

# 修士学位論文

## 大腸菌のヘム合成経路に関する 遺伝学的解析

指導教授

加藤 潤一

教授

平成27年 1月 9日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 生命科学専攻

学修番号 13881303

氏名 石川 美咲

## 学位論文要旨(修士(理学))

### 大腸菌のヘム合成経路に関する遺伝学的解析

分子遺伝学研究室 石川美咲

大腸菌で光合成細菌の光合成機能を再構成するために、当研究室では現在光合成に必要な色素であるバクテリオクロロフィル a の合成の再構成が進められている。先行研究により中間体の合成までは成功しているが、まだバクテリオクロロフィル a の合成には至っていない。バクテリオクロロフィル a 合成は、大腸菌の電子伝達系などのタンパク質の補欠分子族であるヘムの合成中間体であるプロトポルフィリン IX を基質とするが、バクテリオクロロフィル a を合成させるためには光合成細菌の関連遺伝子群の導入に加えて、大腸菌のヘム合成経路を改変して基質を増大させることが有効ではないかと考えられる。しかし大腸菌のヘム合成経路のどの部分を改変すればプロトポルフィリン IX を増産させることができるのかについては分かっていなかった。またヘム合成経路そのものについても、関連遺伝子とされてきた *hemX*, *Y* 遺伝子の機能が解明されていなかった。そこで本研究ではこれらの点を明らかにするために、ヘム合成経路に関与する遺伝子群の過剰発現株と高温感受性機能欠損株を用いて解析を行った。

まずグルタミン酸から合成されるアミノレブリン酸からヘムを合成するのに必要なヘム合成遺伝子群の種々の過剰発現株について、合成される中間体の量を HPLC で調べた。その結果、*hemB*, *C*, *D* 遺伝子群または *hemB*, *C*, *D*, *E* 遺伝子群を過剰発現させても中間体の合成量に顕著な変化は見られないが、*hemF*, *N* 遺伝子を過剰発現させることにより、プロトポルフィリン IX の蓄積量が増大することがわかり、*hemF*, *N* 遺伝子がヘム合成経路における律速段階であることがわかった。

また *hemX*, *Y* 遺伝子の機能について調べるために、*hemY* 遺伝子、または *hemX*, *Y* 遺伝子を欠失させた株について調べたが、表現型はわからなかった。そこで他の一連のヘム合成関連遺伝子との高温感受性二重、三重、または四重変異株について調べたところ、*hemE* 高温感受性欠失株に *hemY* または *hemX*, *Y* 遺伝子の欠失変異を導入した菌株では、*hemE* 欠失株で蓄積が認められた水溶性のウロポルフィリン関連物質の量が減少することがわかった。

本研究によりヘム合成経路における律速段階が明らかになり、大腸菌のヘム合成経路の改変によるプロトポルフィリン IX の増産が可能になった。またヘム

合成関連遺伝子とされてきた *hemX*, *Y* 遺伝子の機能についても新たな知見が得られた。これらの成果により今後ヘム合成経路についての理解、さらにはバクテリオクロロフィル a 合成の再構成が進むものと思われる。

# Genetic analysis on the heme biosynthesis in *Escherichia coli*

Misaki Ishikawa

In our laboratory, a project for reconstitution of bacteriochlorophyll *a* biosynthesis is in progress as a step to reconstitute the photosynthesis reactions of photosynthetic bacteria in *Escherichia coli*. The synthesis of bacteriochlorophyll *a* has not been observed although an intermediate, chlorophyllide *a*, was detected. Bacteriochlorophyll *a* is synthesized via protoporphyrin IX, which is the precursor of heme biosynthesis in *E. coli*. Heme is a prosthetic group of the proteins, which is essential for several cellular functions such as electronic transport in respiration.

For reconstitution of bacteriochlorophyll *a* synthesis, it is necessary to increase protoporphyrin IX production. However, we have not enough knowledge about heme biosynthesis pathway. For example, we do not know which *hem* genes should be over-expressed. And there are uncharacterized genes, *hemX* and *hemY*, in the *hem* operon and these genes may affect protoporphyrin IX production. Therefore, I studied the heme biosynthesis pathway of *E. coli*.

First, I analyzed the intermediates of the heme biosynthesis pathway of several strains, which over-expressed *hem* genes. The increased accumulation of protoporphyrin IX was observed in the strains having over-expressed *hemF* and/or *hemN* genes, but not in the strains having over-expressed *hemB*, *hemC*, and *hemD*, or *hemB*, *hemC*, *hemD*, and *hemE* genes. These results suggested that the *hemF* and *hemN* genes are rate-limiting step in the heme biosynthesis pathway.

Next, I studied the function of the *hemX* and *hemY* genes. First I examined cell growth and intermediates of the heme biosynthesis of the *hemY* or *hemX hemY* deletion mutants, but I did not identify their phenotype. Then, I examined those intermediates of temperature-sensitive multiple depletion mutants of *hem* genes. The results indicated that an uroporphyrin-related material was accumulated in the *hemE* depletion strains and that the accumulation of this uroporphyrin-related material was reduced in the *hemY hemE* and *hemX hemY hemE* depletion strains.

In this study, I found a key step of the heme biosynthesis pathway for increased production of protoporphyrin IX. And I found the phenotype of

*hemX hemY* and *hemY* mutants and further analyses will clarify the functions of the *hemX* and *hemY* genes. These results will contribute reconstitution of bacteriochlorophyll *a* biosynthesis in *E. coli*.

## 目次

要旨	2
Summary	4
序論	7
大腸菌のヘム合成経路とその関連遺伝子について 本研究について	
結果	9
① ヘム合成関連遺伝子の過剰発現による菌体内のヘム合成中間体	
② <i>hemX</i> , <i>hemY</i> 遺伝子の機能解析	
(1) <i>hemX</i> , <i>hemY</i> 欠失株の生育と菌体内のヘム合成中間体	
(2) <i>hemB</i> , <i>hemE</i> または <i>hemG</i> 高温感受性欠失株、 <i>hemF</i> , <i>hemN</i> 高温感受性二重欠失株の菌体内のヘム合成中間体	
(3) <i>hemX</i> , <i>hemY</i> または <i>hemY</i> 遺伝子の欠失変異と組み合わせた時の、 <i>hemB</i> , <i>hemE</i> または <i>hemG</i> 高温感受性欠失株、 <i>hemF</i> , <i>hemN</i> 高温感受性二重欠失株の生育と菌体内のヘム合成中間体	
考察	16
① ヘム合成関連遺伝子の過剰発現による菌体内のヘム合成中間体	
② <i>hemX</i> , <i>hemY</i> 遺伝子の機能解析	
材料と方法	19
謝辞	23
参考文献	23

## 序論

所属研究室である分子遺伝学研究室では、大腸菌内で光合成細菌の光合成機能を再構成することを目指して研究を行っている。現在は光合成に必要な色素であるバクテリオクロロフィル a の合成について再構成が進められており、先行研究により中間体である *chrolophyllide a* の合成までの再構成に成功している。

バクテリオクロロフィル a は、大腸菌の電子伝達系などのタンパク質の補欠分子属であるヘムの合成経路の中間体である **Protoporphyrin IX**を基質として、光合成細菌の遺伝子群がコードする十数個の酵素群により合成される。

光合成細菌のバクテリオクロロフィル a 合成に必要とされる全遺伝子群を大腸菌に導入しても、先行研究ではバクテリオクロロフィル a の合成には至っていないので、卒業研究では、大腸菌のヘム合成経路を改変して基質である **Protoporphyrin IX**を増産させることが有効ではないかと考えた。

