



Title	光合成炭素・窒素同化におけるフェレドキシン依存型とピリジンヌクレオチド依存型のグルタミン酸合成酵素の役割分業の生理学的、生化学的研究
Author(s)	新村, 佳奈子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59439
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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	新 村 佳 奈 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (理学)
学 位 記 番 号	第 2 5 2 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 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	光合成炭素・窒素同化におけるフェレドキシン依存型とピリジンヌクレオチド依存型のグルタミン酸合成酵素の役割分業の生理学的、生化学的研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 長谷 俊治 (副査) 教 授 栗栖 源嗣 教 授 倉光 成紀 准教授 大岡 宏造

論 文 内 容 の 要 旨

<背景と目的>

無機炭素と無機窒素の同化反応は、光合成生物の独立栄養を支える重要な反応であり、これらの反応には光エネルギーが用いられている。この窒素・炭素同化反応系の接点に位置するグルタミン酸合成酵素 (GOGAT) は、グルタミン合成酵素 (GS) によって合成された Gln のアミド基を炭素骨格として提供される 2-オキソグルタル酸 (2-OG) に結合させ、新しく Glu を合成する。新生された Glu は、様々な窒素化合物の形成に使われるので、GS/GOGAT サイクルの働きは極めて重要である。GOGAT は利用する電子供与体 (Fd、NADH、NADPH) の違いによって 3 つの分子種に分けられる。Fd-GOGAT は分子量 160 kDa のフラビン酵素で、FMN と[3Fe-4S]クラスターを 1 つずつ持つ。NADH-GOGAT 及び NADPH-GOGAT は、Fd-GOGAT に相同性のある α サブユニット (150~160 kDa) と、FAD と[4Fe-4S] を含む β サブユニット (50~60 kDa) で構成されている。これまでに、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 の Fd-GOGAT、窒素固定菌 *Azospirillum brasiliense* の NADPH-GOGAT α サブユニットの三次元構造が解かれ、両者の構造的類似性が示された。しかし、GOGAT 分子種の比較や分子間・分子内電子伝達機構の理解の為には、NADPH-GOGA 及び NADH-GOGAT の α β サブユニット全体や、Fd/Fd-GOGAT 複合体の構造の情報が必要である。

当研究室において、ラン藻の一種 *Leptolyngbya boryana* には Fd-依存型と NADH-依存型の 2 種類の GOGAT が存在することが確認されている。さらに、GOGAT 欠損株の解析から、両株は独立栄養的にも従属栄養的にも生育できること、Fd-GOGAT 欠損株は光と CO₂ を十分に与えた炭酸同化能が増加する条件で窒素欠乏の形質を示すことが明らかとなった。

この Fd-GOGAT 欠損による窒素欠乏の形質は、光強度が低くても、CO₂ 量を少なくしても観察されないことから、炭酸同化が増進した条件において Fd-GOGAT と NADH-GOGA は機能分業した役割を持つのではないかと考えた。そこで本研究では、「Fd-GOGAT には炭素同化量の増減に見合うよう窒素同化量を調節する役割がある」という仮説を立て、この仮説を検証するため、一生物種内に存在する 2 種類の GOGAT を生化学的、生理学的に比較解析した。さらに、両 GOGAT の機能を構造学的に比較するため、結晶化及び X 線結晶構造解析に取り組んだ。

＜結果と考察＞

Fd-GOGAT 欠損株における窒素欠乏の形質は、光と炭酸ガスを十分与えた条件でのみ観察される現象であった。そこで、光強度および CO₂ 量の違う条件下で育てた野生株・GOGAT 欠損株の細胞内アミノ酸量の測定を行った。野生株・NADH-GOGAT 欠損株ではどの条件下でもグルタミンの蓄積量は一定に保たれているのに対し、Fd-GOGAT 欠損株では炭酸同化が上昇すればその恒常性が崩れ、顕著なグルタミン量の上昇がみられることがわかった。さらに、Fd-GOGAT の欠損による形質は、細胞内 NADH-GOGAT 量を人工的に増やしても改善されることが明らかとなった。細胞破碎液を用いて測定した両 GOGAT 粗活性には差はみられていない。そこで、GOGAT の酵素活性の特性について検討するために、組換え GOGAT 蛋白質の発現系を構築し、精製標品を調整し、速度論的解析を行った。結果として、基質となる Gln と 2-OG に対する親和性は、NADH-GOGAT より Fd-GOGAT の方が高いことがわかった。これらのことから、NADH-GOGAT の増加させることで細胞内の総 GOGAT 量を上げても、触媒機能は同じにも関わらず生理的には Fd-GOGAT の代償とならないことが判明した。その原因の特定には至っていないが、Fd-GOGAT にのみに備わっている酵素特性（基質に対する親和性の高さ、Fd を介した光還元力の availability）が C/N バランスを支える重要な要因であると考えている。

