

氏名	さいき りょういち 西岐 良一
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	甲第352号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	真核生物由来の長鎖プレニルニリン酸合成酵素及びユビキノン非生産分裂酵母の表現型の解析 (Analyses of long-chain prenyl diphosphate synthases from eukaryotes and phenotypes of ubiquinone deficient fission yeast)
学位論文審査委員	(主査) 川向 誠 (副査) 田中克典 松田英幸 山田 守 山野好章

学位論文の内容の要旨

ユビキノン(UQ)は、原核生物では原形質膜に、真核生物ではミトコンドリア内膜に局在し、電子伝達系の必須因子として知られている。ユビキノンの側鎖長の違いは生物種の分類に用いられ、例えば *Escherichia coli* は UQ-8、mouse は UQ-9、そして *Schizosaccharomyces pombe* や human は UQ-10 を合成する。この側鎖長の違いは生物が保持するポリプレニルニリン酸合成酵素によって決定されている。ユビキノンは p-hydroxybenzoate (PHB) の合成を初発とし、8つの酵素、9段階のステップを経て合成され、大腸菌と出芽酵母では合成経路が若干異なっている。出芽酵母においてユビキノン合成に関わる8つの COQ 遺伝子のうち、6つの遺伝子はすでに単離されているが、COQ4 及び COQ8 の機能は未だ解明されていない。

ユビキノンは一定の長さのイソプレノイド鎖を持ち、ポリプレニルニリン酸合成酵素によって側鎖が供給されている。長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、*E. coli*、*Gluconobacter suboxidans* などの原核生物において研究が報告されているが、真核生物ではあまり研究が進んでいない。

第1章において本論文のバックグラウンドについて述べた。

第2章において著者は分裂酵母のユビキノン合成系に関わる abc1SP (coq8Sp) の機能解析及び coq8Sp 破壊株の表現型解析について述べた。分裂酵母由来 abc1Sp 遺伝子は出芽酵母の ABC1 のホモログとして単離されたが、ユビキノン合成系との関わりについてまだ報告されていない。

そこで、著者は分裂酵母の *coq8Sp* 欠損株の表現型を解析したところ、ユビキノロン欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上でのシステインまたはグルタチオン要求性、硫化水素発生という他のユビキノロン生産株と同様の表現型を示した。この結果は *Coq8Sp* がユビキノロン合成に必須であること及びユビキノロンが分裂酵母において抗酸化剤として機能していることを示唆する。ユビキノロンの抗酸化機能について確認するため、酸化ストレス誘導性でカタラーゼをコードする *ctt1* の発現量を確認したところユビキノロン非生産株において *ctt1* の誘導が確認された。この結果は、ユビキノロン非生産株が酸化ストレスを蓄積し、ユビキノロンに抗酸化機能があることを示唆する。また、分裂酵母のユビキノロン非生産株は硫化水素発生という興味深い表現型を示す。この表現型はユビキノロンと硫黄代謝の関わりについて示すものである。

第3章において著者は分裂酵母のデカプレニルニリン酸合成酵素は *Dps1* と新規サブユニット *Dlp1* と複合体として機能することを報告する。著者はまず分裂酵母のゲノム DNA データベースを用いて *Dps1* と相同性の高い遺伝子を見出し、*Dps1* のパートナーとなり得る *Dlp1* を検索した。*Dlp1* は保存領域である domain I から domain VII を持つが、全てのプレニルニリン酸合成酵素に存在する DDXXD 配列を含んでいなかった。著者は *dlp1* 破壊株を作製し表現型の解析を行ったところ、この破壊株はユビキノロンを合成できず、典型的なユビキノロン生産株の表現型を示した。また、大腸菌において、*dps1* と *dlp1* を同時に発現したところ、大腸菌が本来保持している UQ-8 に加えて、少量の UQ-10 の合成が確認された。そこで、*Dps1*-*Dlp1* 複合体の分子量を測定するため、大腸菌において融合タンパク質である GST-*Dlp1* と His-*Dps1* を発現させ、その粗タンパク質に重合剤 disuccinimidyl suberate (DSS) を作用させ、SDS-PAGE、ウエスタンブロット解析を行ったところ、約 175 kDa の複合体が検出された。この大きさは計算上のヘテロ4量体である 188 kDa とほぼ一致した。これらの結果により分裂酵母由来 *Dps1*-*Dlp1* はヘテロテトラマーを形成することを証明した。

