



Title	ラン藻Plectonema boryanumのFd依存型とNADH依存型グルタミン酸合成酵素の遺伝学的, 生理学的研究
Author(s)	奥原, 宏明
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41572">https://hdl.handle.net/11094/41572</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

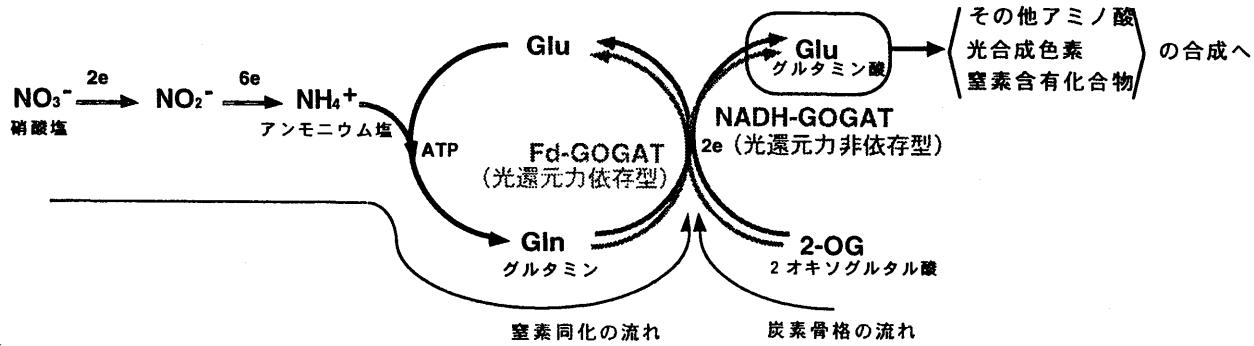
氏名	おくはらひろあき 奥原宏明
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第14406号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	ラン藻 <i>Plectonema boryanum</i> の Fd 依存型と NADH 依存型 グルタミン酸合成酵素の遺伝学的、生理学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 長谷 俊治  (副査) 教授 寺島 一郎 教授 二井 將光

## 論文内容の要旨

はじめに

植物をはじめとする光合成生物は光エネルギーを還元力として利用し、二酸化炭素や硝酸塩などの無機物を糖やアミノ酸などの有機物に同化することにより独立栄養的に生育している。光合成生物の独立栄養を支える無機物同化反応では炭素同化と窒素同化の2つの反応が最も生理的に重要であると考えられる。グルタミン酸合成酵素(GOGAT)は窒素同化経路の末端でグルタミン合成酵素(GS)と共にGS/GOGATサイクルを形成しており、このサイクルが一回りすることによって、アンモニア態窒素と2オキソグルタル酸の炭素骨格から新しくグルタミン酸を合成する。このようにGOGATは、同化窒素と同化炭素を結びつける働きをしているので、独立栄養的な生育上極めて重要な酵素と考えられる。

GOGATは還元力を利用してグルタミンと2オキソグルタン酸から2分子のグルタミン酸を生成する反応を触媒する。利用する還元力の違いから、光還元力をフェレドキシン(Fd)から直接利用するFd依存型(Fd-GOGAT)と、有機物の異化反応により生じる還元力を利用するNADH依存型(NADH-GOGAT)の2種類のGOGAT分子種が存在する。高等植物には両GOGAT分子種が共存するが、その生理的意義については未知な点が多い。本研究ではこ



のように同一生物種に 2 つの GOGAT 分子種が存在する生理的な意味について調べるために、光合成生物の中でも遺伝子破壊等の遺伝学的解析が容易なラン藻を研究材料として GOGAT の研究を進めた。糸状性ラン藻 *Plectonema boryanum* は完全暗所での従属栄養的生育が可能であるので、GOGAT 欠損により生じる形質を明暗条件で比較検討できることが期待される。

### 1. ラン藻の Fd-GOGAT と NADH-GOGAT 遺伝子のクローニング

*P.boryanum* の細胞粗抽出液中に Fd, NADH に依存した GOGAT 活性を見出し、クロマトグラフィーにより分画したところそれぞれの活性ピークが分離したことから、ラン藻にも高等植物と同様に Fd-GOGAT と NADH-GOGAT が存在することが示唆された。それぞれの GOGAT 遺伝子をクローニングするため既知の GOGAT のアミノ酸配列に基づいて一対の混合オリゴヌクレオチドを作製し、PCR を用いて 2 種類の遺伝子断片を得た。それぞれの断片をプローブとして *P.boryanum* のゲノムライブラリーよりスクーニングを行い、2 種類の DNA 断片をクローニングした。9,036 bp の DNA 断片 (DDBJ; D85230) 上には ORF 1,530 と ORF 492 が存在しており、それぞれが大腸菌の NADPH-GOGAT の大小サブユニットと相同性のあることから *gltB*, *gltD* と名付けた。もう一方の 6,063 bp の DNA 断片 (DDBJ; D85735) 上には ORF 1,551 が存在し、トウモロコシやその他の生物種の Fd-GOGAT と高い相同性をしめしたことから *glsF* と名付けた。*glsF* 及び *gltBD* を大腸菌で発現させて粗抽出液中の GOGAT 活性を測定したところ、前者では Fd-GOGAT 活性の、後者では NADH-GOGAT 活性の顕著な上昇が観察されたことから、*glsF* が *P.boryanum* の Fd-GOGAT を、*gltBD* が NADH-GOGAT をコードしていることが明らかになった。

