

論文内容の要旨

申請者氏名 蘆田 弘樹

近年、多くの生物のゲノムプロジェクトの完了により、光合成を行わず Calvin-Benson-Bassham cycle を有さない枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を含む数種の非光合成細菌と一部の古細菌が、RuBisCO large subunit と相同性を示す遺伝子を有していることが明らかになった。これらの非光合成細菌と古細菌における RuBisCO-like protein (RLP) の機能は全く不明であった。そこで *B. subtilis* RLP の機能と光合成 RuBisCO との機能的関連を明らかにする目的で研究を行った。

B. subtilis RLP をコードする *ykrW* 遺伝子は機能未知な *ykrX*、*ykrY*、*ykrZ* の 3 遺伝子とともにオペロンを構成していた。遺伝子発現解析実験から、*ykrWXYZ* オペロンは S-box レギュロンであり、硫黄代謝に関係する methionine salvage pathway で機能していると予想されていた。RLP 遺伝子破壊株を作製し、methionine salvage pathway の中間代謝産物を単一硫黄源とした生育培地で野生株と破壊株の生育の比較を行った。その結果、RLP が methionine salvage pathway の methylthioribose-1-phosphate から 2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentene の間の代謝ステップを触媒していることが明らかになった。しかし、methionine salvage pathway は *Klebsiella* で予想されていたものの、この経路で機能する酵素および遺伝子は未同定であった。そこで著者は、RLP の触媒反応ステップを明らかにするために、*B. subtilis* の methionine salvage pathway で機能する酵素を同定した。methionine salvage pathway で機能すると予想された *ykrWXYZ* と *ykrTS* オペロンの遺伝子産物の methionine salvage pathway における触媒反応を、各遺伝子の大腸菌リコンビナントタンパク質を用い、反応生成物のスペクトル解析と ¹H-NMR 解析により同定した。その結果、*B. subtilis* RLP は methionine salvage pathway で 2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate (DK-MTP-1-P) enolase 反応を触媒する酵素であることを明らかにしたと同時に、YkrS が methylthioribose-1-phosphate (MTR-1-P) isomerase、YkrY が methylthioribulose-1-phosphate dehydratase (MTRu-1-P)、YkrX が 2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentenyl-1-phosphate (MTPenyl-1-P) phosphatase、YkrZ が 1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase であることを明らかにした。MTR-1-P isomerase、MTRu-1-P dehydratase、DK-MTP-1-P enolase、HK-MTPenyl-1-P phosphatase の反応同定は全生物を通じて、本研究が初めての報告である。またこれにより、*B. subtilis* の methionine salvage pathway の代謝酵素と反応産物が全て明らかになった。DK-MTP-1-P は光合成 RuBisCO の基質 ribulose biphosphate と構造が非常に類似しており、またエノール化反応は RuBisCO カルボキシラーゼ、オキシゲナーゼ反応の部分反応である。この結果は、RuBisCO と RLP の両タンパク質が進化的に密接な関連を持つことを示す。実際、RLP 遺伝子破壊株は methionine salvage pathway の初発代謝物である MTA では生育することができないが、破壊株への光合成細菌 *R. rubrum* の RuBisCO 遺伝子導入により、完全に生育することができるようになった。また *R. rubrum* RuBisCO も RLP の DK-MTP-1-P enolase 反応を触媒した。

これらの実験結果と細菌進化系統樹から、*B. subtilis* を含む生物種の RLP は光合成 RuBisCO の祖先タンパク質である可能性を考察した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 蘆田 弘樹

RuBisCO は光合成カルビンサイクルにおいて CO₂ 固定反応を触媒する鍵酵素である。近年、非光合成生物である、非光合成細菌や古細菌が RuBisCO と相同性を示す RuBisCO-like protein (RLP) を有しており、この RLP の機能や RuBisCO との関連性について注目を集めていたが、これまで明らかにされていなかった。本論文は枯草菌を用いて以下の解析結果から RLP の機能している **methionine salvage pathway** を明らかにするとともに、この経路における RLP の触媒反応を同定した。また光合成 RuBisCO も RLP が触媒する反応を触媒する能力があることを実験により明らかにした。これらの結果から光合成 RuBisCO との機能的関連性について議論している。

- 1) 枯草菌 RLP が硫黄代謝系の **methionine salvage pathway** で機能していることを RLP 破壊株を用いた解析により明らかにした。さらに、この経路において RLP が **2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase** であることを同定するとともに、これまで明らかにされていなかった枯草菌の **methionine salvage pathway** の反応ステップと各反応ステップを触媒する酵素を、生化学的手法を用いて明らかにした。この結果により、枯草菌の **methionine salvage pathway** の全ての代謝産物と触媒酵素が明らかとなり、未知であった代謝経路を解明した。また RuBisCO と相同性を示す RLP が光合成 RuBisCO とは全く異なる硫黄代謝系の **methionine salvage pathway** において機能していたことは非常に興味深い。
- 2) 光合成 RuBisCO の基質と触媒する部分反応が **2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase** 反応と類似していることに着目し、光合成 RuBisCO が RLP の **2,3-diketo-5-methylthiopentyl-1-phosphate enolase** 反応を触媒する能力を有していることを明らかにした。この結果により、RLP と RuBisCO の機能的関連性を示し、生物進化からの考察により RLP が RuBisCO の祖先タンパク質であり、RLP が RuBisCO へ分子進化したことで光合成カルビンサイクルが誕生したというモデルを提唱している。

以上のように、本論文は非光合成細菌における RLP の機能を同定し、光合成 RuBisCO との機能的関連性を明らかにし、RuBisCO の分子進化モデルを提唱した。

この研究結果は、光合成の進化を考える上で非常に重要な発見であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。