光と CO₂ を十分与えた高炭酸同化条件において Fd-GOGAT に限定された役割が示唆されたことから、この酵素には細胞内 C/N 量に応答した発現調節機構が存在するのではないかと考えた。そこで、様々な光・炭酸条件化で生育させた野生株において細胞内 GOGAT 蛋白質量を調べたところ、高炭酸同化条件下で Fd-GOGAT 量が顕著に増加することが分かった。一方、NADH-GOGAT 蛋白質量については顕著な変動はみられなかった。さらに、転写レベルでの発現を調べるために、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として、プロモーターアッセイを行った。Fd-GOGAT 遺伝子のプロモーター（約 3.1kbp の領域）制御下のレポーター活性を調べたところ、光・CO₂ 量に依存した、まさに細胞内炭酸同化量の変動に応じた変化が観察された。この応答領域を絞り込むためにプロモーター領域をカッティングダウンしてアッセイを行った。Fd-GOGAT 遺伝子上流 500bp のプロモーター領域制御下では顕著な応答があったが、130bp ではレポーター活性自体がかなり少なく、ほとんど変動しなかった。一方、NADH-GOGAT のプロモーター活性は、光・炭酸の変動に対し顕著な応答はみられなかった。

以上の結果から、NADH を利用する NADH-GOGAT ではなく、光エネルギーを Fd から直接受け取る Fd-GOGAT が窒素同化と炭素同化のバランス維持に寄与しており、細胞内 C / N ステータスの変化に応じた Fd-GOGAT 遺伝子発現調節機構が存在することを明らかにした。さらに、Fd-GOGAT 遺伝子上流の 130～500bp 間に Fd-GOGAT 遺伝子発現に重要なシス領域が存在する可能性を提示した。また、構造学的な知見を得るために、Fd-GOGAT、NADH-GOGAT および、Fd/Fd-GOGAT 複合体の結晶化を行い、全ての結晶化に成功している。Fd/Fd-GOGAT 複合体の結晶中に、Fd、Fd-GOGAT 両者が存在していることは、吸収スペクトルおよび SDS-PAGE において確認した。これら結晶サンプルのうち、単結晶が得られる Fd/Fd-GOGAT 複合体に関して、放射光施設 SPring-8 にて回折実験を行い、2～3 Å の分解能があることを確認した。しかし、結晶の格子定数が $a = b = 84.95 \text{ \AA}$ 、 $c = 476.31 \text{ \AA}$ と c 軸が顕著に長く、回折点が重なってしまうため、構造解析が可能なデータセットを得るまでには至っていない。現在はそれぞれの結晶について、最適化条件の検討を行っている。

論文審査の結果の要旨

新村佳奈子は、シアノバクテリアに存在する 2 種類のグルタミン酸合成酵素（Fd-GOGAT と NADH-GOGAT）の生理的機能を明らかにするため、それぞれの酵素が欠損した変異株の光独立栄養条件下での生育や代謝特性を解析するとともに、それぞれの酵素の蛋白質および遺伝子レベルでの発現調節を解析した。その結果、両方の GOGAT は生理的条件下で酵素活性を発揮するが、特に Fd-GOGAT が光合成の炭酸同化と窒素同化のバランス調節に寄与する分子種であることを明らかにした。また、両酵素の組換え体を用いて結晶化にも成功し、Fd と Fd-GOGAT の電子伝達複合体の構

造決定の道を拓いた。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。