### 2. GOGAT 遺伝子欠損により生じるラン藻の形質

*P.boryanum* の Fd-GOGAT と NADH-GOGAT がどのような生理的役割を持っているのか検討するために、それぞれの GOGAT 欠損株の単離を試みた。*glsF* を破壊した Fd-GOGAT 欠損株 (HOF 12) と *gltB*, *gltD* それぞれの遺伝子を破壊した NADH-GOGAT 欠損株 (HOB 12, HOD 12) を単離し、それぞれの GOGAT 欠損株の形質を生育条件を変えて調べてみた。

寒天培地上、光独立栄養条件 (明所;  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) と従属栄養条件 (暗所; 30 mM glucose) ではコントロール株と各 GOGAT 欠損株に生育の差が見られなかったことから、Fd-GOGAT と NADH-GOGAT は明暗条件で厳密には機能分化されていないことがわかった。また、Fd-GOGAT と NADH-GOGAT の二重欠損株は得られなかったところから、GOGAT は少なくともその一方がラン藻の生育に必須の酵素であることが示唆された。強光下 ( $165 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $\text{CO}_2$  (2 %) 含有空気を通気させて培養すると、*P.boryanum* 野生株は非常に速い増殖速度 (世代時間 7 h) で生育するようになる。この条件では NADH-GOGAT 欠損株が野生株と同じように生育するのに対し、Fd-GOGAT 欠損株は生育が遅れると共に細胞中のフィコビリントンパク質とクロロフィルの含量が低下し、黄色い色調を示した。この Fd-GOGAT 欠損株の形質は、光条件を強光から弱光 ( $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に移すと観察されなくなり、強光下でも  $\text{CO}_2$  を添加せず、空気のみを通気させて培養した場合でも特異な色調変化を示さず、野生株や NADH-GOGAT 欠損株と変わり無く生育した。以上のことから、ラン藻の Fd-GOGAT 欠損株の形質は強光による光傷害が原因ではなくて、充分な光と  $\text{CO}_2$  のもとで光合成炭素同化が増進した時に顕著に表れてくる現象であると考えられた。

### 3. Fd-GOGAT 欠損が引き起こすラン藻の C 同化と N 同化の不均衡

炭素同化反応が増進するような条件では、Fd-GOGAT 欠損株は、野生株に比べて光合成色素の含量を減らしながら緩やかに増殖した。この形質は、Fd-GOGAT 欠損による炭素同化と窒素同化の不均衡による結果だととの作業仮説が考えられる。そこで、Fd-GOGAT 欠損株と野生株の炭素同化能 (酸素発生速度) と窒素同化能 (アンモニア消費速度) を調べた。酸素発生速度は光強度があがるにつれて一定レベルまで増加し、Fd-GOGAT 欠損株と野生株とで変わらないことがわかった。アンモニアの取り込み速度は  $\text{CO}_2$  に依存しており野生株では光強度があがるにつれて増加したのに対し、Fd-GOGAT 欠損株ではそういった増強は認められなかった。以上の結果より、炭素同化反応の増進に釣り合う窒素同化能の上昇には Fd-GOGAT の寄与が重要であることが示唆され、これまで観察していた Fd-GOGAT 欠損株の形質がラン藻細胞内の同化炭素に対する同化窒素の相対的な低下が原因であると結論した。

Fd-GOGAT欠損株のフィコビリンタンパン質含量の減少は、ラン藻細胞内の相対的な窒素欠乏により遺伝子の発現レベルで制御されているという作業仮説のもとに、フィコビリンタンパク質遺伝子のノザン解析を試みた。まずプローブを調製するため *P.boryanum* のフィコビリソームのロッド部分を構成するフィコシアニン (PC) の遺伝子 (*cpcBA*) とコア部分のアロフィコシアニン (AP) の遺伝子 (*apcE*) 断片を PCR を用いてクローニングした。コントロール株と Fd-GOGAT 欠損株を、CO<sub>2</sub> を通気させながら弱光下で前培養した後、Fd-GOGAT 欠損株の形質の出る条件である強光条件下に移してから 0 ~ 6 時間培養したラン藻細胞から全 RNA を抽出し、*P.boryanum* の PC と AP 遺伝子断片をそれぞれプローブに用いてノザン解析を行った。コントロール株では強光に移してから 2 時間から PC 遺伝子の転写産物の蓄積量の増加が顕著に現れ始めたが、Fd-GOGAT 欠損株ではそのレベルがコントロール株の約 3 ~ 4 分の 1 程度に抑えられた。一方、AP 遺伝子の転写産物はコントロール株と大差は認められなかった。以上の結果から、Fd-GOGAT 欠損株では PC の含量低下は PC 遺伝子の転写量の低下によって引き起こされる可能性が示唆された。AP 遺伝子の発現は Fd-GOGAT 欠損株でそれほど減少していなかったが、細胞中の AP 含量はコントロール株の約 5 分の 2 程度まで減少しているので、この場合は転写レベルの制御以外の要因の関与も考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

奥原宏明君はラン藻 *Plectonema boryanum* にはフェレドキシン依存型と NADH 依存型のグルタミン酸合成酵素が異なる分子種として存在することを見い出し、それぞれの遺伝子のクローニングに成功しその実体を明らかにした。そして、これらの酵素の欠損株を作出して光合成機能に着目して生理学的解析を行い、フェレドキシン依存型酵素が炭酸同化と窒素同化の細胞内バランスを制御する役割を持っていることを証明した。

この業績は光合成細胞における炭素と窒素の無機物同化系の制御機構の一つを明らかにしたものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。