大腸菌内でヘムは、グルタミン酸 (**L-glutamate**) から複数のヘム合成遺伝子群により合成されている。大腸菌のヘム合成に関連する遺伝子は、現在までに 12 個 (*hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemG*, *hemH*, *hemX*, *hemY*) 知られており(1)(2)、*hemX*, *hemY*を除く 10 個についてはヘム合成経路中での機能が明らかになっている (Fig. 1-1)。

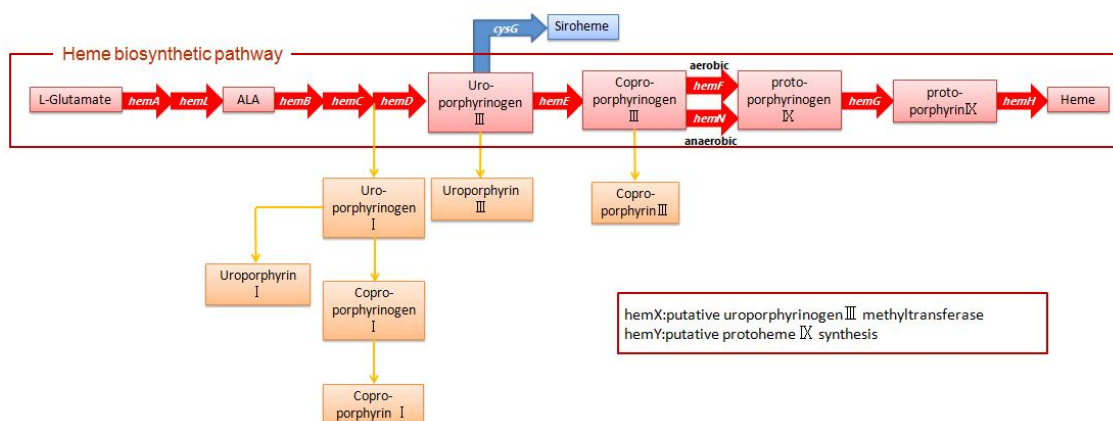


Fig. 1-1 ヘム及びヘム関連物質の合成経路

赤線で囲まれた反応経路がヘム合成経路である。赤矢印で示した *hemX*, *hemY* を除く 10 個の遺伝子 (*hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemG*, *hemH*, *hemX*, *hemY*) については機能が明らかになっている。

卒業研究では、ヘム合成中間体である 5-aminolevulinate (ALA) を添加した培地中で、*hemA*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN*を過剰発現させた株を培養することにより、ProtoporphyrinIXの増産に成功した。

しかしどの遺伝子の過剰発現が最も Protoporphyrin IXの増産に効果的であったのか、についてはわからなかった。

また、*hem* 遺伝子は上述のように 12 個あるが、まだ *hemX*, *hemY*遺伝子の機能がわかっていなかった。*hemX*, *hemY*遺伝子は *hemC*, *hemD* 遺伝子と同じオペロン内に存在する遺伝子で、上流から *hemC*, *hemD*, *hemX*, *hemY*の順番に並んでいる (Fig. 1-2)。

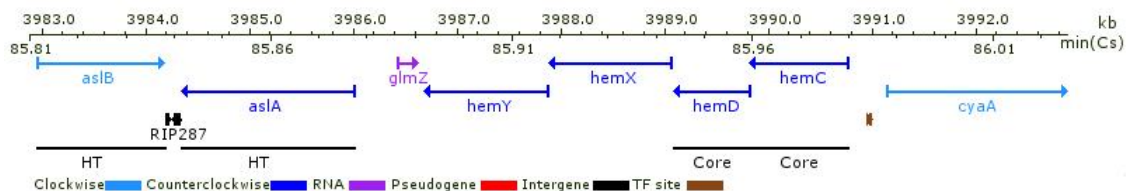


Fig. 1-2 *hemC*, *hemD*, *hemX*, *hemY*オペロン(EcoCyc より引用)

染色体上 86 分 (3906-3991 kb) の領域に、上流から *hemC*, *hemD*, *hemX*, *hemY*の順番に存在している。

本研究では、大腸菌のヘム合成経路に興味を持ち、次の 2 つの点を目的として研究を行った。

まず 1 つは、卒業研究では *hemA*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN*を過剰発現させた株で ProtoporphyrinIXの増産に成功したが、どのヘム合成遺伝子の過剰発現が Protoporphyrin IXの増産に効果的であるのかについてはっきりさせることを目的とした。

2 つ目は、*hemX*, *hemY*遺伝子の機能を明らかにすることを目指して、機能解明につながる知見を得ることを目的とした。



## 結果

### ① ヘム合成関連遺伝子の過剰発現による菌体内のヘム合成中間体

序論にも書いたように、卒業研究により、大腸菌を培養する時に ALA を培地に添加し、また一連のヘム合成遺伝子群を過剰発現させることにより ProtoporphyrinIXの蓄積量が増大することがわかった。そこで修士課程では、まずどのヘム合成遺伝子を過剰発現させることにより ProtoporphyrinIXの蓄積量が増大するのかについて調べた。

方法としては、培地にアラビノースを添加すると転写が誘導される BAD プロモーターに連結したヘム合成遺伝子群をクローニングした種々の mini-F プラスミドを大腸菌に導入し、それらの株を 37℃で 18 時間、暗条件下で培養したものを前培養として、さらに 37℃で 24 時間、暗条件下で培養した時の菌体について、ヘム合成中間体の量を HPLC で調べた。

まず *hemB*, *hemC*, *hemD* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株の 4 株について調べた (Fig. 2)。

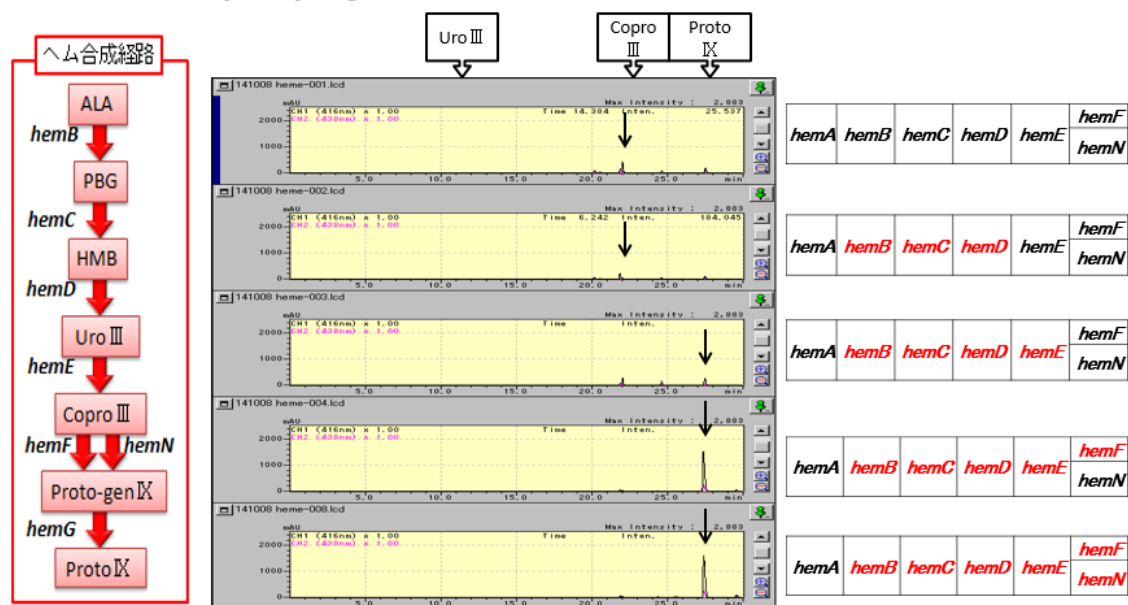


Fig. 2 ヘム合成遺伝子群を過剰発現させた時のヘム合成中間体 (1)

