析

近年、さまざまな生物のゲノム配列が解読されたことによって、バクテリアの代謝に対する知見が飛躍的に増大した。しかし、ほとんどすべての生物に必要と考えられているテトラピロール化合物の代謝経路に関しては、いくつかの重要な酵素の遺伝子ホモログが多くのバクテリアのゲノム上に見つからず、これらのバクテリアは未同定の（新規の種類）酵素を有すると予想されていた。著者はこれらの未同定の酵素の中でも Protoporphyrinogen IX oxidase (Protox) に着目した。この酵素は、Protoporphyrinogen IX から Protoporphyrin IX の合成を触媒する。この反応はヘムおよびクロフィル合成経路の共通の反応経路の最後に位置する重要な反応である。真核生物ではこの反応は short-chain dehydrogenase の protein family に属する HemY タンパク質が触媒し、 γ -proteobacteria では FMN-binding reductase の protein family に属する HemG タンパク質が触媒する。しかし、ラン藻を含む多くのバクテリアには、HemY タンパク質をコードする遺伝子（ホモログ）も HemG タンパク質をコードする遺伝子（ホモログ）も見つかっていなかった。

そこで筆者はラン藻の Protox をコードする遺伝子を見つけるために、遺伝学的な手法を用いた。単純に Protox を欠損する変異株を得るという手法は難しいために、筆者は一度ラン藻の野生株に植物 (*Arabidopsis thaliana*) の HemY 遺伝子を導入した上で変異株の作出をおこなうという工夫を取り入れた。さらに、HemY 遺伝子の存在下で Protox 変異株を識別するために、HemY タンパク質の阻害剤 acifluorfen を培地に加えてスクリーニングを行った。これらのストラテジーは他の酵素の遺伝子の同定にも利用可能な新しい手法である。この手法によって、筆者はラン藻の Protox の変異株を得ることに成功した。さらに、この原因遺伝子である *slr1790* 遺伝子の光合成細菌のホモログからタンパク質を合成し、このタンパク質が Protox 活性を有することを証明した。バクテリアにおける新規ヘム合成遺伝子の発見はおよそ 15 年ぶりであり、筆者はこの遺伝子を *hemJ* と名付けた。

解読されているゲノム配列のデータベースを調べたところ、多くのバクテリア、特に Bacteroidetes, proteobacteria (γ -proteobacteria 以外)、ラン藻などでは、HemY, HemG のホモログはほとんど見つからず、かわりに HemJ のホモログが見つかった。これらのバクテリアでは HemJ が主要な Protox 遺伝子であることがわかった。また、HemY, HemG, HemJ のいずれももたないバクテリアが存在することが明らかになり、この結果から、さらに別の Protox 遺伝子が存在することが示唆された。

これらの結果は、バクテリアのテトラピロール代謝の酵素と進化について新知見を得たものであり、テトラピロール代謝の基礎的知見に貢献するところ大なるものがある。また、Protox は農薬の主要な標的酵素であることから、これらの知見は新たな農薬耐性の植物の作出にも応用できる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。