

光合成細胞における  
炭素同化系および窒素同化系の  
遺伝子の  
窒素による発現制御

堀江 石 著



報告番 甲 第 3258 号

①

光合成細胞における  
炭素同化系および窒素同化系の  
遺伝子の  
窒素による発現制御

鈴木石根



## 目 次

緒言	1
第1章 トウモロコシ C <sub>4</sub> 型 PEPC 遺伝子の窒素による発現制御機構	8
1-1 序論	9
1-2 結果	
1-2-1 単離核による in vitro 転写伸長反応の性質	10
1-2-2 窒素欠乏状態からの回復過程における C4ppc1 の転写とその転写産物の蓄積	11
1-2-3 C4ppc1 の窒素に応答した発現に関わるサイトカイニンの役割	13
1-2-4 C4ppc1 発現における細胞質でのタンパク質合成の必要性	14
1-3 考察	14
図表	17
第2章 ラン藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 の硝酸同化系酵素群の 転写と窒素による調節	22
2-1 序論	23
2-2 結果	
2-2-1 亜硝酸還元酵素遺伝子の転写開始点の決定	24
2-2-2 nirA-nrtABCD-narB 遺伝子群の転写	24
2-2-3 nirA オペロンの転写調節	25
2-2-4 nirA オペロンの転写に及ぼす MSX と Gln の効果	26
2-2-5 5-ジアゾ-6-オキソ-L-ノルロイシン (DON) の効果	26
2-3 考察	27
図表	30
第3章 ラン藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 における nirA オペロンと rbcL オペロンの窒素による発現制御機構の解析	38
3-1 序論	39
3-2 結果	
3-2-1 M45 における nirA と rbcL オペロンの転写産物の蓄積	41
3-2-2 M45 における nirA の活性化	42
3-2-3 nirA と rbcL の転写産物に及ぼすアンモニアおよび Gln の効果	42
3-2-4 Gln の代謝産物の nirA と rbcL の転写に及ぼす影響	43
3-2-5 CP の代謝産物の nirA と rbcL の転写に及ぼす影響	44
3-2-6 シアン酸の効果に及ぼす MSX の影響	45
3-3 考察	47
図表	50



第4章	ラン藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 の窒素同化とその調節に関わる新規遺伝子の同定と機能解析	5 8
4-1	序論	5 9
4-2	結果	
4-2-1	塩基配列と推定されるアミノ酸配列	5 9
4-2-2	<i>nirB</i> 、 <i>ntcB</i> の転写とその調節	6 0
4-2-3	<i>nirB</i> 、 <i>ntcB</i> 遺伝子の破壊	6 1
4-2-4	<i>nirB</i> 変異株の表現型	6 1
4-2-5	<i>ntcB</i> 変異株の表現型	6 2
4-3	考察	6 3
図表		6 6
第5章	ラン藻 <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 におけるCO <sub>2</sub> 制限条件下での亜硝酸還元酵素活性の調節	7 5
5-1	序論	7 6
5-2	結果	
5-2-1	細胞の生育、硝酸イオンの取り込みと 亜硝酸イオンの放出に及ぼすCO <sub>2</sub> 欠乏の影響	7 7
5-2-2	硝酸還元酵素の局在性	7 8
5-2-3	細胞の生育、NR、NiR 活性と 亜硝酸イオンの放出に及ぼすCO <sub>2</sub> 欠乏の影響	7 9
5-2-4	CO <sub>2</sub> 制限条件下でのNiR と NR の活性の変動	8 0
5-2-5	無機炭素源の再添加によるNiR 活性の増加	8 0
5-3	考察	8 1
図表		8 3
総合討論		8 7
材料及び方法		9 4
要約		1 0 4
参考文献		1 0 8
謝辞		1 1 6
報文のリスト		1 1 7
参考論文のリスト		1 3 9



## Abbreviations

Ant;	anthranilic acid
Asn;	asparagine
BLAST;	basic local alignment search tool
bp;	base pair
CA;	carbonic anhydrase
CarAsp;	carbamyl aspartic acid
Chl;	chlorophyll
cpm;	counts per minute
CHX;	cycloheximide
Cit;	citrulline
CP;	carbamyl phosphate
DLG;	D,L-glyceraldehyde
DON;	5-diazo-6-oxo-L-norleucine
E;	einstein
Fd;	ferredoxin
Glu;	glutamic acid
Gluc6p;	glucosamine-6-phosphate
Gln;	glutamine
GOGAT;	glutamate synthase
GS;	glutamine synthetase
h;	hour
HEPES;	N-2-hydroxyethylenepiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HPLC;	high-performance liquid chromatography
<i>kan<sup>r</sup></i> ;	kanamycin resistance gene cassette
kb;	kilo base pair
LHCP;	light harvesting chlorophyll a/b binding protein
min;	minute
MSX;	L-methionine-D,L-sulfoximine
NIB;	nuclear isolation buffer
NiR;	nitrite reductase
NR;	nitrate reductase
2-OG;	2-oxoglutarate
ORF;	open reading frame
PABA;	<i>p</i> -aminobenzoic acid
PCR;	polymerase chain reaction
PEPC;	phosphoenolpyruvate carboxylase
PPDK;	pyruvate ortho-phosphate dikinase
PS;	photosystem
Rubisco;	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase
s;	second
t;	time

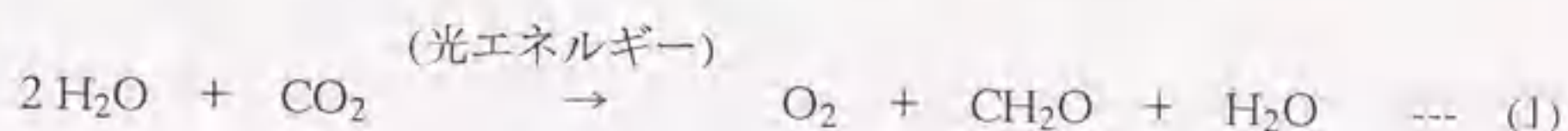


## 緒言



原始地球において大気の成分(メタン、アンモニア、シアン化物、水素、水)が、太陽光線、雷による放電、火山の熱、宇宙線、地球内部からの放射線などの様々なエネルギーにより重合してアミノ酸やヌクレオチドなどの低分子有機物を生じた。それらの有機物はやがて会合し、ある時偶然に自己複製能を有する生命が誕生したと考えられている。誕生した原始生命は有機物をさらに取り込んで生長し、次々とその子孫を生み出した。その過程で原始地球の「有機物のスープ」は消費しつくされ、生き残った生命体は、他の生命体を捕食する能力を身につけたもの、あるいは、生命の維持に必須な有機物を無機物から合成する能力を獲得したものであったと思われる。前者(従属栄養生物)は運動性を獲得し、他の生命体をより捕食しやすく、かつ捕食者あるいは環境の変化から逃れやすいよう進化した。一方、無機物からの有機物の合成は多量のエネルギーを必要とするので、後者(独立栄養生物)は運動能力を放棄し、様々な環境の変化に対して、その時々で最も効率よく有機物合成を営める様に適応する道を選択したと想像される。

今日地球上に生育する独立栄養生物は、光エネルギーを利用して、電子供与体  $H_2X$  から電子を獲得し、 $CO_2$  を還元して有機物  $CH_2O$  を合成する、いわゆる光合成生物である。光合成細菌においては硫黄、硫黄化合物や有機化合物が電子供与体であり、その多くは微好気的あるいは嫌気的環境下で生育する。それに対し、最も繁栄している光合成生物の高等植物、またはラン藻や真核藻類は、地球上に豊富に存在し生物の生育に必須な水  $H_2O$  を電子供与体とし、酸素を副産物として生成する型の光合成を行う。この反応は、式(1)に示される。



植物体を構成する必須元素の乾物重量に占める重量パーセントを、地核の元素存在度(クラーク数)で割って植物体への濃縮率を試算し、表1に示した。この値は、あくまでも地核を構成する元素の存在率によって求めた試算であり、植物の生育環境に存在し、植物に利用可能な状態の元素の存在率に基づくものではないが、全ての有機物の骨格をなす炭素について、窒素が高い割合で濃縮されていることは注目に値する。通常、光合成反応は、式(1)のように炭酸の同化に重きをおいて示されるけれども、実際の植物体においては炭素の同化だけでなく、窒素の同化も光合成の重要な部分を占めることをこの表は示している。

土壌中の窒素源の多くは高分子有機態であり、植物はそれを直接利用するこ



表 1. 植物乾燥重量中の必須元素とその地核中の存在度

Elements	Plants <sup>a</sup>	Earth <sup>b</sup>	濃縮率 <sup>c</sup>
H	6	0.14	42.9
C	45	0.02	2250
O	45	46.6	0.97
N	1.5	0.002	750
K	1	2.59	0.39
Ca	0.5	3.63	0.14
Mg	0.2	2.09	0.1
P	0.2	0.105	1.9
S	0.1	0.026	3.85
Cl	0.01	0.013	0.77
B	0.002	0.001	2
Fe	0.01	5	0.002
Mn	0.005	0.095	0.05
Zn	0.002	0.007	0.29
Cu	0.0006	0.0025	0.24
Mo	0.00001	0.00015	0.07

<sup>a</sup>: 最適な条件下で生育させた植物 (小麦) 中の必須元素の質量% (Epstein, 1965)

<sup>b</sup>: 地核の元素存在度 (クラーク数) 質量%

<sup>c</sup>: カラム a / カラム b

とは不可能である。また、利用可能な窒素源である、硝酸イオンまたはアンモニアは、土壌中からの溶脱、あるいは、硝化細菌と脱窒細菌の作用により  $N_2$  として土壌中から容易に失われてしまう。したがって、通常、植物は窒素栄養が欠乏した条件下での生育を強いられている。マメ科に代表される一部の植物が窒素固定細菌との共生能を獲得したり、食虫植物と呼ばれる植物群が動物性の窒素源を吸収するために特殊な形態の組織を分化させているのは、いずれも不足しがちな窒素源を補うべく進化した例であると考えられる。

光合成生物が通常の生育環境下で利用できる主要な窒素源である硝酸イオンは、まず能動輸送系を介して細胞内に輸送される。硝酸は、高等植物においてはピリジヌクレオチドを電子供与体とする硝酸還元酵素 (NR: EC 1.6.6.1, 1.6.6.2, 1.6.6.3)、ラン藻においてはフェレドキシンに依存性の硝酸還元酵素 (EC 1.7.7.2) によって亜硝酸に還元される (Guerrero et al., 1981)。亜硝酸はさらにフェレドキシン依存性の亜硝酸還元酵素 (NiR: EC 1.7.7.1) により還元され、アンモニアを生じる。こうして細胞内で硝酸の還元により生じたアンモニア、または外界から取り



込まれたアンモニアは、グルタミン合成酵素 (GS: EC 6.3.1.2) により、ATP の加水分解をともなつてグルタミン酸 (Glu) に付加され、グルタミン (Gln) のアミド態窒素として同化される。Gln のアミド基は複数のグルタミンアミド基転移酵素群によって、さまざまな窒素化合物の生合成に利用されるが、主には 2-オキソグルタル酸 (2-OG) に転移され 2 分子の Glu を生じ、再びアンモニアを固定するための基質になる炭素骨格を供給するのに用いられる (Lea and Milfin, 1975, Lea et al., 1982)。細胞にとって炭素の必要量に比べて窒素の必要量は少なく、同化量も窒素の方が少ないけれども、硝酸のアンモニアにまでの還元過程は 8 電子を要する反応であり、CO<sub>2</sub> を炭水化物にまで還元するのに必要な 4 電子に比べてより多くの還元力を必要とする。したがって、窒素の同化は、光エネルギーの転換により獲得した還元力のかなりの部分を消費する反応である。また、炭素骨格としての 2-OG の供給がなければ、植物は窒素を同化することはできない。

窒素は、生体内で主にタンパク質を構成する成分であるアミノ酸に含まれている。植物の光合成器官においては、大部分のタンパク質は光合成装置に投資されている。例えば、高等植物の葉組織の全タンパク質の 70-80 % は葉緑体に分布している。なかでも、ストロマにあってカルビン-ベンソンサイクルの炭酸固定反応と光呼吸の初発反応のいずれをも触媒する、リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ (Rubisco) や、チラコイド膜に存在し光エネルギーの捕集にはたらく集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質 (LHCP) は、それぞれ可溶性タンパク質と膜タンパク質の最も主要な成分である。そしてそれらは、地球上で最も存在量の多いタンパク質分子のひとつであると思われている (Ku et al., 1979, Bennett, 1979)。窒素同化量の欠乏は、これらのタンパク質の減少を引き起こし、植物の生育を大きく抑制する。このことは、植物の生育に必須な炭酸の固定と光エネルギーの捕集の効率は、いずれも同化された窒素の量に大きく依存していることを意味している。

以上述べたように、植物は慢性的に窒素栄養が欠乏した環境から自ら逃避することはできず、その窒素栄養環境に適応して光合成を営み生育する宿命にある。植物の窒素の同化には、炭素骨格としての炭素の供給が絶えず必要である。また窒素同化量は、炭酸固定系と光エネルギーの捕集系のタンパク質の発現量に影響を与え、その効率を規定する要因である。このように、それぞれの代謝経路は互いに接しており、独立に機能するものではない。したがって、植物がそれぞれの経路を相互に調節し最適化する機構を備えていることは、生存に有利であった