左図：ヘム合成経路とヘム合成遺伝子、中央図：HPLC によりヘム合成中間体の量を測定した結果、右図：過剰発現させた遺伝子を赤字、過剰発現させていない遺伝子を黒字で示す。*hemF*と *hemN*は経路中で同じ反応に関与する遺伝子であり、*hemF*は好気条件下、*hemN*は嫌気条件下で発現すると報告されて

いる。

その結果、*hemB*, *hemC*, *hemD* 過剰発現株、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE* 過剰発現株では、過剰発現させていない株と比較して特に大きな変化は見られなかったが、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF* 過剰発現株、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株では、ProtoporphyrinIXの蓄積量が増大することがわかった。また *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemG* 過剰発現株についても調べたが、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF* 過剰発現株、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株と比較して特に大きな変化は見られなかった。

そこで次に他の過剰発現株、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemN* 過剰発現株、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemN* 過剰発現株、*hemN* 過剰発現株の 3 株について同様に調べた (Fig. 3)

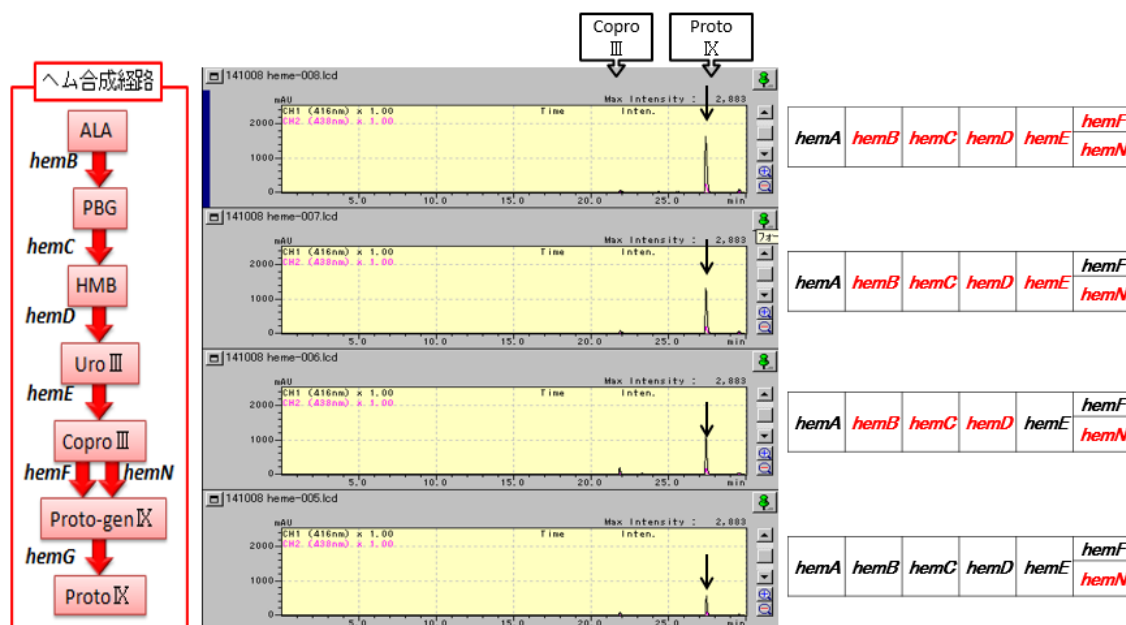


Fig. 3 ヘム合成遺伝子群を過剰発現させた時のヘム合成中間体 (2)

左図：ヘム合成経路とヘム合成遺伝子、中央図：HPLCによりヘム合成中間体の量を測定した結果、右図：過剰発現させた遺伝子を赤字、過剰発現させていない遺伝子を黒字で示す。*hemF*と*hemN*は経路中で同じ反応に関与する遺伝子であり、*hemF*は好気条件下、*hemN*は嫌気条件下で発現すると報告されている。

その結果、3 株とも ProtoporphyrinIXの蓄積量が増大することがわかり、最終的には*hemN* 遺伝子のみを過剰発現した株でも、他の 2 株に比べて蓄積量はやや少ないが、過剰発現させていない株に比べると ProtoporphyrinIXの蓄積量が増大することがわかった。

## ② *hemX*, *hemY* 遺伝子の機能解析

### (1) *hemX*, *hemY* 欠失株の生育と菌体内のヘム合成中間体

*hemX*, *hemY* 遺伝子の機能を調べるために、まず *hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失株の生育とヘム合成中間体の量について調べた (Fig. 4)。

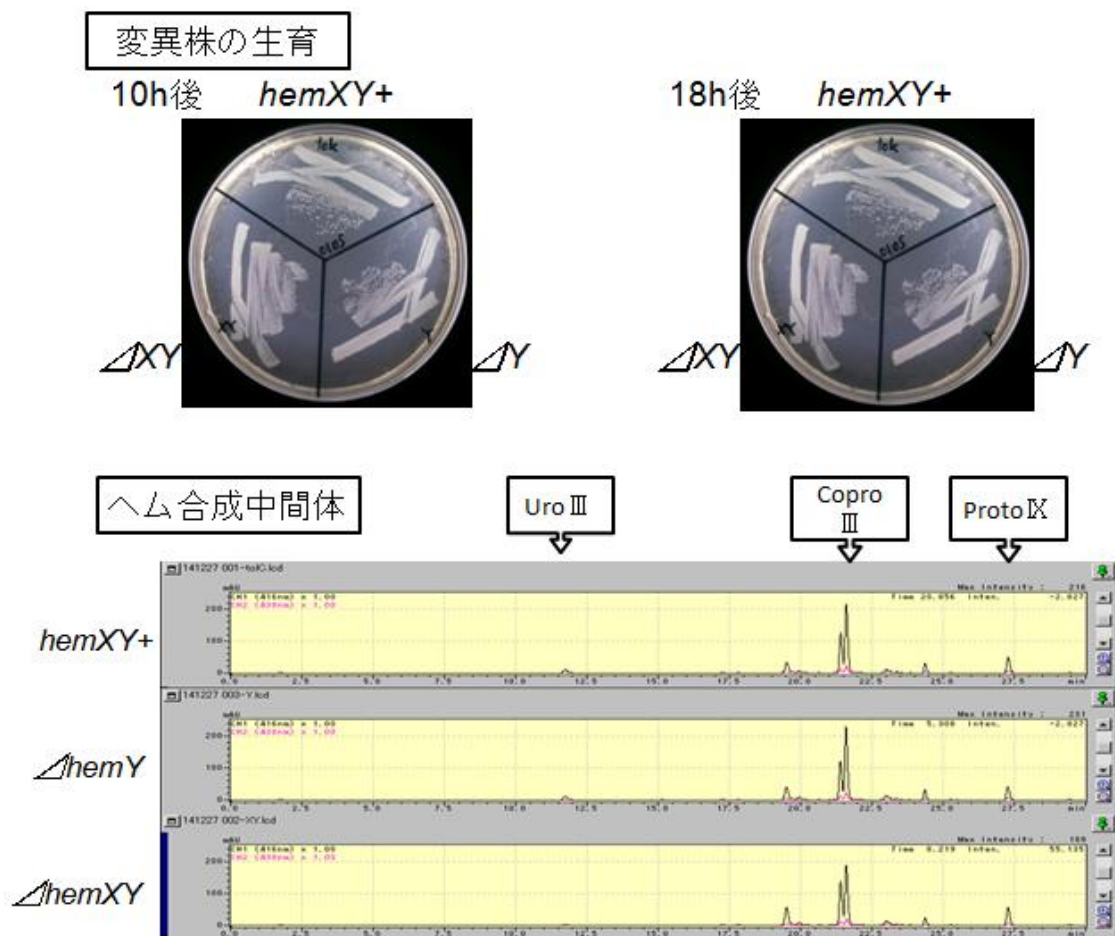


Fig. 4 *hemX*, *hemY* 欠失株の表現型

上図: *hemX*<sup>+</sup> *hemY*<sup>+</sup>株、*hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失株を Antibiotic medium3 寒天培地で 37°C、10 時間および 18 時間培養した時の生育。