第4章において著者はヒト、マウス由来長鎖プレニルニリン酸合成酵素の解析を行った。これらの酵素は分裂酵母と同じくヘテロ複合体を形成すると考え、著者はヒト及びマウス由来 *Dps1* ホモログと *Dlp1* ホモログを単離し、ヒトのホモログを hDPS1 及び hDLP1、マウスのホモログを mSDS1 及び mDLP1 と命名した。大腸菌において両生物種由来 *Dps1* ホモログまたは *Dlp1* ホモログを単独で発現した場合は、大腸菌由来 UQ-8 のみ検出されたのに対し、mSDS1 と mDLP1 を同時に発現させた株では UQ-9 が、hDPS1 と hDLP1 を同時に発現させた株では UQ-10 が検出され、*in vitro* での活性測定においてソラネシルニリン酸合成酵素活性及びデカプレニルニリン酸合成酵素活性をそれぞれ確認した。そこで、マウス由来ソラネシルニリン酸合成酵素の複合体サイズを測定するため、GST-mSDS1 及び His-mDLP1 融合タンパク質を発現した大腸菌より粗タンパクを調製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより複合体サイズを測定したところ、この複合体は 230 kDa であった。この分子量はマウス由来ソラネシルニリン酸合成酵素のヘテロ4量体の推定分子質量である 227 kDa と一致した。

以上、これらのことから著者は新たに以下のことを証明した。(1) 分裂酵母の *coq8Sp* (*abc1Sp*) 遺伝子破壊株の表現型解析によりこの遺伝子がユビキノロン合成に関わることを証明し

た。また、分裂酵母のユビキノノン非生産株において酸化ストレスが蓄積していることを確認した。

(2) 分裂酵母由来デカプレニルニリン酸合成酵素の活性発現に必須な新規遺伝子 *dlp1* を単離した。また *Dps1* と *Dlp1* がヘテロ 4 量体を形成して活性発現することを証明した。(3) マウス及びヒト由来長鎖プレニルニリン酸合成酵素遺伝子を単離した。哺乳類由来長鎖プレニルニリン酸合成酵素は分裂酵母と同様にヘテロ 4 量体を形成することを証明した。

論文審査の結果の要旨

ユビキノノン (UQ) は、原核生物では原形質膜に、真核生物ではミトコンドリア内膜に局在し、電子伝達系の必須因子として知られている。ユビキノノンの側鎖長の違いは生物種の分類に用いられ、例えば *Escherichia coli* は UQ-8、mouse は UQ-9、そして *Schizosaccharomyces pombe* や human は UQ-10 を合成する。この側鎖長の違いは生物が保持するポリプレニルニリン酸合成酵素によって決定されている。ユビキノンは *p*-hydroxybenzoate (PHB) の合成を初発とし、8つの酵素、9段階のステップを経て合成され、大腸菌と出芽酵母では合成経路が若干異なっている。出芽酵母においてユビキノノン合成に関わる8つの *COQ* 遺伝子のうち、6つの遺伝子はすでに単離されているが、*COQ4* 及び *COQ8* の機能は未だ解明されていない。

ユビキノンは一定の長さのイソプレノイド鎖を持ち、ポリプレニルニリン酸合成酵素によって側鎖が供給されている。長鎖プレニルニリン酸合成酵素は、*E. coli*、*Gluconobacter suboxidans* などの原核生物において研究が報告されているが、真核生物ではあまり研究が進んでいない。