であろうと思われる。

今日までの植物栄養生理学では、炭素同化と窒素同化の密接な関連にも関わらず、それらは独立に研究されてきた傾向がある。その弊害は、農業生産の現場においても問題を生じつつある。例えば、有史以来人類は、作物に肥料を施して少しでも収量を上げる工夫を凝らしてきた。焼き畑や、動物やヒトの排泄物や堆肥を与えたり、窒素固定能を有するマメ科植物を鋤きこんだりする方法は古くから行われてきた。近代における科学技術の進歩によって、人工的に窒素と水素を反応させアンモニアを生成する方法が開発され、土壌の窒素不足は解決されるかに思われた。しかし今度は、人工窒素肥料の過剰投与が作物中に硝酸イオンの蓄積を招き、摂取したヒトや動物に害を与えることが報告された。また、硝酸イオンによる地下水や河川水の汚染、アオコなどの藻類の異常発生といった環境問題にも発展しつつある。これらは、先に述べてきたような炭素の同化と窒素の同化のバランスを考慮していなかったがために、生じてきた問題ではなかろうか。このような植物生産をめぐる弊害を解決する上にも、植物が潜在的に持つ炭素同化系と窒素同化系相互の調節機構を理解することが重要であろう。同化系の制御機構には、転写段階と翻訳後の段階での制御が考えられる。翻訳後の調節には、NR、スクロースリン酸合成酵素の活性調節系で知られる、リン酸化を介した機構がよく解析されている (Kaiser and Huber, 1994)。それに対し、転写段階における制御は現象として明らかにされてはいるが、その機構の解明にはいたっていない (Deng et al., 1991, Cheng et al., 1992, Vincentz et al., 1993)。

筆者は、対象を光合成細胞に絞り、炭素同化系と窒素同化系相互の調節機構の解明を目指すことにした。本研究で、実験材料とした光合成細胞は、トウモロコシ (*Zea mays* L.) の葉肉細胞とラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 である。トウモロコシは NADP-リンゴ酸酵素型の  $C_4$  植物であり、その炭酸固定は 2 種の光合成細胞、葉肉細胞と維管束鞘細胞の共同作業により行われる。維管束鞘細胞には、 $CO_2$  同化系のカルビン回路が局在し、その回路に付随した  $CO_2$  濃縮系 ( $C_4$  回路) の中枢が葉肉細胞に存在する。 $CO_2$  濃縮系の駆動部を構成する酵素は、フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、カーボニックアンヒドラーゼ (CA)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK) である。これらの酵素の発現と窒素栄養との関係が、本研究室で解析されていた (Sugiharto et al., 1990, 1992a, 1992b, Sugiharto and Sugiyama, 1992)。その結果、これらの酵素は細胞の窒素栄養状態に応答して誘導され、その蓄積は mRNA の蓄積の誘導に起因することが明らかにさ



れている (Sugiharto et al., 1990)。さらに、窒素同化の産物であるグルタミン (Gln) と植物ホルモンのサイトカイニンがシグナルとして、上記の mRNA の蓄積誘導をもたらすことが明らかにされている (Sugiharto et al., 1992a, 1992b)。これらの知見を基に、筆者はトウモロコシの葉肉細胞における、PEPC 遺伝子の mRNA の蓄積に必要な Gln とサイトカイニンの役割を明らかにすることを試みた。一般的に mRNA の蓄積量は、転写段階と mRNA の分解の段階において調節されている。この制御段階を解析するためには、核ゲノムに目的の遺伝子を導入した植物個体あるいは細胞を作製するかまたは、細胞内に目的の遺伝子を導入して一過的に発現させるかして、その遺伝子の転写活性を測定する方法、あるいは、細胞から核を単離して in vitro で転写伸長反応を行い特定の遺伝子の転写活性を測定する方法 (run-off assay) がよく用いられる。これまでトウモロコシでは、安定に外来遺伝子を細胞内で発現させる系は確立されていない。そこで筆者は、トウモロコシ葉からの単離核による run-off assay 系を開発し、PEPC 遺伝子の単離核における転写活性の解析を試みた。

前述したように、高等植物、特にトウモロコシにおいては、外来遺伝子の安定な導入、または標的遺伝子の選択的な破壊は容易ではない。したがって、筆者は、単細胞性のラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 を材料として無機同化系間の相互調節の研究を進めることにした。このラン藻は光独立栄養的にのみ生育し、植物の光合成細胞のモデルとしての特性を備えている。また、このラン藻は、細胞外の DNA を容易に取り込みゲノム上の相同領域と組み替えを起こす性質があり、遺伝子操作が容易であるので、ラン藻を実験材料とする利点は大きいと考えた。このラン藻の主要な窒素源である硝酸イオンは、細胞内へ能動輸送系を介して取り込まれ、硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素 (NiR) によってアンモニアにまで還元される (Guerrero et al., 1981, Guerrero and Lara, 1987)。ラン藻 *Synechococcus* においては、硝酸の細胞内への輸送の活性 (Sivak et al., 1989) と、NR、NiR 活性 (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986, Madueño et al., 1988a) が、培地中のアンモニアによって協調的に抑制されることが示されている。また、NR、NiR の活性は、アンモニアの存在下においても、グルタミン合成酵素の阻害剤 L-メチオニン-D,L-スルフォキシミン (MSX) で細胞を処理すると誘導される (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986) ことから、アンモニアそれ自身が抑制効果を持つのではなく、細胞内においてアンモニアの代謝によって生じた Gln あるいはその下流の代謝産物の蓄積が、一連の硝酸利用系のタンパク



質の発現の抑制に関わっていると考えられていた。しかし、硝酸利用系酵素群の協調的な発現制御機構と、シグナルとなる窒素化合物の実体は明らかではなかった。また、Glnあるいはその代謝産物による制御機構の解析は、トウモロコシの光合成遺伝子の発現制御機構の解明にも有益な示唆を与えると期待された。このラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 においては、これまでに硝酸同化に関わるNir遺伝子 (*nirA*)、硝酸イオン輸送体を構成する遺伝子群 (*nrtABCD*)、NRの構造遺伝子 (*narB*) の合計6つの遺伝子が、ゲノム上に近接して存在することが明らかにされていた (Andriessse et al., 1990, Kuhlemeier et al., 1984a, Omata, 1991, Omata et al., 1993, Luque et al., 1992)。この知見に基づき、筆者は、まずこれら硝酸同化系遺伝子群のアンモニアに応答した発現様式を解析した。また、このラン藻においては、細胞の窒素同化量の増加が硝酸同化系遺伝子の発現を抑制すると同時に、炭酸固定系酵素 Rubisco の遺伝子を活性化することを見出し、この現象を指標にして、両遺伝子の調節に関わっている窒素化合物の同定を試みた。また、光合成生物において、硝酸同化に関わる全ての成分が単離、同定されているわけではない。硝酸同化に関わる未同定の遺伝子の解析は、硝酸同化系の詳細な理解のために必要である。高等植物に比べてラン藻は、遺伝学的手法を駆使しやすく、未同定遺伝子の単離には有効であろうと考えられた。そこで、筆者は硝酸同化に関わる新規遺伝子を探索し、その塩基配列の決定と変異株の表現型の解析を行った。無機同化系の相互調節には、転写段階のみならず、翻訳後の段階での制御も重要な過程であると考えられる。そこで、ラン藻の硝酸同化系の酵素の活性調節における、転写後の調節機構を探索し、その解析を試みた。



## 第 1 章

# トウモロコシ C<sub>4</sub> 型 PEPC 遺伝子の窒素 による発現制御機構



## 1-1. 序論

植物の遺伝子の発現制御機構は、光合成に関わる遺伝子をはじめとして、特に光との関わりで研究されてきた。外的環境因子として光が取り上げられたのは、光が植物の生育に最も重要な因子であることに加えて、実験上その量や質を明確に制御できたからだと考えられる。光に次いで植物の光合成活性に影響を与える環境因子は窒素源である。植物にとって利用可能な窒素源は生育環境下では通常欠乏しており、その量は植物のバイオマスを規定する重要な化学的環境因子である。そのため、植物はお互いに利用可能な窒素をめぐって競合し、その質と量に対応して適応的に遺伝子の発現を制御していると考えられる。しかし、外的因子としての窒素の影響を解析するのは光ほど容易ではない。すなわち、供給する窒素の量をゼロにすることはできるが、植物の細胞内の窒素をゼロにすることは不可能である。また、窒素の供給を増減すれば、細胞内のタンパク質もそれにつれて増減するという固定概念が、この分野の研究を妨げてきた。ところが、最近になって窒素源の量や質に応答して発現が選択的に制御される遺伝子が、いくつか報告されている。その中には光合成の効率を規定するタンパク質遺伝子が含まれる。例えば、集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質 (LHCP)、Rubisco 小サブユニット (Plumley and Schmidt, 1989)、NADH-プラストキノン酸化還元酵素 (Peltier and Schmidt, 1991) 遺伝子の発現が、クラミドモナスにおいて窒素供給量によって特異的に制御されることが示された。また、トウモロコシの  $C_4$  光合成に携わる  $C_4$  型 フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ (PPDK)、カーボニックアンヒドラーゼ (CA) (Sugiharto et al., 1990, 1992a, 1992b, Sugiharto and Sugiyama, 1992)、キビの  $C_4$  光合成回路を構成するアラニンアミノ基転移酵素 (Son et al., 1992) や、アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (Taniguchi et al., 1995) の遺伝子発現が、窒素によって制御されることが示された。さらに、窒素同化に関わる硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素 (NiR) (Caboche and Rouze, 1990)、グルタミン合成酵素 (GS) (Hirel et al., 1987, Miao et al., 1991, Sakakibara et al., 1992a) や、ダイズの貯蔵タンパク質 vegetative storage protein (Staswick, 1990) の遺伝子発現においても窒素による選択的な制御が報告されている。

Sugiharto らは、窒素欠乏条件下のトウモロコシの葉において  $C_4$  光合成に関わる酵素の遺伝子の発現に及ぼす窒素の効果を調べ、窒素源の投与によって  $C_4$



型 PEPC、PPDK、CA の mRNA が蓄積し、その結果、それらのタンパク質が他のタンパク質に優先して蓄積することを明らかにしている (Sugiharto et al., 1990, 1992a, Sugiharto and Sugiyama, 1992)。mRNA の定常的レベルを決定する主要因は、それぞれの遺伝子に固有の転写速度とその転写産物の分解速度によると考えられているが、窒素に応答した  $C_4$  光合成遺伝子の発現の制御に関する機構は明らかではない。窒素欠乏状態にあるトウモロコシの切り取り葉で、 $C_4$  型 PEPC (*C4ppc1*) と CA の mRNA の蓄積を誘導するためには、植物ホルモンのサイトカイニンとグルタミン (Gln) の両方を添加する必要がある (Sugiharto et al., 1992a, 1992b)。サイトカイニンは、Rubisco 小サブユニット (Lerbs et al., 1984, Funckes-Shippy and Levine, 1985, Flores and Tobin, 1989)、LHCP (Flores and Tobin, 1986, 1989)、NR (Lu et al., 1990, 1992) の mRNA 蓄積量を促進する。興味深いことにこれらの遺伝子の mRNA の蓄積は、窒素の供給量にも応答して制御されることが知られている。また、植物の根で合成されるサイトカイニンの量は、供給窒素量に応じて著しく増減することが古くから知られていた (Feldman, 1975)。このように、転写産物の蓄積に及ぼす窒素とサイトカイニンの間に明らかな相関があるにも関わらず、それらが発現調節にどのように機能しているかは不明である。そこで、窒素に依存する  $C_4$  光合成遺伝子の発現におけるこれら 2 つのシグナルの役割を明らかにするために、葉肉細胞の単離核を用い PEPC 遺伝子の発現を転写段階に着目して解析した。

## 1-2. 結果

### 1-2-1 単離核による in vitro 転写伸長反応の性質

トウモロコシ葉から抽出した粗核画分を、パーコール不連続密度勾配遠心 (40 %/95 %/ sucrose cushion) により分画した。トリクロロ酢酸不溶性画分への [ $^{32}$ P] UMP の取り込みによって測定した転写活性は、用いた植物の窒素栄養の状態に関わらずパーコール濃度 40-95 % の界面に濃縮されていた。この画分を 4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) で染色し蛍光顕微鏡により観察したところ、DNA の蛍光を発する楕円形をした核が見られ、他の組織の破片の混入はほとんど認められないことがわかった。以後この画分を精製単離核として in vitro 転写伸長反応 (run-off assay) に用いた。我々が用いた条件下では、in vitro での RNA 合成は少なくとも 15 分間は一定速度で進行していた。そこで、窒素欠乏条



件下の植物と、窒素欠乏植物に 16 mM の硝酸を含む培養液を与えて 12 時間置いた窒素回復過程にある植物から、核を単離した。そしてそれぞれの核における *in vitro* RNA 合成活性とこの活性に及ぼす転写阻害剤の効果を 15 分と 30 分間の反応時間で測定し比較した (表 1-1)。窒素回復過程にある植物から単離した核の DNA あたりの転写活性は、窒素欠乏植物のおよそ 2 倍高かった。用いた転写阻害剤アクチノマイシン D は、2 本鎖 DNA にインターカレーションすることにより転写を阻害するので、RNA 合成酵素に対する特異性は低いのに対し、 $\alpha$ -アマニチンは RNA 合成酵素 II に特異的な阻害剤で mRNA の転写を阻害する。植物の窒素栄養状態に関わらず、*in vitro* RNA 合成活性は転写阻害剤である  $\alpha$ -アマニチンとアクチノマイシン D によって阻害された。アクチノマイシン D に対する感受性は、窒素欠乏の植物から単離した核より窒素回復過程の植物の核の方が高かった。それに対して、 $\alpha$ -アマニチンでは窒素欠乏植物からの核の方がより強く阻害された。これらの結果から、窒素回復の過程で全 RNA 合成にしめる rRNA 合成の割合が増加することが予想された。