下図: *hemX*<sup>+</sup> *hemY*<sup>+</sup>株、*hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失株について HPLC によりヘム合成中間体の量を測定した結果。

その結果 *hemX* または *hemY* 遺伝子の欠失株では、これらの遺伝子を欠失していない株と比べて、生育、ヘム合成中間体の量にほとんど差異は見られなかった。

(2) *hemB*, *hemE* または *hemG* 高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN* 高温感受性二重欠失株の菌体内のヘム合成中間体

次に *hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失変異と他の *hem* 遺伝子の欠失変異を組み合わせた株では表現型が見られるのではないかと考えた。しかし他の *hem* 遺伝子の欠失変異株は、好氣的に培養した時に著しく生育が悪くなるので、菌体内のヘム合成中間体の量を調べるのが困難である。そこで高温感受性欠失株を利用することにした。利用した高温感受性欠失株は、*hem* 遺伝子をクローニングした複製が高温感受性の mini-F プラスミドの存在下で、染色体上のその *hem* 遺伝子を欠失させた株で、低温では *hem* 遺伝子が相補されているので正常に生育するが、高温では mini-F プラスミドが消失するためにその *hem* 遺伝子は欠失した状態になり、生育は著しく悪くなる。(Fig6A)

まず *hemX*, *hemY* 遺伝子と同じオペロンの上流に存在する *hemC*, *hemD* 以外の、*hemB*, *hemE* または *hemG* 遺伝子の高温感受性欠失株、また *hemF* と *hemN* 遺伝子の二重高温感受性欠失株を作製し、高温での菌体内のヘム合成中間体について調べた (Fig. 5)。

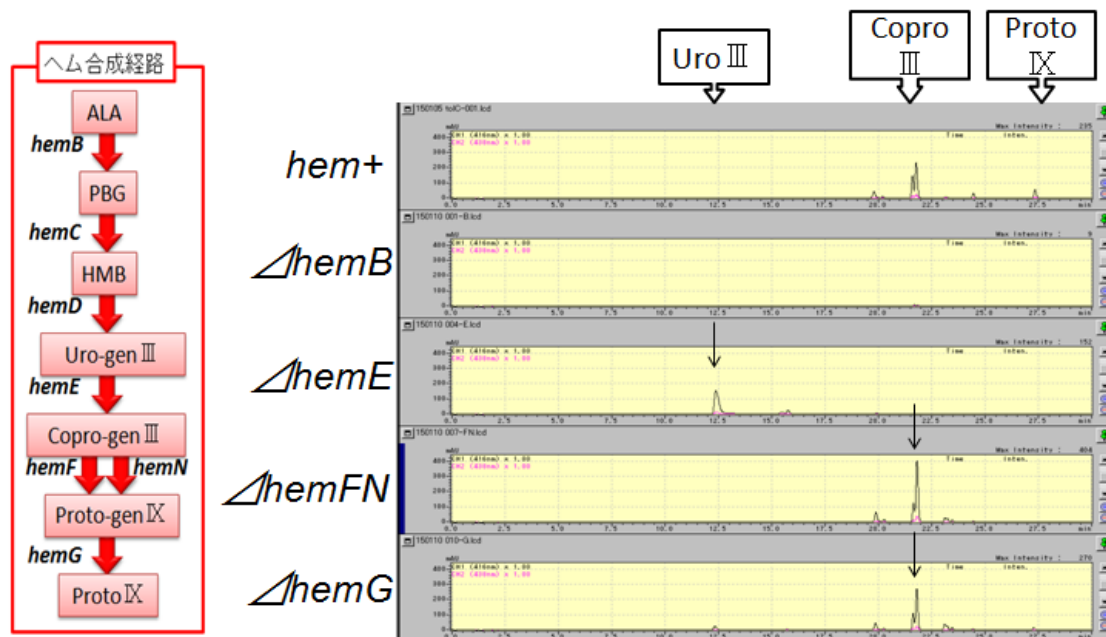


Fig. 5 ヘム合成遺伝子高温感受性欠失株におけるヘム合成中間体

左図：ヘム合成経路とヘム合成遺伝子、右図：HPLC によりヘム合成中間体の量を測定した結果。

本研究では、ヘム合成中間体のうち Uroporphyrin、Coproporphyrin、Protoporphyrin IX を検出できる HPLC の解析条件を採用したが、*hemB* 高温感受性欠失株ではピークがほとんど見られないことから、ポルフィリン環を持つ中間体が合成されていないことが確認で

きた。また *hemE* 高温感受性欠失株では Uroporphyrin の蓄積が、*hemF*, *hemN* 高温感受性二重欠失株と *hemG* 高温感受性欠失株では Coproporphyrin の蓄積が予想通りに確認できた。

(3) *hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失変異と組み合わせた時の、*hemB*, *hemE* または *hemG* 高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN* 高温感受性二重欠失株の生育と菌体内のへム合成中間体

次に *hemB*, *hemE* または *hemG* 高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN* 高温感受性二重欠失株に *hemX*, *hemY* または *hemY* 遺伝子の欠失変異を組み合わせた株を作製し、高温での菌体内のへム合成中間体について調べた (Fig. 6)。