分裂酵母由来 *abc1Sp* 遺伝子は出芽酵母の *ABC1* のホモログとして単離されたが、ユビキノノン合成系との関わりについてまだ報告されていない。そこで、分裂酵母の *coq8Sp* 欠損株の表現型を解析したところ、ユビキノノン欠損、酸化ストレス感受性、最少培地上でのシステインまたはグルタチオン要求性、硫化水素発生という他のユビキノノン生産株と同様の表現型を示した。この結果は *Coq8Sp* がユビキノノン合成に必須であること及びユビキノノンが分裂酵母において抗酸化剤として機能していることを示唆する。ユビキノノンの抗酸化機能について確認するため、酸化ストレス誘導性でカタラーゼをコードする *ctt1* の発現量を確認したところユビキノノン非生産株において *ctt1* の誘導が確認された。この結果は、ユビキノノン非生産株が酸化ストレスを蓄積し、ユビキノノンに抗酸化機能があることを示唆する。また、分裂酵母のユビキノノン非生産株は硫化水素発生という興味深い表現型を示す。この表現型はユビキノノンと硫黄代謝の関わりについて示すものである。

次に分裂酵母のデカプレニルニリン酸合成酵素は *Dps1* と新規サブユニット *Dlp1* と複合体として機能することを報告している。分裂酵母のゲノム DNA データベースを用いて *Dps1* と相同性の高い遺伝子を見出し、*Dps1* のパートナーとなり得る *Dlp1* を検索した。*Dlp1* は保存領域である domain I から domain VII を持つが、全てのプレニルニリン酸合成酵素に存在する DDXXD 配列を含んでいなかった。*dlp1* 破壊株を作製しその表現型の解析を行ったところ、この破壊株はユビキノ

ンを合成できず、典型的なユビキノン生産株の表現型を示した。また、大腸菌において、*dps1*と*dlp1*を同時に発現したところ、大腸菌が本来保持しているUQ-8に加えて、少量のUQ-10の合成が確認された。そこで、Dps1-Dlp1複合体の分子量を測定するため、大腸菌において融合タンパク質であるGST-Dlp1とHis-Dps1を発現させ、その粗タンパク質に重合剤disuccinimidyl suberate (DSS)を作用させ、SDS-PAGE、ウエスタンブロット解析を行ったところ、約175 kDaの複合体が検出された。この大きさは計算上のヘテロ4量体である188 kDaとほぼ一致した。これらの結果により分裂酵母由来Dps1-Dlp1はヘテロテトラマーを形成することを証明した。

第3にヒト、マウス由来長鎖プレニルニリン酸合成酵素の解析を行っている。これらの酵素は分裂酵母と同じくヘテロ複合体を形成すると考え、ヒト及びマウス由来Dps1ホモログとDlp1ホモログを単離し、ヒトのホモログをhDPS1及びhDLP1、マウスのホモログをmSDS1及びmDLP1と命名した。大腸菌において両生物種由来Dps1ホモログまたはDlp1ホモログを単独で発現した場合は、大腸菌由来UQ-8のみ検出されたのに対し、*mSDS1*と*mDLP1*を同時に発現させた株ではUQ-9が、*hDPS1*と*hDLP1*を同時に発現させた株ではUQ-10が検出され、*in vitro*での活性測定においてソラネシルニリン酸合成酵素活性及びデカプレニルニリン酸合成酵素活性をそれぞれ確認した。そこで、マウス由来ソラネシルニリン酸合成酵素の複合体サイズを測定するため、GST-mSDS1及びHis-mDLP1融合タンパク質を発現した大腸菌より粗タンパクを調製し、ゲル濾過クロマトグラフィーにより複合体サイズを測定したところ、この複合体は230 kDaであった。この分子量はマウス由来ソラネシルニリン酸合成酵素のヘテロ4量体の推定分子質量である227 kDaと一致した。

これらの研究成果は、真核生物におけるユビキノン側鎖合成経路が、原核生物とは異なった形をとっていることを証明したもので、ユビキノンの生合成系に新しい知見を付与し、ユビキノンの新たな機能についても知見を与えたもので、新規性の高い発見である。