15 分間の *in vitro* での RNA 合成反応の後、過剰量の非放射性のヌクレオチドを加えるかアクチノマイシン D を加えて行ったチェイス実験により、その後 35 分間には、一度取り込まれた放射活性の減少は見られなかった。このことから、この系による *in vitro* での転写産物の分解は少ないと判断した (data not shown)。

#### 1-2-2 窒素欠乏状態からの回復過程における *C4ppc1* の転写とその転写産物の蓄積

窒素欠乏植物 (0 時間) と窒素補填後 6, 12, 24, 48 時間後の植物からそれぞれ単離した核を用いて run-off assay を試みた (図 1-1)。それぞれの植物より単離した核を用いて *in vitro* で合成し RNA を精製した。ナイロン膜に固定した *C4ppc1* の cDNA に対し合成された RNA の放射活性をそろえて、ハイブリダイゼーションを行った。窒素回復の過程で *C4ppc1* の転写活性は顕著に増加し、12 時間後には窒素欠乏植物の約 6 倍に増加し、その後 48 時間まで高いレベルを保っていた (図 1-1 A)。それに対し、硝酸を与えなかった植物では *C4ppc1* の転写活性は次第に減少した (図 1-1 B)。興味深いことに *C4ppc1* の転写活性の増加は、暗期 (12 時間後) においても高い値を示していた。この結果は、*C4ppc1* の窒素による活性化は光のシグナルから独立していることを示唆するものであった。この可能性を検討するために、窒素補填と光照射サイクルを逆転させ、窒素欠乏植物に暗所で硝



酸を与えそのまま5時間暗所においた後、7時間光照射した植物の *C4ppc1* の転写活性を測定した。するとこの処理においても、*C4ppc1* の転写は同程度活性化されていた (data not shown)。したがって、窒素栄養状態に依存した *C4ppc1* の run-off 転写転写は光と独立した現象であろうと考えた。

表 1-1 に示したように、窒素補填によって単離核での RNA 合成反応に対する転写阻害剤の効果に変化が生じたことを反映して、rRNA の転写は *C4ppc1* の転写活性に先行して増加し、窒素補填後6時間で約4.5倍に活性化された (図 1-1 A)。それに対し、継続して窒素欠乏状態に置かれた植物では、rRNA の転写活性は実験の過程で徐々に減少していた (図 1-1 B)。

転写活性と mRNA の蓄積量の関係を調べるために、核の単離に用いた葉組織の一部から全 RNA を抽出し、*C4ppc1* の mRNA 蓄積量を測定した。*C4ppc1* の mRNA 蓄積量は窒素栄養の回復過程で増加し、窒素補填後3時間で既に蓄積し始め、12時間で最初のレベルの2.2倍に達し、以降はそのレベルを保った (図 1-1 A)。一方、窒素欠乏状態のまま生育させた植物においては有意な変化は見られなかった (図 1-1 B)。この結果は、*C4ppc1* の窒素による誘導は転写段階において制御を受けることを示している。しかしながら、転写活性の上昇に先立って転写産物は蓄積したこと、また、*C4ppc1* の転写活性の増加の割合に対しその mRNA 蓄積量の増加の割合が小さかったことのように、両者に相関が見られないことは注目に値する。このことは *C4ppc1* の発現が転写後の段階においても制御されていることを強く示唆している。

トウモロコシ葉には、少なくとも2種類の PEPC イソタンパク質が存在する (Ting and Osmond, 1973, Hayakawa et al., 1981, Hudspeth et al., 1986)。多量に存在する PEPC ( $C_4$  型) は葉肉細胞に特異的に発現するタンパク質で、 $C_4$  光合成回路の初期炭酸固定酵素である。それに対し、もう一方の PEPC ( $C_3$  型) は、黄化葉においても発現し、クエン酸回路に炭素骨格を供給する機能を有していると考えられている。また  $C_3$  型の PEPC は、 $C_4$  型の酵素でみられるグルコース 6-リン酸あるいはグリシンによる活性化を全く受けず、調節様式に関しても他の  $C_3$  植物の酵素と類似している。筆者は、窒素欠乏からの回復過程の植物から単離した核を用いて、*C3ppc1* の転写活性の測定を試みたがシグナルが弱く検出できなかった。そこで、葉組織から polyA-RNA を抽出し、ソルガムの *C3ppc1* の cDNA の 3' 非翻訳領域をプローブに用いて *C3ppc1* の転写産物の蓄積量の変化を測定した (図 1-1 A; 挿入図)。すると、*C3ppc1* の mRNA は窒素補填後48時間までの間に変化は



見られなかった。この結果から、*C3ppc1* の発現が窒素によって制御を受けていないことが明らかになった。したがって、*C<sub>4</sub>* 型の PEPC 遺伝子の転写産物が特異的に窒素供給量に応じて変動すると結論した。

### 1-2-3 *C4ppc1* の窒素に応答した発現に関わるサイトカイニンの役割

Sugiharto et al. (1992a) は、窒素欠乏状態にあるトウモロコシの切り取り葉において、窒素源の添加による *C4ppc1* と CA 遺伝子の mRNA の蓄積に、サイトカイニンが必須な成分であることを示した。サイトカイニンが窒素同化産物の蓄積を介して転写産物の蓄積を引き起こすのか、あるいは直接転写を活性化するかを明らかにするため、まず Gln の蓄積に及ぼすサイトカイニンの効果を検討した。窒素欠乏植物の葉を切り取り、天然に存在する型のサイトカイニンであるゼアチン存在下または非存在下で 16 mM の硝酸を添加し、2 時間後に葉内の Gln を測定した。その結果、5  $\mu$ M のゼアチンの添加、無添加に関わらず Gln の蓄積量は同様に増加した (data not shown)。このことからサイトカイニンは、Gln の蓄積量を変化することなく転写活性を増加させるか、あるいは、転写産物量の安定性を高めるのに寄与していると考えられた。切り取り葉へのゼアチンあるいは窒素源単独での投与は、*C4ppc1* の mRNA の蓄積を誘導しないことが既に報告されている (Sugiharto et al., 1992a, 図 3、4)。そこで、ゼアチンと窒素源の run-off 転写活性に及ぼす影響を検討した。*C4ppc1* の転写活性は切り取り葉にゼアチンのみを与えると著しく活性化された。それに対し、硝酸または Gln の投与だけでは、*C4ppc1* の転写をほとんど活性化できなかった (表 1-2)。ゼアチンのみの場合に比べてゼアチンと硝酸の両方を加えた場合はより高い転写活性が見られたので、run-off 活性に及ぼすゼアチンの効果は、窒素源の存在によって相乗的に高まると考えられた。以上の結果から、主にサイトカイニンは *C4ppc1* の転写活性を高め、Gln またはその下流の代謝産物は mRNA の蓄積量を増加すると考えた。

*C4ppc1* の発現において見られたサイトカイニンと窒素源による活性化が、トウモロコシの他の遺伝子についても見られるかどうかを検討した。窒素欠乏状態の切り取り葉を低窒素培養液のみ (図 1-2 A)、あるいは 5  $\mu$ M のゼアチンを含む高窒素培養液 (図 1-2 B) で 2 時間処理した組織を用いて、*C4ppc1*、GS1 (細胞質型 GS)、GS2 (プラスチド型 GS)、Fd-GOGAT、rRNA 遺伝子の転写活性を測定した。*C4ppc1* の転写はゼアチンと硝酸の添加で活性化されたが、それ以外の遺伝



子の転写はほとんど変化しなかった。したがって、窒素欠乏からの回復過程で見られるサイトカイニンと窒素源による転写の活性化は*C4ppc1*に特異的であり、その他の遺伝子でも一律に起こる一般的な現象ではないことが明らかになった。

#### 1-2-4 *C4ppc1* 発現における細胞質でのタンパク質合成の必要性

*C4ppc1* のサイトカイニンによる誘導に新たなタンパク質合成が必要か否かを検討するために、切り取り葉に細胞質でのタンパク質合成の阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を与えその影響を調べた (図 1-3)。ゼアチンを含まない低窒素培養液を 2.5 時間与えた場合の *C4ppc1* の転写活性と Gln 蓄積量をコントロールとし、その他の処理を施した葉での値を相対値で示した (図 1-3, ライン 1)。低窒素培養液に硝酸とゼアチンを 0 時間に加え 2 時間置いたものでは、*C4ppc1* の転写活性はコントロールの 3.5 倍に増加し、そのとき組織中の Gln の濃度は 8.7 倍に上昇していた (図 1-3, ライン 2)。Gln の濃度の上昇は以前の報告と一致していた (Sugiharto et al., 1992b)。硝酸とゼアチンを与える前に CHX を添加すると Gln の蓄積は観察されるが、*C4ppc1* の転写は完全に抑制された (図 1-3, ライン 3)。CHX を硝酸とゼアチンの添加の 1 時間後に投与すると、*C4ppc1* の転写は抑制された。このとき Gln の蓄積量の変化はそれほど大きくはなかった (図 1-3, ライン 4)。以上の結果から、サイトカイニンで誘導される *C4ppc1* の転写には細胞質でのタンパク質の合成が必要であることが明らかにされた。また、シクロヘキシミドは Gln の蓄積に影響を与えず、サイトカイニンの転写の活性化のみを阻害することがわかった。

### 1-3. 考察

これまで、Sugiharto らは、トウモロコシの植物体と切り取り葉の系を用いて、*C4ppc1* の mRNA レベルが窒素の供給量あるいはその同化量に依存して変化することを報告してきた (Sugiharto et al., 1990, 1992a, 1992b, Sugiharto and Sugiyama, 1992)。窒素欠乏の植物に窒素を補填すると、*C4ppc1* と CA 遺伝子の mRNA のレベルが増加する。その結果、葉の若い部位すなわち光合成装置が発達中の基部において、最も顕著にそれらのタンパク質が蓄積する。そこで筆者は、窒素供給量に応じた mRNA の蓄積が、遺伝子発現のどの段階で制御されるかを明らかにする目的で、植物個体を使って窒素欠乏からの回復過程における *C4ppc1*



の転写活性の変化を調べた。そしてこの mRNA の蓄積が転写段階および転写後の段階において調節されていることを示した。遺伝子発現を制御する要因の一つには mRNA の分解速度が考えられる。内因性あるいは外因性のシグナルが、おそらくは転写産物の分解やプロセシングの速度を制御することによって、数多くの mRNA の安定性を制御していると考えられる。窒素欠乏植物の光合成細胞においては、窒素の供給によって *C4ppc1* の転写活性の誘導に先立ってその転写産物の蓄積が増加した(図 1-1)。 *C4ppc1* の mRNA の蓄積は、窒素栄養状態に応じ mRNA の安定性を調節する何らかの機構によって、制御される可能性が考えられる。ジャガイモにおいては、植物体を暗所に移すと Rubisco の小サブユニットの mRNA のうち特定の分子種が短時間に分解を受ける。この場合、mRNA の特定の配列と特異的に相互作用を持つような因子の存在が提唱されている (Fritz et al., 1991)。トウモロコシにおける *C4ppc1* mRNA の窒素による安定化にも、同様の調節系が関与する可能性がある。

切り取り葉を用いた短時間の実験では、ゼアチンと窒素源の添加により *C4ppc1* の転写活性が著しく誘導されるにも関わらず、rRNA の転写活性はほとんど変化しなかった(図 1-3)。けれども、完全な植物個体を用いた実験においては、窒素の添加によって *C4ppc1* の転写活性の誘導に先立って、rRNA の転写が活性化されていた(図 1-1)。この違いは両実験の系が違ふことが原因であろうが、真の理由は不明である。切り取り葉の系では、例えば窒素欠乏の光合成細胞に rRNA の転写を誘導する根由来のシグナルのような、何らかの成分が欠けている可能性が考えられる。

サイトカイニンによる調節のされ方は遺伝子間で異なっている。たとえば、サイトカイニンによる NR の mRNA 蓄積量の増加は、転写段階でなされることが報告されている (Lu et al., 1990, 1992) が、LHCP の mRNA の蓄積は転写後の過程で制御される (Flores and Tobin, 1986, 1989)。遺伝子発現におけるサイトカイニンの機能は、分子レベルでは十分解明されているとは言えない。しかし、窒素の供給量がサイトカイニンのレベルを変動することはよく知られている。たとえば、ヒマワリ、樺、カエデ、オオバコ、アオウキクサの組織中のサイトカイニン量は、窒素欠乏条件で減少する (Salama and Waering, 1979; Horgan and Waering, 1980; Kuiper et al., 1989; Thorsteinsson and Eliasson, 1990)。窒素欠乏のトウモロコシの *C4ppc1* の mRNA の蓄積に必須な成分であるサイトカイニンと窒素源が、それぞれ転写段階と転写産物の安定性に作用するシグナルであることを示したことが、



この研究の意義である。Sugiharto ら (1992b) は、Gln またはその下流の代謝産物が、窒素栄養に応答した *C4ppc1* と CA の mRNA の蓄積の正のシグナルであると報告した。この遺伝子発現を制御する代謝シグナルが何であり、どの様に関わっているのか、また、植物のサイトカイニン代謝の詳細が明らかにされる必要がある。サイトカイニンは窒素の供給量の変化に応じて根で合成され、光合成組織に輸送され、そこで遺伝子の転写を活性化することによって  $C_4$  光合成遺伝子の発現を活性化していると推測できる。新たなタンパク質の合成は、*C4ppc1* の転写の活性化、あるいは窒素に依存した mRNA の安定性の制御に関わるタンパク質の発現に必要である可能性が考えられる。

