

学位論文審査の結果の要旨

氏名	張 玫
審査委員	主査 川向 誠 (印) 副査 中川 強 (印) 副査 山野 好章 (印) 副査 石川 孝博 (印) 副査 松下 一信 (印)
題目	出芽酵母と分裂酵母の長鎖プレニルニリン酸合成酵素の比較特性
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>ユビキノン (UQ) は、キノン骨格である 4-ヒドロキシ安息香酸にイソプレノイド側鎖が付加することにより形成し、幅広くの生物に存在している。UQ は主に原核生物の原形質膜及び真核生物のミトコンドリア内膜に局在している。UQ は電子伝達系の必須因子として機能し、その他にも抗酸化物質としての役割などが知られている。UQ の生合成経路は、大腸菌や出芽酵母においてそれぞれ解明された。8つの酵素及び9段階の反応は UQ 生合成に関わると考えられる。UQ のイソプレノイド側鎖長はポリプレニルニリン酸合成酵素が決定し、生物種によって異なる。例えば、出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) は UQ-6、大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) は UQ-8、分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) は UQ-10 を合成する。また、ポリプレニルニリン酸合成酵素はホモダイマー型、ヘテロダイマー型及びヘテロテトラマー型に分類されている。</p> <p>申請者は分裂酵母や大腸菌においてヘキサプレニルニリン酸合成酵素 Coq1 の特性の解析について調べた。出芽酵母では Coq1 は UQ イソプレノイド側鎖の合成反応を触媒する。Coq1 を大腸菌で発現させたところ、UQ-6 の合成が確認できたため、Coq1 は大腸菌内で単独で活性を有し、Coq1 は大腸菌の側鎖合成酵素 IspB の代りに機能できることが分かった。分裂酵母では、UQ のイソプレノイド側鎖は Dps1 と Dlp1 のヘテロマーからなるデカプレニルニリン酸合成酵素により合成される。この二つの遺伝子を 1 つでも破壊すると、UQ 合成不能、最少培地上での生育遅延といった表現型を示す。プラスミドで破壊した遺伝子を導入することでこれらの表現型は回復する。申請者は Coq1 を分裂酵母の $\Delta dps1$ 及び $\Delta dlp1$ でそれぞれ発現させ、最少培地上での生育を観察したところ、$\Delta dlp1$ では生育の回復が見られたが、$\Delta dps1$ では生育遅延が起きていた。興味深いことに、<i>COQ1</i> を発現させた $\Delta dlp1$ 株から予想した UQ-6 ではなく、UQ-9 と UQ-10 が検出された。この形質転換体からデカプレニルニリン酸合成酵素活性も検出された。申請者は免疫共沈により Coq1 と Dps1 の結合を証明し、分裂酵母内では Coq1 と Dps1 がヘテロテトラマー形成していることを見いだした。これらの結果により、Coq1 は大腸菌や出芽酵母では単独で機能するが、分裂酵母内では Coq1 と Dps1 はヘテロ複合体を形成し機能することが判明した。これらの結果はプレニルニリン酸合成酵素がホモ型からヘテロ型へと進化したことを考える上で興味深い結果である。</p>	

申請者は分裂酵母の UQ 欠損株ではどのように sulfide が過剰蓄積するのかを調べるため、sulfide 代謝に関わると考えられた遺伝子の破壊株及び UQ 欠損株を用いて、sulfide の蓄積を比較した。分裂酵母では *sir1* は sulfide の合成に関わる唯一の遺伝子であることが分かった。また、sulfide はシステイン合成に最も消費されていることが考えられた。更に、システインの添加により sulfide の蓄積量は減少した。sulfide の代謝メカニズムと UQ の関係を更に明らかにするため、*cys1a* (cysteine synthase)、*met17* (homocysteine synthase)、*hmt2* (sulfide quinone oxidoreductase) 遺伝子を UQ 欠損株などでそれぞれ発現させた。これらの形質転換体では sulfide 蓄積量の変化を調べたところ、*hmt2* を高発現した UQ 欠損株以外はどれも sulfide 蓄積量は減少した。これらの結果により、sulfide の代謝には UQ 依存的な及び UQ 非依存的な 2 種類のメカニズムが関わることが分かった。

申請者は遺伝子工学方法により大腸菌の生産する MK の側鎖長を変えることについて報告した。UQ と MK のイソプレノイド鎖は、オクタプレニルニリン酸合成酵素 IspB により決定される。*ispB* 破壊株 K0229 において、他種生物由来の *ispB* ホモログ遺伝子を発現させると、UQ-6、7、9、10 が合成できる。MK の種類は同様に変わるかを調べるため、申請者はこれらの株の MK 種類を調べたが、MK はほぼ検出されなかった。次に申請者は出芽酵母由来のヘキサプレニルニリン酸合成酵素遺伝子 *COQ1*、*Haemophilus influenzae* 由来のヘプタプレニルニリン酸合成酵素遺伝子、*Rhodobacter capsulatus* 由来のソラネシルニリン酸合成酵素遺伝子 *sdsA* 及び *Gluconobacter suboxydans* 由来のデカプレニルニリン酸合成酵素遺伝子 *ddsA* を発現用プラスミド pBSSK-COQ1、pMN18、pRC10 及び pLD5 を *ubiA* 破壊株である MU1227 にそれぞれ導入した。pRC10 及び pLD5 を発現させた形質転換体から MK を抽出したところ、大腸菌本来保持している MK-8 に加え MK-9 と MK-10 が検出された。この結果から、他種生物由来ポリプレニルニリン酸合成酵素遺伝子を発現することで、MK の側鎖長を調節できることが示唆された。

以上の結果はコエンザイム Q の合成と機能に関する優れた研究成果であり、本論文は博士（農学）の学位論文に値すると認められる。