Fig. 6A

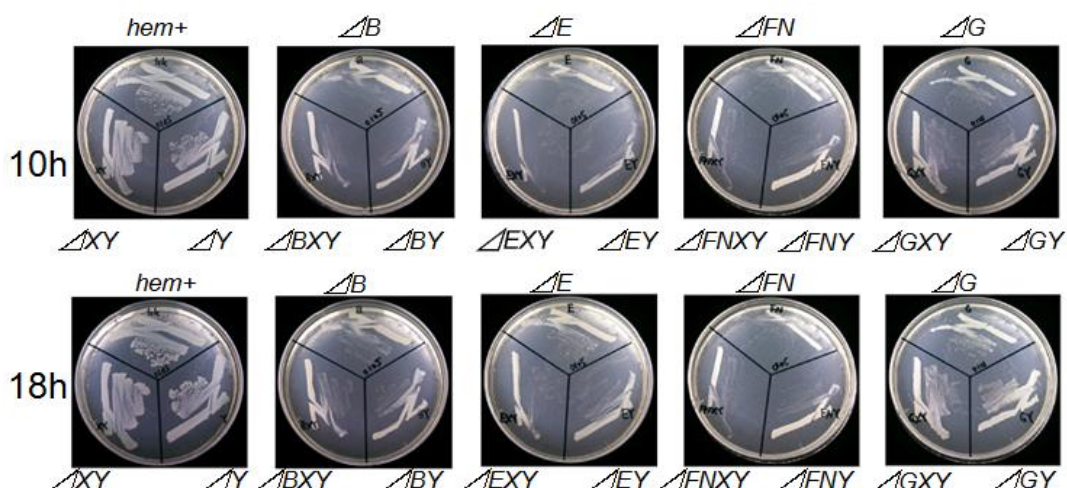


Fig. 6B

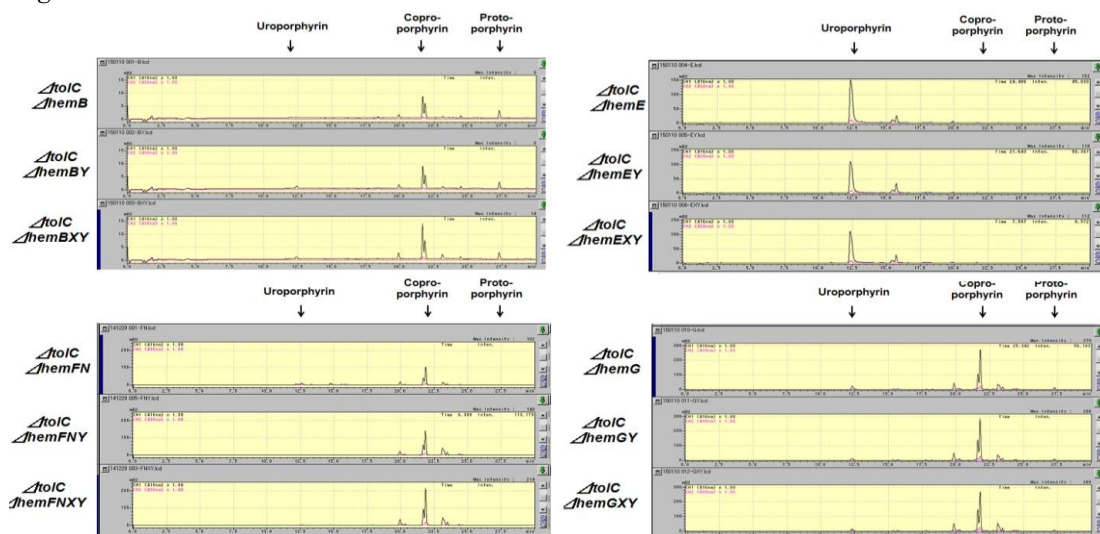




Fig. 6 *hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失変異と組み合わせた時の、*hemB*, *hemE*または*hemG*高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN*高温感受性二重欠失株の表現型

*hemX*<sup>+</sup> *hemY*<sup>+</sup>株、*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失株、および*hemB*, *hemE*または*hemG*高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN*高温感受性二重欠失株と、それらに*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失変異を組み合わせた株について、Antibiotic medium3 寒天培地で 42℃、10 時間および 18 時間培養した時の生育(A)と、HPLC によりヘム合成中間体の量を測定した結果(B)。

どの高温感受性欠失株も、*hemX*<sup>+</sup> *hemY*<sup>+</sup>株、*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失株に比べて生育が遅くなっていることが確認された。またそれらの高温感受性欠失株に*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失変異を組み合わせた株についても、同様に生育が遅くなっていて、*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失による生育への影響は見られなかった (Fig. 6A)。

また HPLC による菌体内に蓄積しているヘム合成中間体の解析でも、生育と同様に、*hemB*, *hemE*または*hemG*高温感受性欠失株、*hemF*, *hemN*高温感受性二重欠失株と、それらに*hemX*, *hemY*または*hemY*遺伝子の欠失変異を組み合わせた株とで、顕著な差は見られなかった (Fig. 6B)。

しかし HPLC での解析のためのサンプル調製時の途中の画分について、*hemE*高温感受性欠失株と*hemE*, *hemY*または*hemE*, *hemX*, *hemY*高温感受性欠失株の間で色の違いが見られた (Fig. 7)。

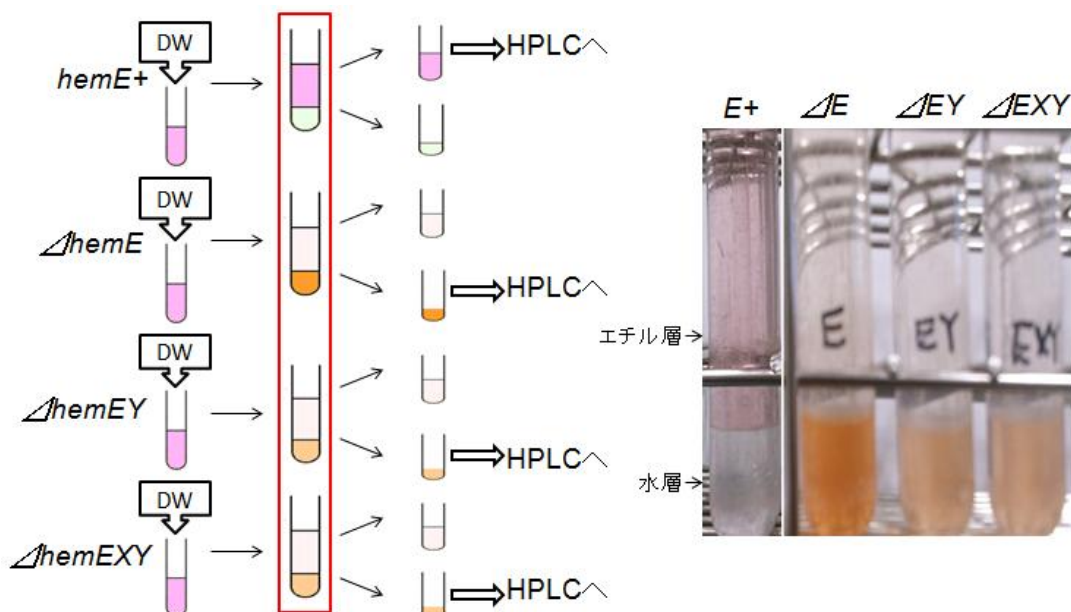


Fig. 7 *hemE*高温感受性欠失株と*hemE*, *hemY*または*hemE*, *hemX*, *hemY*高温感受性欠失株の HPLC 解析用サンプル調製時の途中の画分

*hemE* 高温感受性欠失株と *hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株から、HPLC 解析用サンプルを調製する際の、酢酸エチルで抽出した画分に超純水を加えて分画した時の状態 (右写真) と、分画の手順の一部と結果についての模式図 (左図)。

酢酸エチルで抽出した画分に超純水を加えて分画した時に、*hemE* 高温感受性欠失株では酢酸エチル層がピンク色であったが、*hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株では酢酸エチル層のピンク色が薄く、また水層は黄色がかった色をしていた。またその水層の色は、*hemE* 高温感受性欠失株では濃く、*hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株ではやや薄かった。