トウモロコシにおいて光合成遺伝子の光誘導に、protein phosphatase I の関与が指摘されている (Sheen, 1993)。この仮説は、強力でかつ特異的な protein phosphatase の阻害剤であるオカダ酸によって、黄化葉に光照射したときに見られるクロロフィルの蓄積と、PPDK や Rubisco 小サブユニットのような光合成遺伝子の発現の誘導が阻害されることから導き出された。当研究室で行われた最近の実験結果によれば (Deji and Sugiyama, unpublished results)、窒素栄養に応答した *C4ppc1* の転写の活性化もオカダ酸によって阻害された。このことは、シグナル伝達機構の成分として、protein phosphatase 活性が関わっていること、遺伝子発現のシグナルとしての光と窒素の間に相関がある可能性を示唆するものである。



表 1-1. 窒素欠乏<sup>1</sup>と窒素回復過程<sup>2</sup>にあるトウモロコシ葉から単離した核での、run-off 転写活性に及ぼす $\alpha$ -アマニチンとアクチノマイシンDの影響。

	転写活性 ( $\times 10^4$ cpm/ $\mu$ g DNA) <sup>3</sup>			
	窒素欠乏		窒素回復	
	反応時間 (分)		反応時間 (分)	
	15	30	15	30
阻害剤なし	5.08 (100)	6.99 (100)	9.11 (100)	14.0 (100)
$\alpha$ -アマニチン	1.45 (28.5)	2.46 (35.1)	4.24 (46.5)	7.08 (50.6)
アクチノマイシンD	1.38 (27.2)	2.48 (35.5)	1.97 (21.6)	2.35 (16.8)

<sup>1</sup> 0.8 mM の硝酸を窒素源として2週間生育した植物の葉を収穫して核を単離し、in vitro 転写活性を測定した。

<sup>2</sup> 窒素欠乏条件下で生育した植物<sup>1</sup>に、16 mM の硝酸を含む培養液を補填し12時間後に葉を収穫して核を単離し、in vitro 転写活性を測定した。

<sup>3</sup> 転写活性は [<sup>32</sup>P]UMP の TCA 不溶性画分への取り込みによって測定した。カッコ内の数値は、阻害剤なしの値を 100 % として表示した相対値である。阻害剤濃度はいずれも 50  $\mu$ g/mL とした。



表 1-2. *C4ppc1* の run-off 転写活性に及ぼす窒素源とゼアチンの効果。

添加物	run-off 転写の相対活性
なし	1.0
16 mM 硝酸イオン	1.5
12 mM グルタミン	1.2
5 $\mu$ M ゼアチン	6.6
16 mM 硝酸イオン + 5 $\mu$ M ゼアチン	9.4

窒素制限条件で2週間生育したトウモロコシの葉を切り取り、様々な窒素源またはゼアチンを含む低窒素培養液で2時間インキュベートした後、その葉の基部から核を単離し、*C4ppc1* 遺伝子の転写活性を測定した。



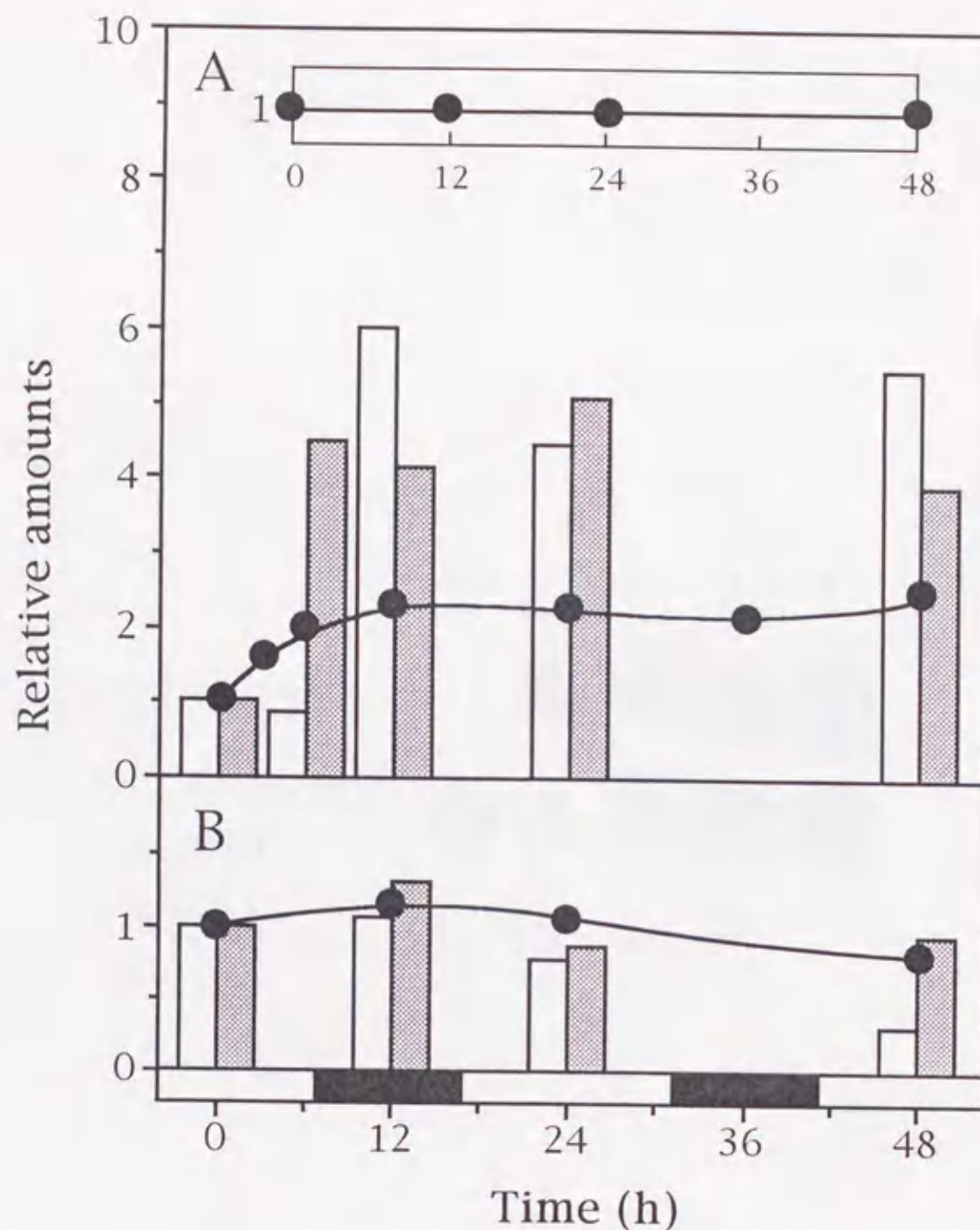


図 1-1. 窒素欠乏からの回復過程 (A) と窒素欠乏状態 (B) のトウモロコシ葉の *C4ppc1* と rRNA 遺伝子の転写活性と *C4ppc1* mRNA の蓄積量の変化。

窒素欠乏状態で2週間生育させた後、高濃度窒素培養液を補填したもの (A)、あるいはそのまま窒素欠乏状態を保ったもの (B) について比較した。黒丸は *C4ppc1* の mRNA 蓄積量を示し、白抜きの棒と陰を付けた棒はそれぞれ *C4ppc1* と rRNA 遺伝子の転写活性を表し、0時間の値を1として相対値で示した。図の下の白の帯は明期を、黒の帯は暗期をそれぞれ表している。パネルAの挿入図は窒素回復過程における *C3ppc1* mRNA の蓄積量の変化を示している。



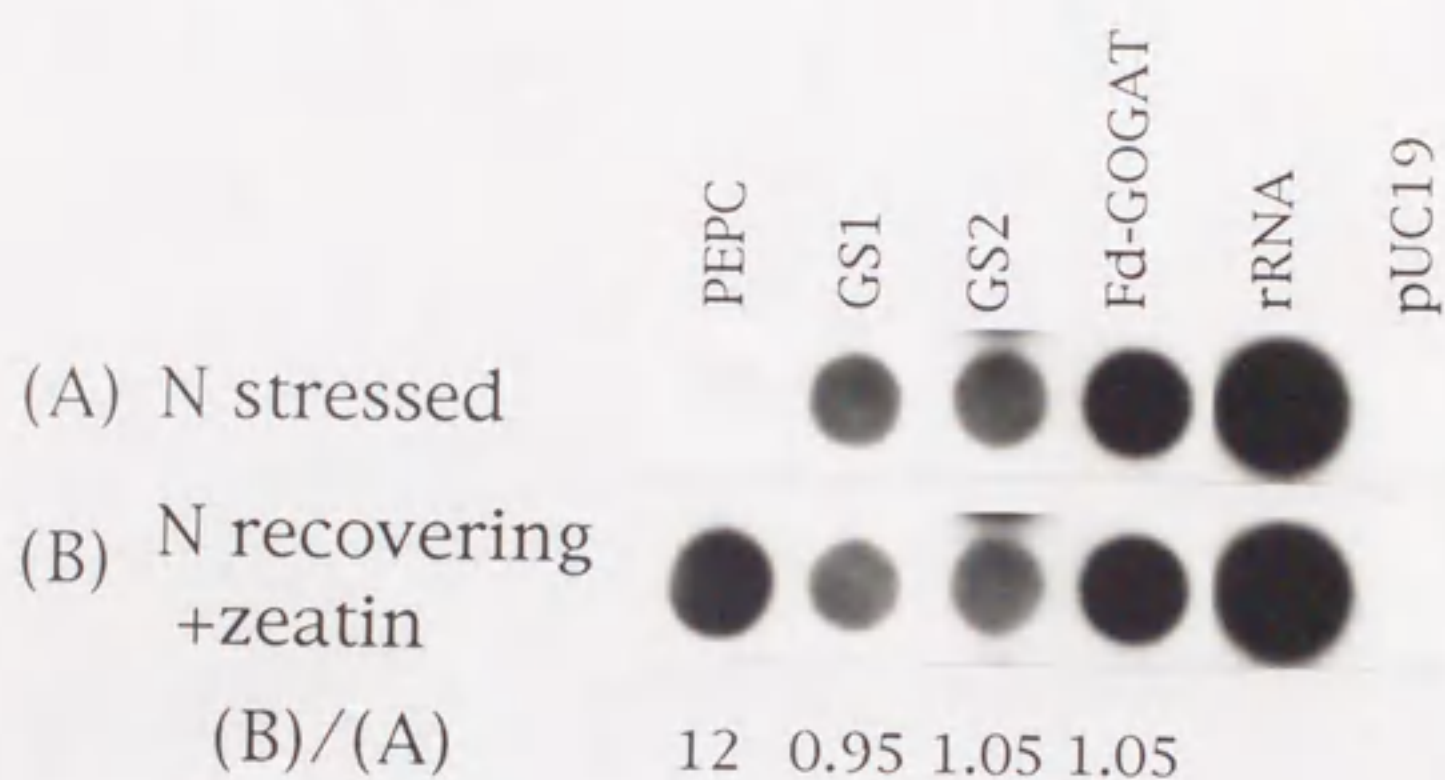


図 1-2. 窒素源とゼアチンで処理した切り取り葉における種々の遺伝子の転写活性。

窒素欠乏状態の植物から葉を切り取り、低窒素培養液でインキュベートしたもの (A)、ゼアチンを含む高窒素培養液でインキュベートしたもの (B) それぞれから、核を単離し転写活性を測定した。(A) と (B) の放射活性の比を下に示した。



