



Title	Functional differentiation of nitrogenase Fe-protein in photo-synthetic organisms.
Author(s)	藤田, 祐一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37225
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	藤	田	祐	一
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	9643	号	
学位授与の日付	平成3年3月26日			
学位授与の要件	理学研究科 生物化学専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	Functional differentiation of nitrogenase Fe-protein in photosynthetic organisms. (光合成生物におけるニトロゲナーゼ Fe-蛋白質の機能分化)			
論文審査委員	(主査) 教授 松原 央 (副査) 教授 二井 将光 教授 田川 邦夫			

論文内容の要旨

*frx C*は、ゼニゴケ葉緑体DNAに見出されたopen reading frameの一つで、その推定アミノ酸配列は、ニトロナーゼのFe-蛋白質と有意な相同性を示す。ニトロゲナーゼは、原核生物に限って分布していることから、*frx C*遺伝子産物は、葉緑体において未知の機能を有することが期待される。本遺伝子産物の機能を解明することを目的として、本研究を行った。

*frx C*遺伝子の一部を大腸菌で発現させた。この産物に対し得た抗体を用いてWestern blottingを行った結果、ゼニゴケ葉緑体の可溶性画分に、*frx C*の推定分子量31,945によく一致する分子量(31-kDa)を示す蛋白質を検出した。従って、*frx C*は、ゼニゴケ葉緑体において発現しており、その産物は、可溶性蛋白質であると結論した。

藍藻を、葉緑体のモデル生物として用いて、*frx C*蛋白質の機能を解明するため、窒素固定性の藍藻 *Plectonema boryanum* から *frx C*遺伝子とニトロゲナーゼのFe-蛋白質の遺伝子 *nif H*とを別々にクローニングし、それらの塩基配列を決定した。両者の推定アミノ酸配列と、その他の既知のFe-蛋白質のそれとを比較した結果、*frx C*は、*nif H*と共通の祖先遺伝子から生じ、*nif H*とは異なる機能を担うようになり、独自に進化してきたことが示唆された。

*frx C*遺伝子産物の機能に直接迫るため、*P. boryanum*において、*frx C*遺伝子欠損変異株の単離を試みた。まず、*frx C*遺伝子を分断する様にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを、電気穿孔法を用いて細胞内に導入し、プラスミドと染色体DNA間での相同的組換えによって生じる変異株を、カナマイシン耐性を指標として選択した。その結果、*frx C*欠損変異株としてYFC1004を単離した。YFC1004は、光独立栄養的にも窒素固定的にも、野生株と変わりなく生

育することから, *frx C*蛋白質は, 光合成系にも窒素固定系にも, 必須ではないことが示された。ところが, 弱光下, 又は, 暗所での成育において, 成育速度では野生株との差は見られないが, 細胞のクロロフィル含量が, 著しく減少するという形質を示した。この形質は, 通常の光条件下では見られない。従って, 本藍藻は, 光に対する依存性の異なる二つのクロロフィル合成系を有しており, *frx C*蛋白質は, 光非依存性のクロロフィル合成系に, 何等かの形で関与していることが示唆された。又, クロロフィル減少に起因すると考えられる形態変化として, 未発達なチラコイド構造が, 電子顕微鏡により観察された。

論文審査の結果の要旨

葉緑体は光合成を担うオルガネラで, ゼニゴケ, タバコ, イネの環状ゲノムの全塩基配列が判明している。しかし, 未だ機能不明の部分 (URF) も多く, その中で *frx C* と命名された遺伝子はゼニゴケ葉緑体のURFで, その推定アミノ酸配列は窒素固定酵素の鉄蛋白質と約30%の相同性を示し, ATP結合部位や2量体当たり1ヶの [4 Fe-4 S] クラスターを形成しうる部位は両者に共通して認められる。しかし窒素固定酵素は原核生物にのみ存在し, *frx C* 産物が葉緑体でどのような機能を示すのかは興味のある重要な命題である。そこで藤田君はこの *frx C* 産物を同定し, その機能を解明すべく以下の研究を展開した。先ずゼニゴケ葉緑体の *frx C* の一部を *E. coli* 発現ベクターにサブクロニングし, 19kDa 蛋白を精製し, 抗体を作製した。これを用いてゼニゴケ葉緑体の可溶性画方に相当する31kDa 蛋白が存在し, このものが2量体で存在することやアフィニティカラムによるATP結合能の同定から, 予想通り窒素固定酵素の鉄蛋白質と類似した分子形態および機能をもっていることが示唆された。次で植物と同様の光合成系をもち, かつ窒素固定能をもつ藍色細菌ブレクトネマを用いて遺伝子解析をしたところ *frx C* と高い類似性を示す遺伝子と鉄蛋白質そのものをコードする遺伝子 *nif H* とが共存していることが示された。これらの遺伝子から推定されるアミノ酸配列を他のものと比較したところ *frx C* 遺伝子は *nif H* 遺伝子と共に祖先から分岐し, やがて *nif H* とは異なる機能を示すようになったことが示唆された。また *nif H* が窒素源存在下で発現が抑制されるのとは, 異なり, *frx C* は抑制されなかった。そこで *frx C* の機能を解明するためブレクトネマの *frx C* 欠損株の作製を試みた。*frx C* 内部にカナマイシン耐性遺伝子を導入したプラスミドを作り, 電気穿孔法を用いて細胞内に導入し形質転換を行った。種々の条件の検討を経て, 世界で初めてこの藍色細菌 *frx C* 欠損変異株の作成に成功した。このものは光独立栄養的にも窒素固定的にも野生株と殆んど変化がなく, *frx C* 蛋白はこれらと関わりのないことが明確に示された。ところが弱光下又は暗所では生育速度に変化はないが, クロロフィル量が大幅に減少した。通常の光条件下では変化はないので, 2つのクロロフィル合成系の存在と, *frx C* が光非依存性クロロフィル合成系に関与するものと結論した。これに伴う形態変化も観察できた。高等植物と下等植物でのクロロフィル合成パターンの差を反映しているものと思われる。これらの研究成果は理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認める。