そこでこれらの色に違いが見られた水層画分を、凍結乾燥した後に塩酸を加えて溶かして、ヘム合成中間体について HPLC により調べた (Fig. 8)。

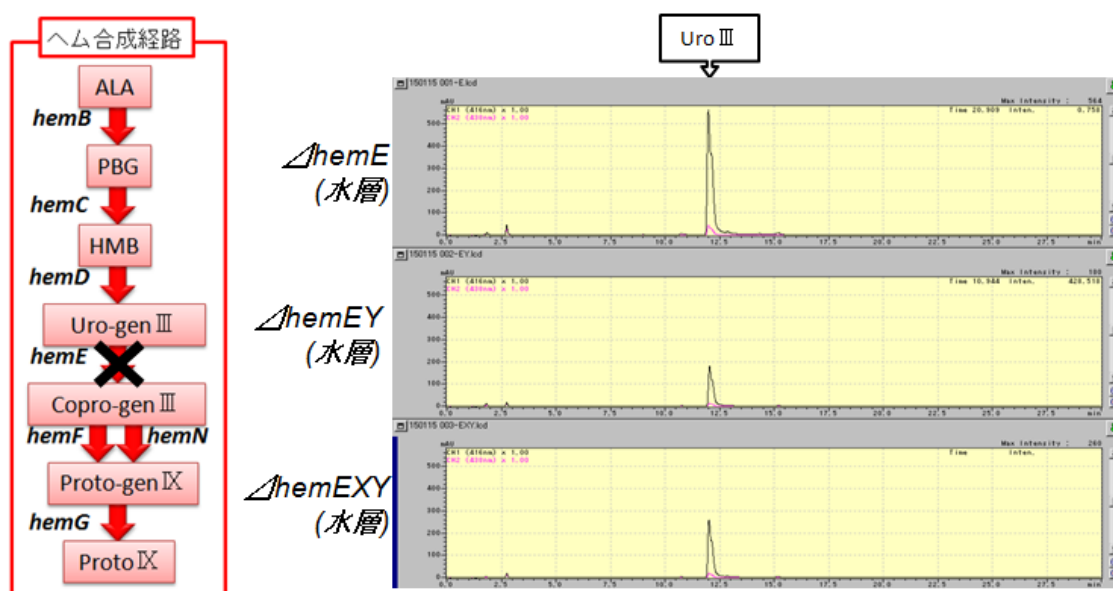


Fig. 8 *hemE* 高温感受性欠失株と *hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株から調製した水層画分のヘム合成中間体

左図：ヘム合成経路とヘム合成遺伝子、右図：HPLC によりヘム合成中間体の量を測定した結果。

その結果、エチル層の Uroporphyrin (Fig. 7) より多量の Uroporphyrin が検出され、さらに *hemE* 高温感受性欠失株では、*hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株に比べて、ピークの高さが約 2 倍高いことがわかった (Fig. 8)。

## 考察

### ① ヘム合成関連遺伝子の過剰発現による菌体内のヘム合成中間体

卒業研究では *hemA*, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株を、ALA を添加した培地で培養した時に ProtoporphyrinIX の蓄積量が増大することがわかった。

そこで本研究ではまず *hemB*, *hemC*, *hemD* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株の 4 株について調べた結果、*hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemF*, *hemN* 過剰発現株で、ProtoporphyrinIX の蓄積量が増大することがわかった。

また *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemE*, *hemN* 過剰発現株, *hemB*, *hemC*, *hemD*, *hemN* 過剰発現株, *hemN* 過剰発現株の 3 株について同様に調べた結果、*hemN* 遺伝子のみを過剰発現した株でも、蓄積量はやや少ないが、ProtoporphyrinIX の蓄積量が増大することがわかり、ヘム合成経路の中で、*hemF*, *hemN* 遺伝子の過剰発現が ProtoporphyrinIX の蓄積に重要であることが分かった。

*hemF*, *hemN* 遺伝子はどちらも CoproporphyrinogenIII oxidase をコードしており、これらの酵素は CoproporphyrinogenIII を酸化的脱炭酸化して ProtoporphyrinogenIX を生成する反応を触媒する。*hemF* 遺伝子がコードしている酵素は酸素依存的に働き、*hemN* 遺伝子がコードしている酵素は非酸素依存的に働くこと報告されている。

*hemF*, *hemN* 遺伝子がコードしている CoproporphyrinogenIII oxidase の基質である CoproporphyrinogenIII やそれより上流の中間体については、たとえば UroporphyrinogenIII が Siroheme などの前駆体として使用されたり、UroporphyrinIII に変化する可能性があるため、*hemB*, *hemE* 遺伝子の過剰発現は必ずしも ProtoporphyrinIX や Heme の蓄積にはつながらない。しかし *hemF*, *hemN* 遺伝子の過剰発現は過剰な ProtoporphyrinIX や Heme の蓄積を引き起こし、生育を阻害する可能性が高いために *hemF*, *hemN* 遺伝子の発現量がヘム合成経路の律速段階になっているのかもしれない (Fig. 9)。

*hemF*, *hemN* 遺伝子の発現がヘム合成経路の ProtoporphyrinIX 合成における律速段階であることを示すには、*hemF* 遺伝子のみを過剰発現させた時にも、*hemN* 遺伝子の場合と同様に ProtoporphyrinIX が蓄積すると考えられるので、確認する必要がある。また過剰発現



ではなく通常の状態における、*hemF*, *hemN* 遺伝子を含めた各 *hem* 遺伝子群の発現量を調べることも重要である。

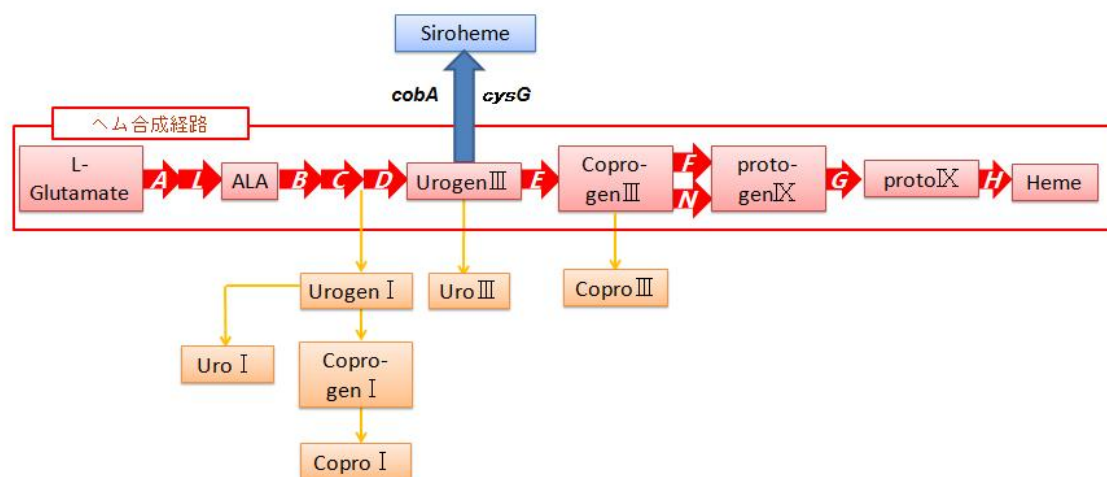


Fig. 9 ヘム及びヘム関連物質の合成経路

赤線で囲まれた反応経路がヘム合成経路である。Uroporphyrinogen III は Siroheme などの前駆体として使用される。また ALA 以降、Coproporphyrinogen III までの中間体は種々の物質に変化する。

## ② *hemX*, *hemY* 遺伝子の機能解析

本研究において、*hemE* 高温感受性欠失株、および *hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株では、サンプル調製の分画の際の水層に Uroporphyrin が検出された。Uroporphyrin は親水性であるので水層に分画されたと考えられる。

また *hemE*, *hemY* または *hemE*, *hemX*, *hemY* 高温感受性欠失株では、*hemE* 高温感受性欠失株に比べて水層の Uroporphyrin 量が少ないことがわかり、これまでに *hemX* または *hemY* 遺伝子の欠失による表現型は報告されていないので、初めて *hemY* 遺伝子の欠失による表現型が認められたと考えられる。