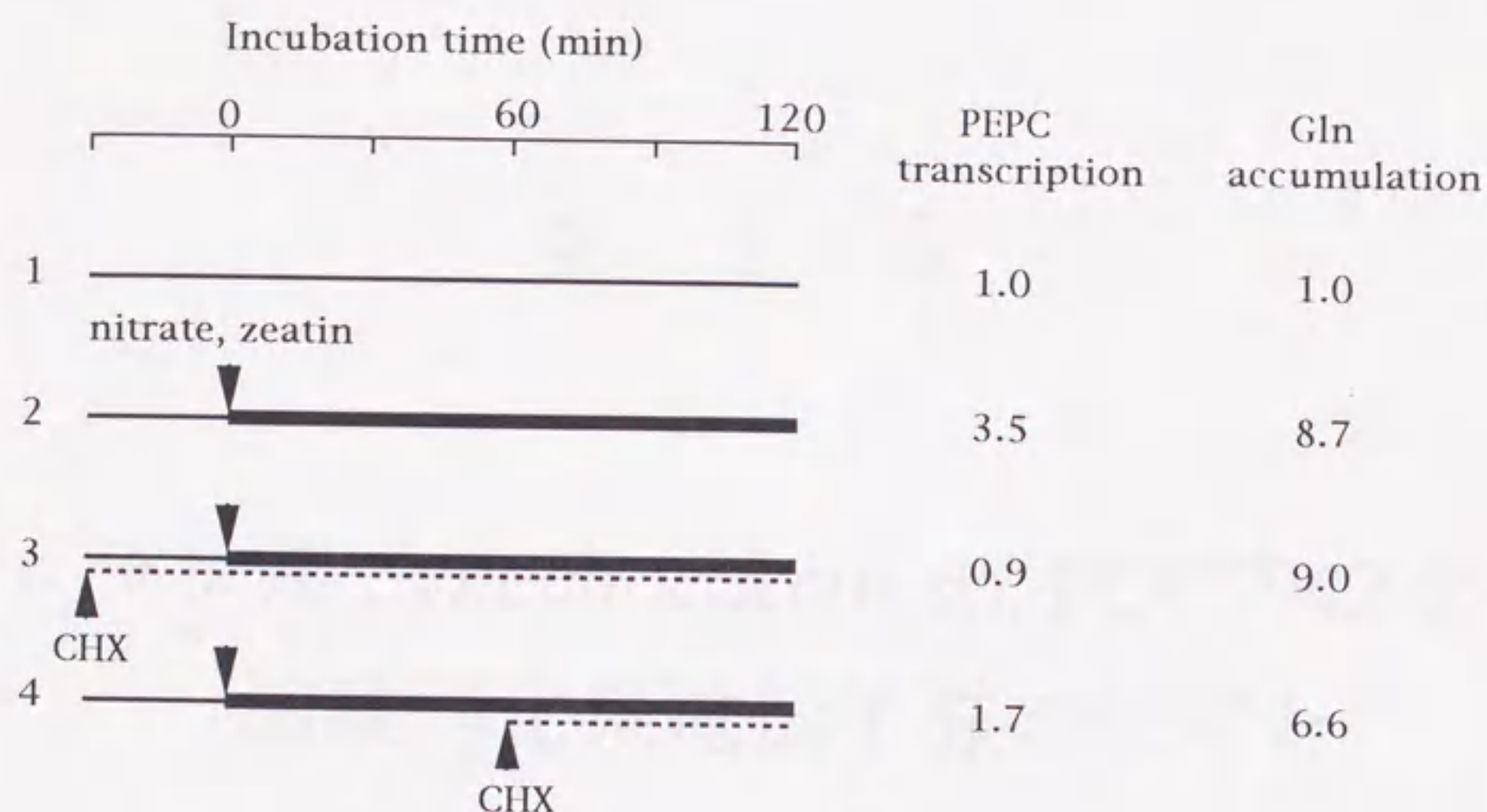


図 1-3. CHX 処理による *C4ppc1* 転写活性とグルタミンの蓄積量の変化。

窒素欠乏条件下で生育したトウモロコシの切り取り葉を、ゼアチンを含まない低窒素培養液 (細線) でインキュベートしたもの (ライン 1、コントロール)、30 分間低窒素培養液処理後ゼアチンと硝酸を加えインキュベート (太線) したもの (ライン 2)、30 分間 CHX (破線) を含む低窒素培養液で処理した後ゼアチンと硝酸を添加したもの (ライン 3)、30 分間低窒素培養液処理後ゼアチンと硝酸を加え 1 時間後に CHX を添加したもの (ライン 4)。ゼアチンと CHX の濃度はそれぞれ、 $5 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$  とした。*C4ppc1* 転写活性とグルタミンの蓄積量は、コントロールの値に対する相対値で示した。



## 第 2 章

### ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の 硝酸同化系遺伝子群の転写と 窒素による調節



## 2-1. 序論

ラン藻の主要な窒素源である硝酸イオンは、まず能動輸送系を介して細胞内に輸送される (Guerrero et al., 1981, Guerrero and Lara, 1987)。硝酸は、フェレドキシンに依存性の硝酸還元酵素 (EC 1.7.7.2) によって亜硝酸に還元され (Ida and Mikami, 1983, Andriessse et al., 1990)、亜硝酸はフェレドキシンに依存性の亜硝酸還元酵素 (NiR: EC 1.7.7.1) によりさらに還元され、アンモニアを生じる。こうして細胞内で硝酸の還元により生じたアンモニア、または外界から取り込まれたアンモニアは、グルタミン合成酵素 (GS: EC 6.3.1.2) により、ATP の加水分解をともなってグルタミン酸 (Glu) に付加され、グルタミン (Gln) のアミド態窒素として同化される。Gln のアミド基は複数のグルタミンアミド基転移酵素によって、さまざまな窒素化合物の生合成に利用されるが、主には 2-オキソグルタル酸 (2-OG) に転移され 2 分子の Glu を生じ、再びアンモニアを固定するための基質になる炭素骨格を供給するのに用いられる (Lea and Mifflin, 1975, Lea et al., 1982)。

ラン藻 *Synechococcus* においては、硝酸同化に関わる NR、NiR 活性の発現がアンモニアによって抑制されることが以前から知られていた (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986)。近年になって、硝酸の細胞内への輸送の活性 (Sivak et al., 1989)、および、硝酸イオンの輸送に関わる NrtA タンパク質の生合成 (Maduerno et al., 1988b, Omata et al., 1989, Sivak et al., 1989) も、培地中のアンモニアによって抑制されることが明らかになり、アンモニアによる硝酸同化系の抑制機構が注目されるようになった。このアンモニアの抑制効果に関しては、GS の阻害剤である L-メチオニン-D,L-スルフォキシミン (MSX) で細胞を処理すると、アンモニアの存在下においても NR、NiR の活性が誘導されることから (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986)、アンモニア自身が抑制する効果を持つのではなく、細胞内でアンモニアの固定により生じる Gln あるいはその代謝産物が、硝酸同化活性の発現を抑制すると考えられている。しかし、その調節に関わる代謝産物が何であるのかは明らかではない。アンモニアで生育し窒素栄養が充足した細胞と窒素欠乏条件下の細胞で、細胞内の Gln 量に有意な違いがないことから Coronil らは、Gln が硝酸利用系の抑制に関わっている可能性は低いと主張している (Coronil and Lara, 1991)。近年、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 において、硝酸イオンの輸送に関わる細胞膜タンパク質 NrtA の遺伝子がクローニングされた (Omata et al., 1989)。これをきっかけにして、*nrtA* の上流に



NiR をコードする遺伝子 (*nirA*; Omata, 1991, Luque et al., 1992) が、また、*nrtA* の下流に硝酸イオン輸送体をコードする 3 つの遺伝子 (*nrtBCD*; Omata et al., 1993) が同定された。さらに以前にクローン化されていた、フェレドキシン依存性硝酸還元酵素 (NR) をコードする遺伝子 (*narB*, Kuhlemeier et al., 1984a, Andriessse 1990) が *nrtD* の下流に位置することが示され (Omata et al., 1993)、硝酸同化に関わる *nirA*, *nrtA*, *B*, *C*, *D*, *narB* 遺伝子がゲノム上にクラスターを形成して存在することが明らかにされた。

これらの知見を基に、筆者は、*nirA*, *nrtA*, *B*, *C*, *D*, *narB* 遺伝子の発現のアンモニアによる調節様式を解析した。また、*nirA* 遺伝子の発現に及ぼすアンモニア同化の阻害剤の効果を調べ、いかなる代謝化合物が転写の抑制に機能するかを考察した。

## 2-2. 結果

### 2-2-1 亜硝酸還元酵素遺伝子の転写開始点の決定

クローニングした *nirA* の翻訳開始点からその上流 664 bp までの間に、*nirA* と同一の転写方向に有意な ORF は見いだされなかった。そこで *nirA* の転写開始点を決定し、*nirA* を含む転写単位のなかでこの遺伝子が最上流に位置することを確認する目的で、S1 マッピングを行った。その結果、*nirA* 遺伝子の転写開始点は、開始コドンより 29 塩基上流と決定され (図 2-2, 635 bp, 図 2-3)、*nirA* 遺伝子の上流に共転写される遺伝子は存在していないことが示された。後述するノーザン解析の結果と同じく、アンモニア培地で生育した細胞の RNA を用いると、S1 ヌクレアーゼ消化から保護された断片は検出されず、転写産物が蓄積していないことが示唆された (data not shown)。

### 2-2-2 *nirA-nrtABCD-narB* 遺伝子群の転写

*Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞から抽出した全 RNA を用いてノーザン解析をおこない、*nirA* 転写産物の大きさと蓄積量を調べた (図 2-4、レーン1, 2)。アンモニアで生育した細胞からは *nirA* 転写産物は検出されなかったが (図 2-4、レーン1)、細胞を硝酸培地へ移すと転写産物が蓄積した (図 2-4、レーン2)。ハイブリダイズしたシグナルは明瞭なバンドにならず、およそ 1.3 と 2.0 kb の位置に 2 本の濃いバンドがあるものの、0.25~7.5 kb 以上にまでスミアーな状態に広がってい



た。同じ RNA の試料を用いて *psbA* の転写産物の検出を試みたところ、Golden et al. (1986) によって報告されているとおりの明瞭なシグナルを得た (図 2-4、レーン 13, 14)。したがって、*nirA* の転写産物がスミアーな状態なのは、RNA の抽出と解析の過程での分解によるものではないと、考えられた。1.3 と 2.0 kb の 2 本のバンドは、おそらく多量に存在する rRNA のバンド (1.5, 2.5 kb) の下方に、*nirA* のプローブとハイブリダイズすべき RNA が圧縮されたことによると考えられた。以上の結果から、*nirA* は 7.5 kb 以上の長さの mRNA として転写され、細胞内で速やかに分解されているものと結論した。*nirA* の転写開始点と *nrtD* の終止コドンとは 6.7 kb 離れているので、少なくとも *nirA-nrtABCD* の 5 つの遺伝子は単一のオペロンとして転写されていると推定した。

*nrtABCD* それぞれの遺伝子の特異プローブを用いたノーザン解析によって得られたシグナルは、*nirA* 特異プローブの結果と類似しており、アンモニアで生育した細胞では検出されず、アンモニアで生育させた細胞を硝酸培地へ移して 15 分後に検出され、その大きさは 0.25~7.5 kb 以上にまでわたっていた (図 2-4、レーン 3-10)。このことは、*nrtABCD* が *nirA* とオペロンを構成していることを支持する結果であった。同様のシグナルは、*narB* 特異プローブを用いた場合にも観察された (図 2-4、レーン 11, 12)。この結果は、*narB* も *nirA-nrtABCD* とともに転写されていることを示唆するものである。*nrtD* と *narB* の間は 197 bp 離れており (Omata et al., 1993)、以前に *narB* のプロモーター領域が存在することが示唆されていたが (Andriessse et al., 1990)、我々が S1 マッピングを試みた限りはその領域内に転写開始点を見いだせなかった (Suzuki et al., unpublished results)。また、転写終結シグナルを持たないカナマイシン耐性遺伝子 (*kan<sup>r</sup>*) を *nrtD* の中の *Xba*I サイト (図 2-1) に、*nirA-nrtABCD-narB* の転写と同じ方向に挿入すると、*kan<sup>r</sup>* の構成的なプロモーターにより NR 活性が構成的に発現するようになる (Omata et al., 1993) のに対し、逆向きに挿入した株においては NR の活性が全く見られなかった (Suzuki et al., unpublished results)。これらの結果は、*nrtD* と *narB* との間にプロモーターも転写終結シグナルも存在していないことを示しており、*nirA*, *nrtABCD*, *narB* からなる 9 kbp 以上にもわたる大きな転写単位が存在する事を示すものであった。これ以後この転写単位を *nirA* オペロンと呼ぶことにする。

### 2-2-3 *nirA* オペロンの転写調節

アンモニア培地で生育した *Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞を、アンモニ



アを含まずに硝酸をのみを含む培地に移した後の、*nirA* 遺伝子の転写産物の蓄積量と NR, NiR 活性の時間変化を図 2-5 に示した。*nirA* 転写産物の蓄積は細胞を硝酸培地に移した後、速やかに増加し、20 分で最大値に達した。それに対し、NR と NiR の活性は 30 分後に増加し始め、90 分で最大値に達した。NR と NiR の活性の上昇につれて *nirA* 転写産物の蓄積量は減少し、最大値の 10 % 以下のレベルで平衡に達した (図 2-5)。この結果は、硝酸同化系を経て合成される代謝産物の蓄積によって、*nirA* オペロンの転写の転写が負のフィードバック調節を受けていることを示している。*nirA* 転写産物が蓄積しつつある時点で、リファンピシンを添加して RNA 合成を阻害すると、転写産物の蓄積量は急激に減少した。このことは *nirA* 転写産物が細胞内において不安定ですばやく代謝回転されていることを示唆している (図 2-6)。培地中へアンモニアを添加した場合には、リファンピシンの添加の場合と同様に、転写産物の蓄積の急激な減少が見られた。このことから、培地中のアンモニアは *nirA* オペロンの転写を阻害することが示された。*nirA* の転写産物は、アンモニアで生育した細胞を窒素無添加の培地へ移しても誘導された (Suzuki et al., unpublished results)。このことから、*nirA* オペロンは培地からアンモニアを除去すれば活性化され、硝酸を必要としないことが明らかにされた。

#### 2-2-4 *nirA* オペロンの転写に及ぼす MSX と Gln の効果

MSX を培養液に加え GS によるアンモニアの固定を阻害すると、アンモニアを含む培地であっても速やかな *nirA* オペロンの転写産物の蓄積が認められた (図 2-7 A; 白丸)。10 mM のグルタミンであらかじめ細胞を処理しておくと、MSX による *nirA* オペロンの誘導は抑制された (図 2-7 A; 黒丸)。これらの結果は、*nirA* オペロンの発現の抑制がアンモニア自身の効果によるのではなく、アンモニアが Gln に同化されることによって引き起こされることを示している。

硝酸を窒素源として生育している細胞に MSX を添加しても、*nirA* オペロンの活性化は観察された (data not shown)。このことは硝酸培地で生育させた細胞においては、硝酸還元により生じたアンモニアが Gln に同化された結果、*nirA* 転写産物の量が抑制されていることを示している (図 2-5)。

