The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラン藻を用いたクロロフィル合成系の解析 ： 光依存性及び光非依存性のプロトクロロフィリド還元酵素系
Author(s)	高木, 英典
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39948
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	高木英典（たかぎ ひでのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　12946　号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	**ラン藻を用いたクロロフィル合成系の解析：光依存性及び光非依存性のプロトクロロフィリド還元酵素系**
論文審査委員	（主査） 教　授　長谷　俊治 （副査） 教　授　福山　恵一　　教　授　吉川　和明

論文内容の要旨

クロロフィル（Chl）生合成の一過程であるプロトクロロフィリド（Pchlide）からクロロフィリド（Chlide）への還元反応には，光に対する依存性の異なる2種の系が存在する。本研究では，Pchlide還元反応に関わる4種類の遺伝子 *por*，*chlL*，*chlN*，*chlB* がクローン化され，各々の遺伝子の欠損株が単離されているラン藻 *Plectonema boryanum* を材料として，2種類のPchlide還元酵素系の反応機構や生理的意義の解明を目的とした。

光非依存性Pchlide還元酵素系　～遺伝子欠損株を相補する系の構築～

ChlL，ChlN，ChlB三種類の遺伝子産物が関与すると考えられる光非依存性Pchlide還元酵素系に対する蛋白質レベルでの知見を得る第一歩として，*chlL*，*chlB* 遺伝子を6残基のヒスチジン（6xHis）との融合蛋白質として *E. coli* で発現させ，精製し，抗体を調製した。得られた抗体を用いてウェスタン解析を行い，*P. boryanum* においてChlL，ChlBが発現していることを初めて確認した。

また，*E. coli* と *P. boryanum* との間のシャトルベクターを利用して，欠損株の形質を相補する系の構築を試みた。*chlL* 遺伝子の欠損株は，暗所でChlを合成できずPchlideを蓄積する形質を示す。そこで，ChlL-6xHisを発現するシャトルベクターを構築し，電気穿孔法により導入した。得られた形質転換体は，ChlL-6xHisを細胞内に蓄積するとともに，暗所において野生株の約60%のChlを合成した。この結果により，*chlL* 欠損株の相補系が確立され，初めてChlL蛋白質が生化学的に同定された。

光依存性Pchlide還元酵素系　～*E.coli* 発現系を利用した生化学的解析～

por 遺伝子の全コード領域をPCRを用いて増幅し，発現ベクターpQE-60に挿入して大腸菌での発現を試みた。その結果，PORは *E. coli* で大量に発現して可溶性画分に回収された。この可溶性画分を用いてPchlideをChlideに変換する活性の再構成を行い，NADPHが還元力の供給源であること，反応の進行には光照射が必須であることを見いだした。

Pchlide還元反応には，PORのCys残基の関与が指摘されている。そこで，*P. boryanum* のPORの5つのCys残基それぞれをSer残基に置換した5種類の改変体を *E.coli* で発現させ，それらの比活性を野性型と比較した。その結果Cys226Ser改変体の比活性が顕著に減少しており，保存されている3つCys残基の中でもCys226残基がPORの反応に重要な役割を担っていることが明らかになった。

2種類のPchlide還元酵素系の生理的役割

2種類のPchlide還元系の生理的な役割を検討することを目的として，各々の欠損株の生育やChlBとPORの発現状況を解析した。強光下において，光非依存性の系の欠損株は，野生株と同等にChlを合成し，生育するのに対して，光依存性の系の欠損株では，Chlの合成速度が低下し，生育についても世代時間が2倍程度遅れることが認められた。ウェスタン解析を行った結果，光依存性の系の欠損株でChlBの発現量が野生株よりも減少しており，光非依存性の酵素活性が低下して，光依存性の酵素活性を相補できなくなったことが示唆された。このことから，ラン藻細胞におけるPchlide還元において，暗所では光非依存性の系が，強光下では光依存性の系が優先的に機能しており，二種類の還元系が部分的に機能分化していることが初めて明らかになった。

論文審査の結果の要旨

高木君は，光依存性のプロトクロロフィリド還元酵素（POR）及び光非依存性PORの実体とその細胞内の動態を，ラン藻細胞を用いて明らかにし，光環境に応答するクロロフィル合成系の律則要因として，両PORが機能分化していることを明らかにした。また，光依存性PORの野性型及び改変型の組換え酵素分子を用いて，本酵素の機能に必須なシステイン残基を同定し，構造機能相関に新知見を提出した。これらの成果は，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。