これらの結果からは、*hemY* 遺伝子の機能について大きく分けて 2 つの可能性が考えられる。

1 つ目は、*hemY* 遺伝子が、たとえば *hemC* または *hemD* 遺伝子と重複する機能を持っている可能性である (Fig. 10A)。この可能性によると、水層の Uroporphyrin は Uroporphyrinogen III であり、*hemY* 遺伝子の欠失により Uroporphyrinogen III の合成量が低下しているため、*hemE* 遺伝子の欠失により蓄積する Uroporphyrinogen III の量が減少し

たと本研究の結果を説明することができる。*hemY*遺伝子の欠失により生育は悪くならず、またヘム合成中間体にも顕著な減少は見られなかったので、*hemC*または*hemD*遺伝子を補助する程度の役割かもしれない。

2つ目の可能性は、*hemY*遺伝子が Uroporphyrinogen III からの他のヘム合成関連物質の合成に関与している可能性である (Fig. 10-B)。この可能性によると、水層の Uroporphyrin は Uroporphyrinogen III ではない、*hemY*遺伝子が合成に関与する他のヘム合成関連物質であり、*hemE*遺伝子の欠失により Uroporphyrinogen III が蓄積するためにこのヘム合成関連物質も蓄積するが、*hemY*遺伝子の欠失によりその蓄積量も減少すると説明することができる。

これらの可能性についてさらに調べるには、例えば水層の Uroporphyrin の同定や *hemX*, *hemD*, または *hemC* 遺伝子の欠失株の作製と解析などが重要になると考えられる。Uroporphyrinogen III はヘム合成経路の中間体であると同時に、Siroheme 合成経路の中間体でもあるので、Siroheme 合成に関与する *cysG*, *cobA* 遺伝子 (Fig. 9) の欠失変異株やそれらと *hemX* または *hemY* 遺伝子の欠失とを組み合わせた変異株の作製、解析が重要になるかもしれない。

Fig10-A

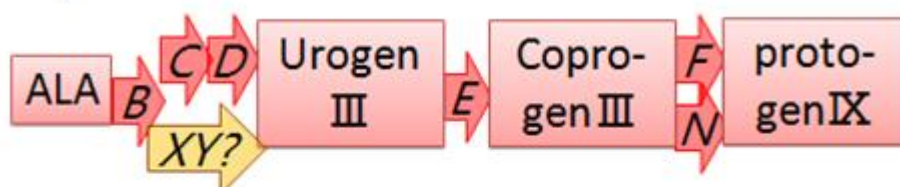


Fig10-B

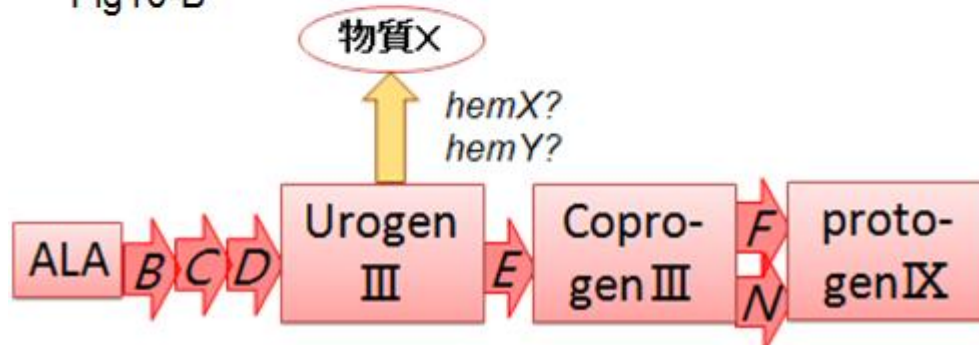


Fig. 10 *hemX* または *hemY* 遺伝子の機能についての可能性

A: *hemY* 遺伝子が、*hemC* または *hemD* 遺伝子と重複する機能を持っている可能性

B: *hemY*遺伝子が UroporphyrinogenⅢからの他のヘム合成関連物質の合成に関与している可能性  
材料と方法

＜菌株＞

使用した株は、全て K12 株(MG1655 株)由来のものである。

菌体名	菌体構成
$\Delta tolC$	MG1655 $\Delta tolC::Ge$
mF2	MG1655 $\Delta tolC::Ge/mF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD(Tc)$
mF3	MG1655 $\Delta tolC::Ge/mF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD,pBADhemE(Tc)$
mF4	MG1655 $\Delta tolC::Ge/mF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD,pBADhemE,pBADhemF(Tc)$
<i>hemN</i> -mF2	MG1655 $\Delta tolC::Ge/pBADhemN/mF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD(Tc)$
<i>hemN</i> -mF3	MG1655 $\Delta tolC::Ge/pBADhemN/mF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD,pBADhemE(Tc)$
<i>hemN</i> -mF4	MG1655 $\Delta tolC::Ge/pBADhemNmF-pBADhemB,pBADhemC,pBADhemD,pBADhemE,pBADhemF(Tc)$
$\Delta hemY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemY(Sm)$
$\Delta hemXY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemXY(Sm)$
$\Delta hemB$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemB::Cm/mFts-hemB+(Ap)$
$\Delta hemBY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemB::Cm/mFts-hemB+(Ap)/\Delta hemY::Sm$
$\Delta hemBXY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemB::Cm/mFts-hemB+(Ap)/\Delta hemXY::Sm$
$\Delta hemE$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemE::Tc/mFts-hemE+(Km)$
$\Delta hemEY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemE::Tc/mFts-hemE+(Km)/\Delta hemY::Ap$
$\Delta hemEXY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemE::Tc/mFts-hemE+(Km)/\Delta hemXY::Ap$
$\Delta hemFN$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemF::Cm/\Delta hemN::Tc/mFts-hemN+(Km)$
$\Delta hemFNY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemF::Cm/\Delta hemN::Tc/mFts-hemN+(Km)/\Delta hemY::Ap$
$\Delta hemFNXY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemF::Cm/\Delta hemN::Tc/mFts-hemN+(Km)/\Delta hemXY::Ap$
$\Delta hemG$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemG::Cm/mFts-hemG+(Km)$
$\Delta hemGY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemG::Cm/mFts-hemG+(Km)/\Delta hemY::Ap$
$\Delta hemGXY$	MG1655 $\Delta tolC::Ge/\Delta hemG::Cm/mFts-hemG+(Km)/\Delta hemXY::Ap$

＜培地＞

液体培地、寒天培地ともに Antibiotic Medim 3 を用いた。  
また、一部の実験作業において、LB 培地を用いた。

Antibiotic Medium3 培地(1L)

Antibiotic Medium3 17.5g

#### LB 培地(1L)

Triptone(Bectone Dickinton)	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	10g

寒天培地にする際は、Ager を 1%添加した。また、培地には適宜、抗生物質を以下の濃度になるように添加した。

アンピシリン(Ap):50 $\mu$ g/ml, ストレプトマイシン(Sm):50 $\mu$ g/ml, クロラムフェニコール(Cm):17 $\mu$ g/ml, カナマイシン(Km):50 $\mu$ g/ml, テトラサイクリン(Tc):5 $\mu$ g/ml