#### 2-2-5 5-ジアゾ-6-オキソ-1-ノルロイシン (DON) の効果

*nirA* オペロンの転写におよぼすアンモニアの抑制効果が、その初期同化産物



である Gln によるものか、Gln から生合成される含窒素化合物によるものかを明らかにするため、グルタミンアミド基転移酵素の阻害剤である DON の、*nirA* オペロンの転写産物の蓄積に及ぼす効果を調べた。アンモニアで生育している細胞 (図 2-7 B) と、硝酸で生育している細胞 (図 2-8 A) に DON を加えると、いずれの細胞においても *nirA* オペロンは活性化された。MSX の添加の場合と異なり、DON は Gln による前処理の有無に関係なく *nirA* の転写を活性化した (図 2-7 B)。このことは、Gln が直接 *nirA* オペロンの転写を抑制するのではないことを、示している。DON で処理した場合の転写産物の蓄積量は、MSX 処理の細胞に比べて低かった。おそらくこれは、MSX が既に生成されている細胞内 Gln のプールには影響を与えないのに対し、DON では Gln からのすべてのアミド基転移反応が阻害されるために、プリン、ピリミジンなどの合成が直ちに阻害され、RNA 合成の低下が引き起こされるためと考えられる。DON で細胞を処理した場合の、細胞内の Gln 濃度と *nirA* の転写産物の量の時間変化を図 2-8 に示した。DON は GS/GOGAT サイクルの後者を阻害することによってアンモニア同化を阻害するので、DON を添加するとグルタミンの蓄積と、グルタミン酸の減少が引き起こされた (図 2-8 B)。けれども、このとき同時に *nirA* オペロンの転写が活性化された。*Synechococcus* の細胞内の水性の画分のしめる体積を 100  $\mu\text{L}/\text{mg Chl}$  として概算すると (Shelp and Calvin, 1984)、DON で処理した細胞内には 10 mM のグルタミンが蓄積していることになる。この結果からグルタミンが *nirA* オペロンの転写を直接抑制するわけではなく、Gln の代謝産物が *nirA* オペロンの抑制作用を持つと結論した。

### 2-3. 考察

*Synechococcus* sp. PCC7942 のゲノム上で *nirA*, *nrtABDC*, *narB* が近接して存在していることは以前に明らかにされていた (Omata et al, 1993) が、それらの遺伝子の転写がポリシストロニックに行われるかどうかは、明らかではなかった。筆者は、この章に記した研究から、硝酸の同化に関わる 6 つの遺伝子すべてが一つの大きな転写単位として存在していることを、明らかにした。その結果、*Synechococcus* における NR、NiR と硝酸の輸送の活性の協調的な発現 (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986, Madueño et al., 1988a, Sivak et



al., 1989) は、単一のオペロンを構成する 6 つの遺伝子の共転写によって説明できることが示された。以前の研究では、硝酸で生育させた細胞の RNA を用いたノーザン解析により、*nrtA* の転写産物として 1.4 kb の断片が検出されていた (Omata et al., 1989)。しかしながら、そのノーザン解析の結果にも、より移動度の小さいスミアー状のシグナルを認めることができる (Omata et al., 1989, 図 3)。*nrtA* が長い単一のオペロンを構成する遺伝子の一つであり、そのオペロンの転写産物が非常に不安定であることを考慮すると、弱いスミアー状のシグナルが *nirA* オペロンの転写産物によるものであらうと思われる。*nrtA* の転写産物として報告されている 1.4 kb のバンドは、おそらく 1.5 kb の rRNA のバンドの下方に圧縮されたオペロンの転写産物によるものと推定される。定常的に硝酸イオンを窒素源として生育した細胞の *nirA* オペロンの転写産物の蓄積量は少ないので (図 2-5)、*nirA* オペロンの転写産物の検出が困難であったと思われる。

*Synechococcus* の細胞を MSX で処理すると NR と NiR の活性が誘導されることから (Herrero et al., 1981, Herrero and Guerrero, 1986)、アンモニア同化によって生じる窒素化合物が硝酸同化系を阻害していると考えられてきた (Guerrero and Lara, 1987)。著者が今回ここに示した *nirA* オペロンの MSX による活性化と、Gln によるその抑制は (図 2-7)、遺伝子の転写レベルにおいて上記の仮説を支持するものである。さらに、Gln からのアミド基転移反応を阻害した場合に、細胞内での Gln の蓄積と *nirA* オペロンの転写の活性化が同時に観察されることから (図 2-7 B、図 2-8)、Gln それ自身は *nirA* オペロンの抑制シグナルではなく、Gln からのアミド基の転移により合成される化合物、あるいは、その代謝産物が *nirA* オペロンの抑制に関わっていることが明らかになった。Gln からのアミド基転移反応は、様々な代謝経路に何度も重複して存在するので、*nirA* オペロンの抑制シグナルとして働く代謝産物の同定には、さらなる研究が必要である。

硝酸培地で生育した細胞における *nirA* 転写産物は、その量は少ないけれども定常的に蓄積していることが示された (図 2-5)。このことは、その細胞で常にオペロンは転写されていて、転写の速度が分解の速度と釣り合っていることを示している。硝酸で生育している細胞に DON を添加すると速やかに転写産物が蓄積する (図 2-8) ことから、その細胞においてもグルタミンから作られる代謝産物が *nirA* オペロンの転写を抑制していることがわかる。しかしながら、その量はオペロンの転写を止めてしまうほど多くはない。硝酸還元によって生じるアンモニ



アの量では *nirA* の転写を停止するにはいらず、硝酸からのアンモニアの生成量がシグナルとなる代謝産物の蓄積量を規定していることを示している。



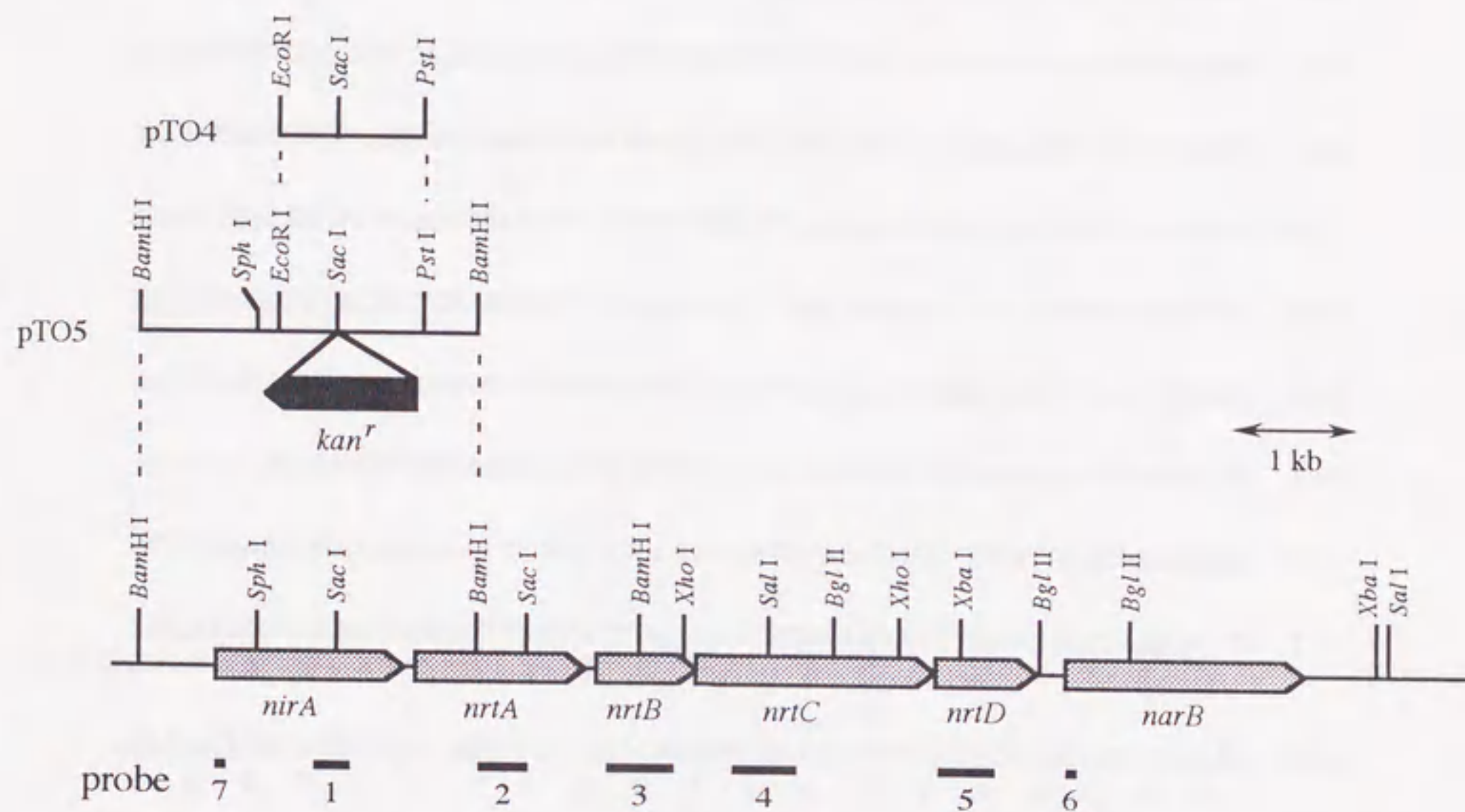


図 2-1. *Synechococcus* sp. PCC7942 の *nirA-narB* のゲノム領域の物理地図。

地図の下方の太線は、ノーザン解析 (1 から 6) あるいは、ドットブロット解析 (プローブ 7) のプローブに用いた領域を示している。地図の上方には、pTO4 にクローニングした 1.1 kb の染色体断片と、N1 変異株から pTO5 にクローニングした、*Sac*I サイトにカナマイシン耐性遺伝子 (黒く塗りつぶして示した) が挿入された *nirA* 遺伝子を含む断片を示した。



GGATCCTGACTGCTGGCTAAGGCCGGTAGTAGCCAAGTCCGTTTCAGCTAAGTCGGCTAGG 60  
GCCGCTTGAATGATGTCAGTTGCATTCGACCCCTGGGCCAGCCAAGCTTTATAAATTTCT 120  
GTTTTGACCAAACCATCCCGACATAACTCGGTTCAGGGCTTGCAAAACAGCGGGGATGCGA 180  
TCGTGCTGCCAGAGACTGCAAAGGTGAGCCAATAACCACTGCGTCTGCCAGTCATCAGGT 240  
ATCGCTTGGCAGCGCTGCAACCCAGCTTCGAGGACGCGAACATCAACTGTTTTGGCCAGT 300  
TGCTGAACCTGTCGCCAACAATGTTCAAAATCACCGCTTGGCCAGCCGTCCTCTCTGCA 360  
AACGCTGCATCAGTCATGTGCAATCAATACAGGTAAAAACCATGCTAATGGCTCCACCT 420  
AAGCGGGCTTCAGAGTCAAGGCTTGTAGCAATTGCTACTAAAACTGCGATCGCTGCTGA 480  
AATGAGCTGGAATTCTGTCCCTCTCAGCTCAAAAAGTATCAATGATTACTTAATGTTTGT 540  
TCTGCGCAAACCTTCTTGCAGAACATGCATGATTTACAAAAAGTTGTAGTTTCTGTTACCA 600  
ATTGCGAATCGAGAACTGCCTAATCTGCCGAGTATGCAAGCTGCTTTGTAGGCAGATGAA 660  
TCCATGGCTCAAGCCACCGCTACTACTGAAAACTCAATAAATTTGAGAAGCTAAAACTT 720  
nirA> M A Q A T A T T E K L N K F E K L K L  
GAAAAAGATGGTCTCGCTGTCCGCGACCAAATTCAGCATTTTGCCTCGATTGGCTGGGAA 780  
E K D G L A V R D Q I Q H F A S I G W E  
GCAATGGACCCCGGCGATCGCGAACATCGCTTGAAGTGGCTGGGTATTTTTTGGCGACCC 840  
A M D P G D R E H R L K W L G I F W R P  
GTTACGCCAGGCCGGTTTATGGCACGGCTCAGAATTCCCAGCGGCATTCTGCAGAGCCAA 900  
V T P G R F M A R L R I P S G I L Q S Q

図 2-2. *Synechococcus* sp. PCC7942 の *nirA* の上流域を含むゲノム領域の塩基配列。

pTO05 にクローニングした DNA 断片の *nirA* の転写開始点を含む 900 bp の塩基配列を示し、その下に *nirA* の推定アミノ酸配列を記した。S1 マッピングにより決定した *nirA* の転写開始点を矢印で示した。



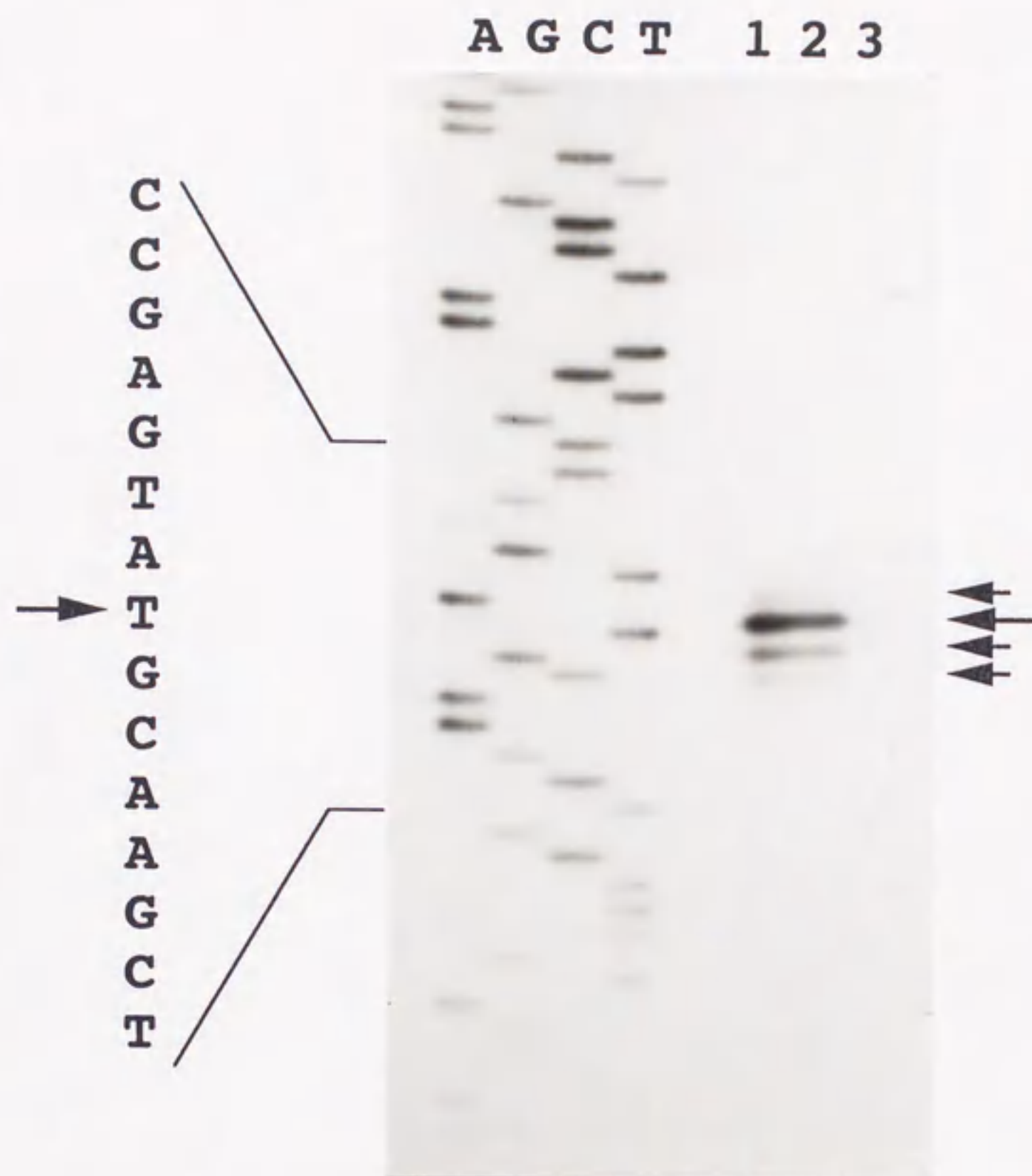


図 2-3. *nirA* オペロンの転写開始点の決定。

レーン1から3に、S1ヌクレアーゼ消化から保護されたDNA断片を泳動し、A, G, C, Tはそれぞれの塩基のシーケンス反応を泳動した。レーン1, 2, 3はそれぞれ、10, 5, 1  $\mu\text{g}$  のRNAを用いて行った。オートラジオグラムの左側に対応する塩基配列を示し、転写開始点を矢印で示した。



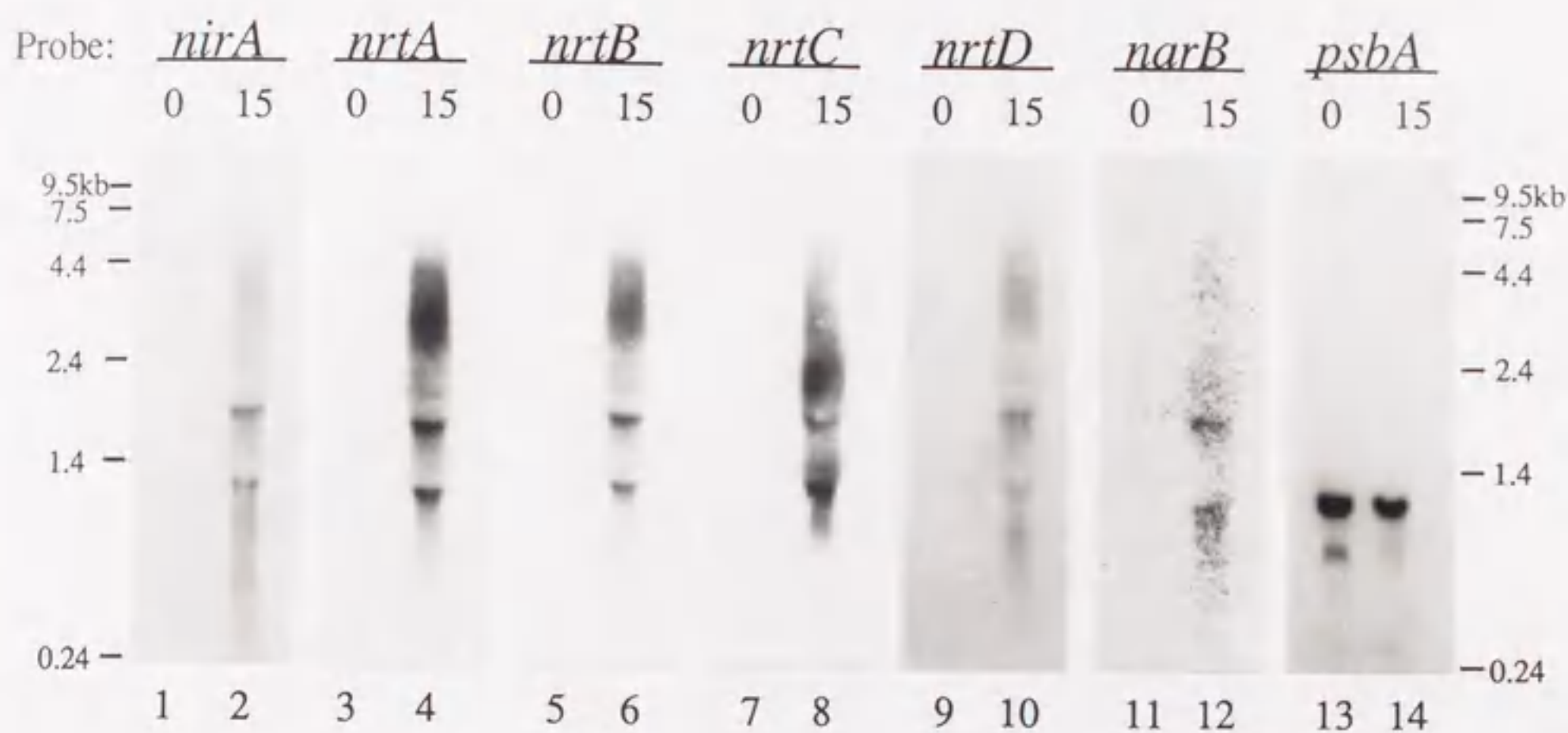


図 2-4. *Synechococcus* sp. PCC7942 の RNA を用いたノーザン解析。

アンモニアを窒素源として生育した細胞を、硝酸培地へ転換した。転換前（レーン 0）と転換後 15 分後（レーン 15）の細胞から抽出した RNA を各レーン 10  $\mu$ g 用いた。RNA は変性後、電気泳動によって分画し、正電荷を帯びたナイロン膜に転写した。プロットは、図の上方に示した遺伝子の特異プローブとハイブリダイズした。narB の DNA 断片は rRNA と非特異的にハイブリダイズしたので、narB の転写産物の解析にのみ、18 ヌクレオチドの narB 特異的オリゴヌクレオチドをプローブとした。narB の転写産物はバイオイメージアナライザーで検出し、他はオートラジオグラフィーにより検出した。



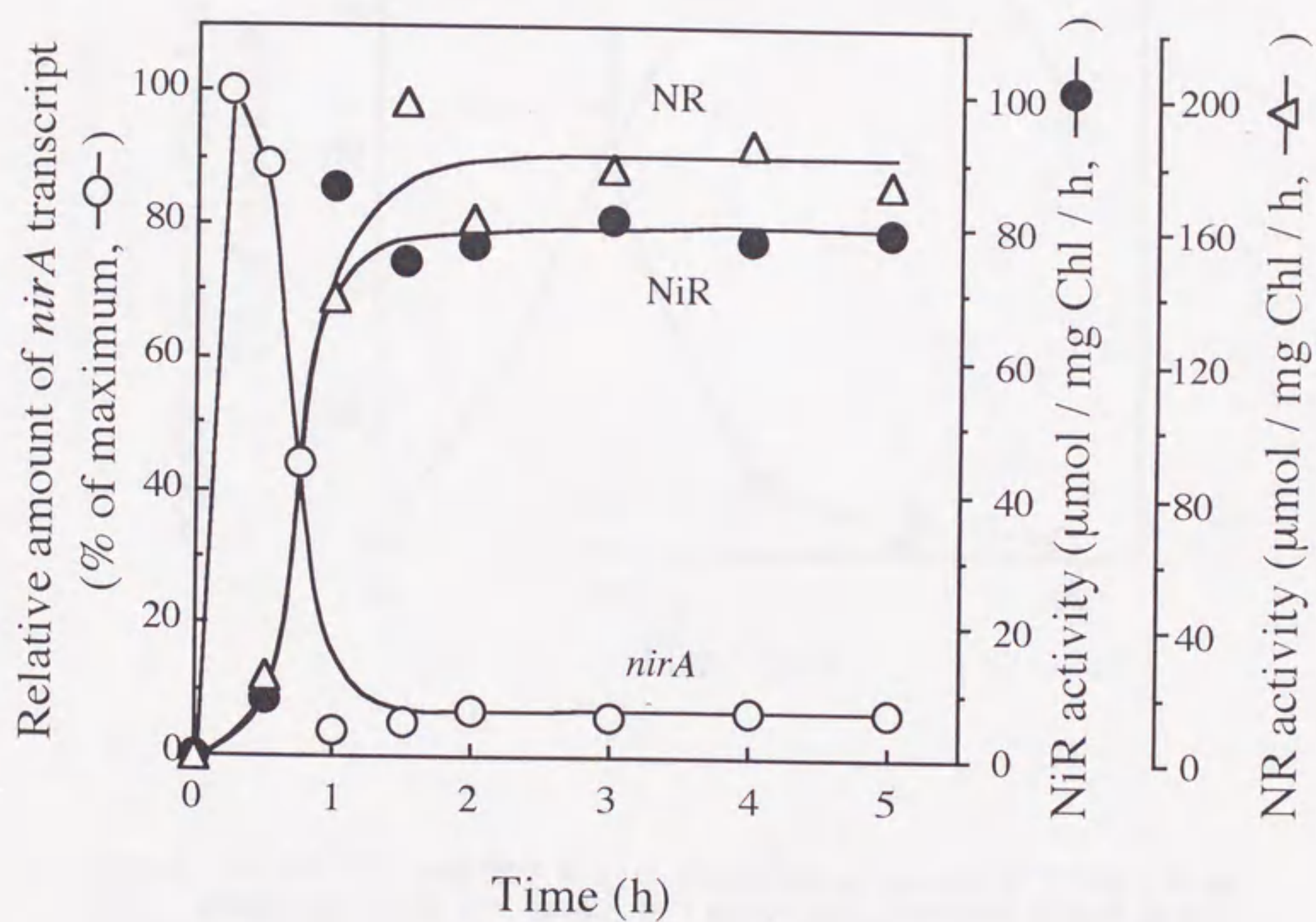


図 2-5. アンモニア培地で生育させた *Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞を硝酸培地へ移したときの、*nirA* オペロンの転写産物の蓄積 (白丸) と、NR (白三角)、NiR (黒丸) 活性の発現。



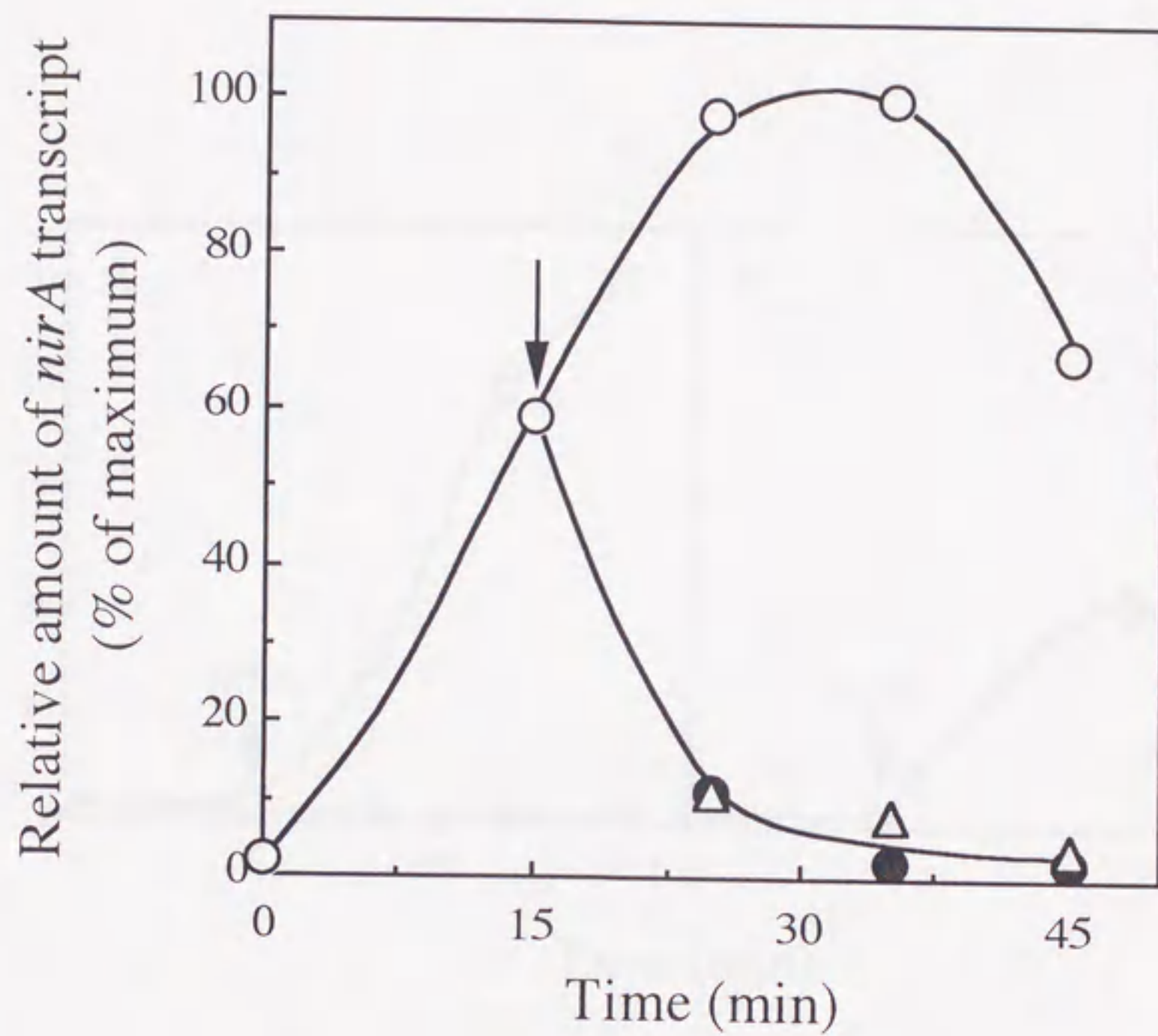


図 2-6. アンモニア培地で生育した *Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞を、硝酸培地へ転換して誘導した (*nirA*) 遺伝子の転写産物の蓄積に及ぼす、リファンピシンとアンモニアの効果。