#### (P1 transduction)

2ml の LB 培地で対応する抗生物質を入れた LB 培地で菌を培養しておき pre-culture を作っておく。当日は Ca-culture を作成した。組成は P1 preparation と同じ組成である。培養終了後、Ca-culture を 200 $\mu$ l 入れ、P1 フェージを 1 $\mu$ l 入れた。その後 vortex し、37 $^{\circ}$ C で 20 分培養した。培養中に LB:クエン酸 Na=9:1 の溶液を作成する。培養後は室温で 10000rpm、1 分遠心を行った。上清を可能な限り取り除き、作成しておいた LB クエン酸 Na 混合液を 1ml 加え、懸濁した。その後 30 $^{\circ}$ C で 1 時間培養し、寒天培地に植菌した。

#### (Electroporation)

2ml の LB 培地で対応する抗生物質を入れた LB 培地で菌を培養しておき pre-culture を作っておく。また、坂口フラスコ内に LB 培地を 200ml 作成しておく。当日は前培養しておいた菌株を坂口フラスコに入れ、対応する抗生物質も加えて培養を開始する。1655red 株の時は IPTG をこの時に 20mg 加える。およそ 1.5 時間を目安に 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。培養している間に 1 サンプルごとに 8 枚の対応する抗生物質を加えた P 寒天培地を作成した。培養が終わったら氷水で坂口フラスコを冷やし、十分冷えたら遠沈管に入れ、遠心機で 8000rpm、5 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し集菌した。グリセロールを 10ml 入れて菌を溶かし、別の 50ml チューブに移し、再び 10ml グリセロールを遠沈管に入れ再び同じチューブに加えた。その後 3000rpm、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心した。遠心が終わったらアスピレーターで菌体を吸わないようにグリセロールを吸い取り、再度グリセロールを 10ml 入れて菌体をやさしく混ぜる。その後グリセロールを 10ml 入れて再度 3000rpm、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心する。グリセロールを吸い取る→遠心の作業を 2 回繰り返す。最後の遠心が終わったらグリセロールを 1 サンプルあたり 40 $\mu$ l 残して吸い取る。残ったグリセロールと菌体をしっかり懸濁し、その後導入する DNA 断片やプラスミドなど 1 $\mu$ l に 40 $\mu$ l ずつ菌体を混ぜ合わせる。1655red 株には IPTG200g/l を 5 $\mu$ l 加え混

ぜる。この混合物をキュベットに全量加えて電気ショックをかけ、SOC 培地に入れて 30℃で一時間培養を行う。培養後、プレートにまき、37℃で一晩培養した。

#### SOC 培地(1L)

Triptone(Bectone Dickinton)	10g
Yeast Extract	5g
NaCl	10g
KCl	2.5mM
MgCl <sub>2</sub>	10mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
<u>Glucose</u>	<u>20mM</u>

#### (菌体の培養)

##### ①ヘム合成経路に関与する遺伝子群の過剰発現株

pre-culture として 2ml の液体培地(Difco)に菌を植え付け 37℃、130rpm で 18 時間ほど暗室下で振盪培養させる。次の日、300ml の三角フラスコに 50ml の P 培地を加え、そこに 10%arabinose(和光)を 0.02%になるように加え、最終濃度 0.04%になるように ALA を加えた。pre-culture は元の 250 倍の薄さになるように加えた。

その後アルミホイルで蓋をして 37℃の暗室下で 24 時間、130rpm で振盪培養させた。

##### ②高温感受性機能欠損株

pre-culture として 2ml の液体培地(Difco)に菌を植え付け 30℃、130rpm で 18 時間ほど暗室下で振盪培養させる。この時、高温感受性機能欠損株を補完するプラスミドが持つ抗生物質耐性と対応する抗生物質を加える。次の日、300ml の三角フラスコに 50ml の P 培地を加える。最終濃度 0.04%になるように ALA を加えた。pre-culture は元の 250 倍の薄さになるように加えた。

その後アルミホイルで蓋をして 42℃の暗室下で 24 時間振盪培養させた。

#### (色素抽出)

培養液を 7200rpm、4℃、10 分で遠心した後、上清(培地)と沈殿物(菌体)に分ける。上清は、酢酸エチル:氷酢酸=3:1 の溶液を 10ml 加えて vortex し、30 分間氷上で色素抽出を行った。沈殿物は冷却水 20ml と酢酸エチル:氷酢酸=3:1 の溶液を 10ml 加えて vortex し、上清と同様 30 分間氷上で色素抽出を行った。その後 7200rpm、4℃、10 分で再び遠心し、有機層を小試験管に回収する。回収した有機層を 1ml の冷却水で洗浄し 3M 酢酸を 1ml 加え、vortex 後塩酸を回収する。塩酸層に析出した色素の内、100μl を HPLC のバイアルに入れてセットし、測定を行った。

また、冷却水で洗浄した際、水溶性の物質に色素が析出している場合があったため、そ

れらを HITACHI U-2000 Spectrophotometer にて吸光波長を 300-760nm まで測定した。

#### (HPLC の測定)

今回使用した HPLC は SHIMADZU の LCsolution という機種であり、カラムは高性能充填カラム Shim-pack VP-ODS(粒子径:5 $\mu$ m)を使用している。

HPLC の設定は、A 液に 1M 酢酸アンモニウム pH5。1:アセトニトリル=9:1 の溶液を使用し、B 液にメタノール:酢酸=10:1 の溶液を使用した。

励起波長は 405nm、蛍光波長は 596nm で設定し、溶液 A100%から、溶液 B100%へ流速 1ml/min で 20 分間流し、溶液 B100%の状態に 15 分間流した。

## 謝辞

本研究にあたり、多大なご指導、ご助言を頂きました、加藤潤一教授、古屋伸久助教授、得平茂樹准教授には深く感謝しており、心より厚く御礼申し上げます。  
また、分子遺伝学研究室の方々にも感謝の意を示すとともに、深く御礼申し上げます。

## 参考文献

(1)**Ryoko Tatsumi and Masaaki Wachi**

TolC-Dependent Exclusion of Porphyrins in *Escherichia coli*.

(2)**Tye O. Boynton, Lauren E. Daugherty, Tamara A. Dailey, and Harry A. Dailey\***

Identification of *E. coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity

(3)**E Verderber, L J Lucast, J A Van Dehy, P Cozart, J B Etter, and E A Best**

Role of the hemA gene product and delta-aminolevulinic acid in regulation of *Escherichia coli* heme synthesis.

(4)**Panek H<sup>1</sup>, O'Brian MR.**

A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis

(5)**Kalle Möbius,<sup>a</sup> Rodrigo Arias-Cartin,<sup>b</sup> Daniela Breckau,<sup>a</sup> Anna-Lena Hännig,<sup>a</sup> Katrin Riedmann,<sup>c</sup> Rebekka Biedendieck,<sup>a</sup> Susanne Schröder,<sup>a</sup> Dörte Becher,<sup>d</sup> Axel Magalon,<sup>b</sup> Jürgen Moser,<sup>a</sup> Martina Jahn,<sup>a</sup> and Dieter Jahn<sup>a</sup>.**

Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation

(6)**A Săsărman, P Chartrand, R Proschek, M Desrochers, D Tardif, and C Lapointe**

Uroporphyrin-accumulating mutant of *Escherichia coli* K-12.

(7)**Annabelle Fernandez,<sup>1,\*</sup> Delphine Lechardeur,<sup>1</sup> Aurélie Derré-Bobillot,<sup>1</sup> Elisabeth Couvé,<sup>2</sup> Philippe Gaudu,<sup>1</sup> and Alexandra Gruss<sup>1,\*</sup>**

Michael R. Wessels, Editor

Two Coregulated Efflux Transporters Modulate Intracellular Heme and Protoporphyrin IX Availability in *Streptococcus agalactiae*