矢印で示した時間に、50  $\mu\text{g/mL}$  のリファンピシン、7.5 mM のアンモニアを添加した。白丸、黒丸、白三角はそれぞれ、コントロール (無添加)、リファンピシン、アンモニアを示している。



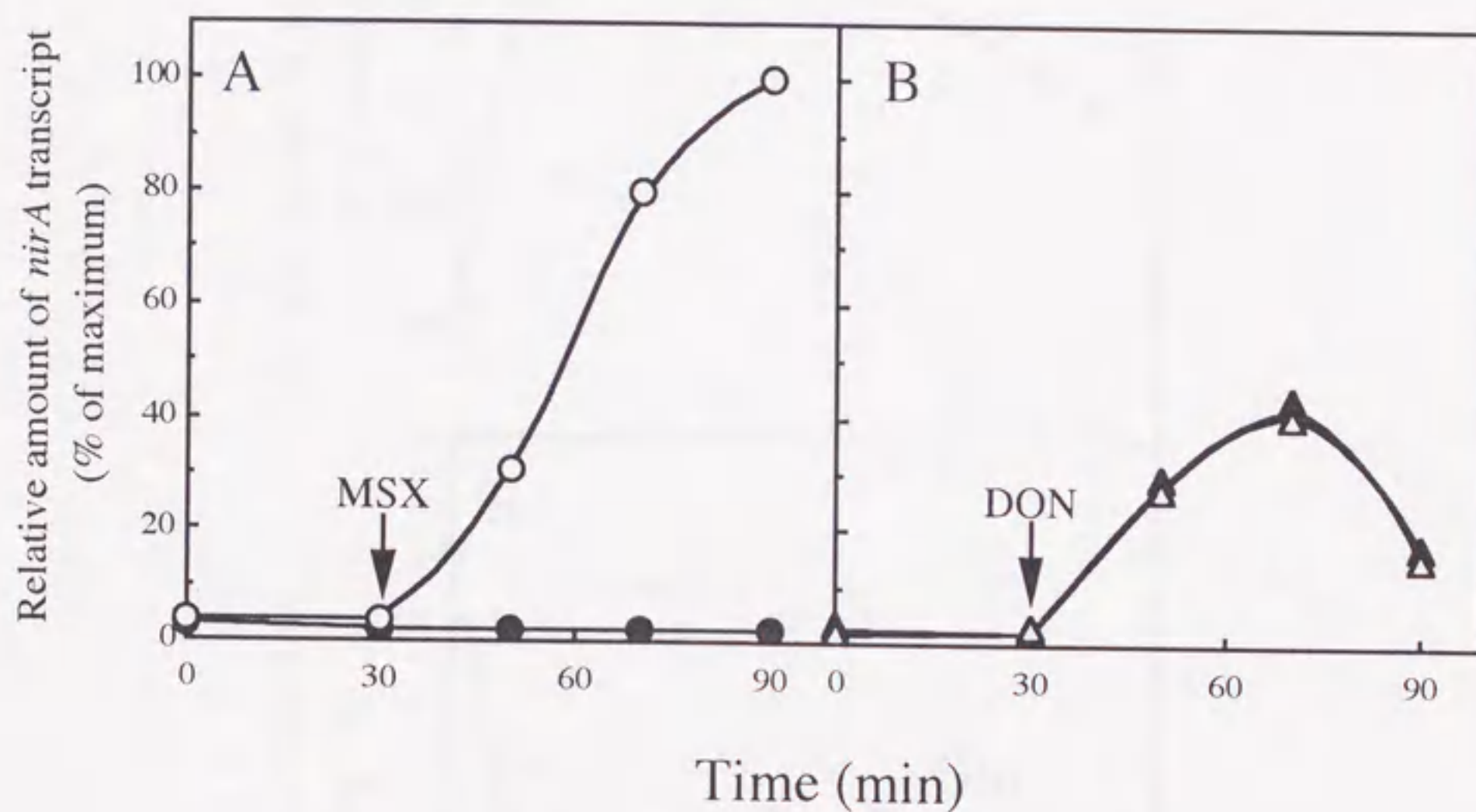


図 2-7. MSX または DON による *nirA* オペロンの転写の誘導。

A. アンモニア培地で生育している細胞に MSX を添加したときの *nirA* オペロンの転写産物の蓄積とグルタミンによる抑制。0 時間に 10 mM のグルタミンを添加したもの (黒丸)、しなかったもの (白丸) に、矢印で示した時間 (30 分後) に 10  $\mu$ M の MSX を添加した。B. DON の添加による *nirA* オペロンの転写産物の蓄積。0 時間に 10 mM のグルタミンを添加したもの (黒三角)、しなかったもの (白三角) に、矢印で示した時間 (30 分後) に 10  $\mu$ M の DON を添加した。A と B の実験に用いた細胞は、同じ培養液から分配したものである。



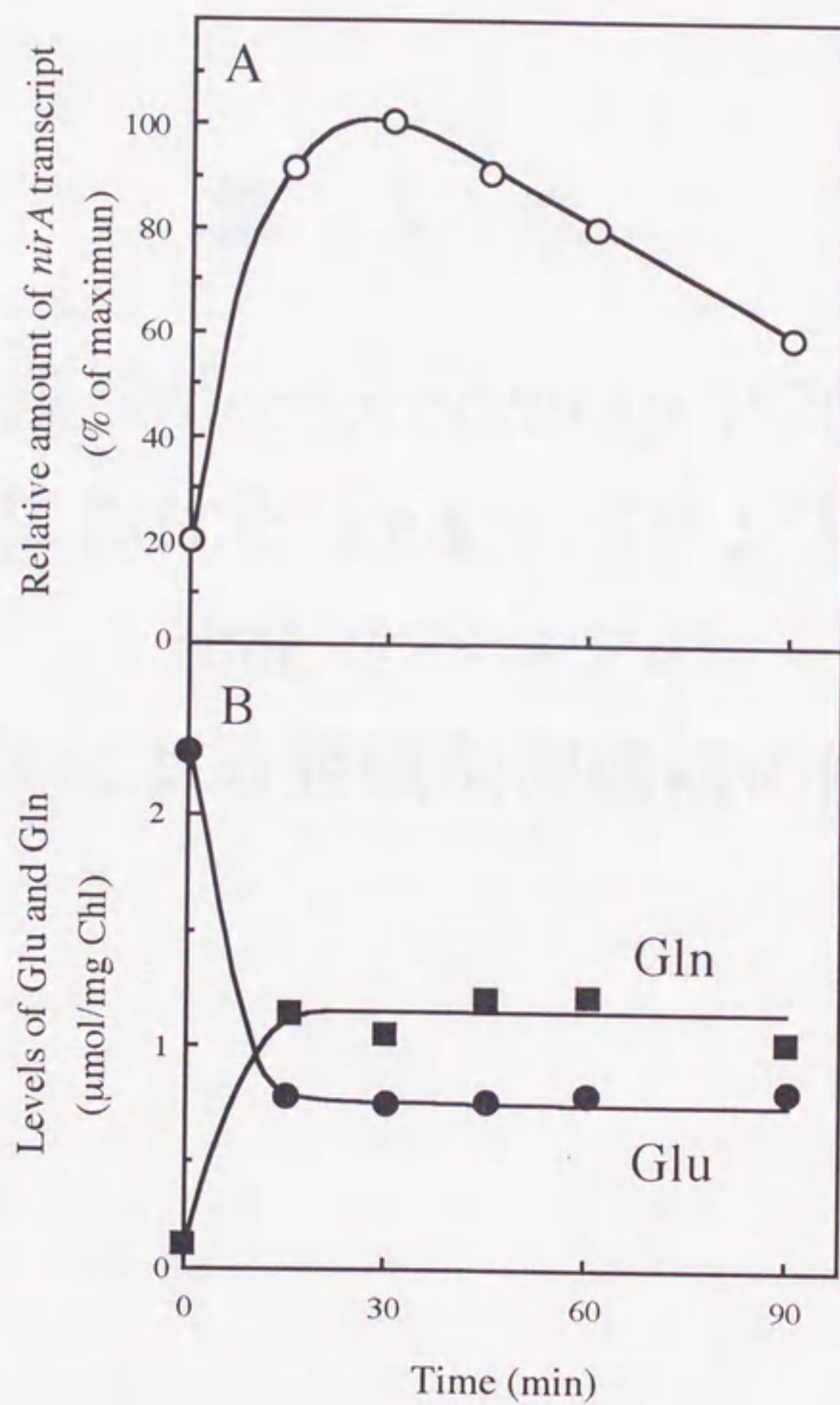


図 2-8. 硝酸培地で生育する細胞に、DON を添加したときの *nirA* 転写産物量の変化 (A) とグルタミンとグルタミン酸量の変動 (B)。

0 時間に最終濃度 150  $\mu\text{M}$  となるように DON を添加した。



### 第 3 章

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942  
における *nirA* オペロンと  
*rbcL* オペロンの  
窒素による発現制御機構の解析



### 3-1. 序論

前章で明らかにしたように、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 において、硝酸の取り込みと還元に関わる遺伝子群は、オペロン (*nirA* オペロン) を構成している。その転写は、培地中から細胞内に取り込まれたアンモニアまたは、細胞内で硝酸の還元によって生じたアンモニアによって、抑制されている (図 2-5, 2-6)。グルタミン合成酵素 GS の阻害剤である MSX で細胞を処理すると、*nirA* オペロンの転写が活性化されることから (図 2-7)、アンモニア自身が窒素充足のシグナルとしてオペロンの転写を抑制するのではなく、アンモニアの Gln への固定が抑制的な効果を示すために必要である。しかし、一群のグルタミンアミド基転移酵素の阻害剤である DON を添加すると、細胞内の Gln レベルが上昇するにも関わらず *nirA* オペロンの転写は活性化される (図 2-8)。したがって、Gln もこのオペロンの転写の抑制を引き起こすシグナルではなく、Gln からのアミド基転移により合成される化合物のいずれか、または、その代謝産物の蓄積が、*nirA* オペロンの発現を制御する代謝シグナルであろうと推論された (第 2 章)。

一方、Vega-Palas らは硝酸同化能を欠く *Synechococcus* sp. PCC7942 の中から、NR、NiR 活性、NrtA タンパク質の発現、GS、アンモニア取り込み活性を全て欠く多面欠損変異株 (pleiotropic mutant) を選別し (Vega-Palas et al., 1990)、この株の硝酸同化能を相補する遺伝子として *ntcA* をクローン化した (Vega-Palas et al., 1992)。*ntcA* は、Crp 型の転写因子と相同なタンパク質をコードしており、*nirA* オペロンだけでなく、アンモニアで抑制される他の遺伝子、例えば *glnA*、*ntcA* 自身 (Luque et al., 1994)、の転写の活性化にも必要である。in vitro での DNA 結合実験から、NtcA は上述の遺伝子群の上流に結合することが明らかにされており、これらの遺伝子の転写を活性化する因子であることはほぼ間違いない。しかしながら、細胞の窒素欠乏/充足のシグナルを受けて NtcA 自身が活性化/不活性化されるのか、あるいは、NtcA は正の転写因子としてのみ機能し、細胞の窒素が充足したときには、そのシグナルを受けて転写を抑制する機構が別に存在しているのかは明らかではない。

上記のことを総合して考えると、窒素による *nirA* オペロンの制御機構の究明のためには、*nirA* オペロンの制御に関わるシス領域の決定とトランス因子(群)の解析、および、*nirA* オペロンの転写抑制を引き起こす代謝産物の同定がなされねばならず、さらにシグナル物質からシス-トランス因子への情報伝達機構を明ら



かにする必要がある。著者らはまず、シグナル物質の同定を中心に研究を進めることにした。その理由は、既に多くのシス-トランス因子について研究されているが、そのシステムは本質的に類似し新奇性が乏しいと思われたからである。加えて、高等植物の炭酸同化系あるいは窒素同化系遺伝子の制御にも、Gln あるいはその代謝産物による制御系の存在が示唆されつつあり (Sugiharto et al., 1992a, 1992b, Deng et al., 1991)、ラン藻で得られた知見が高等植物での制御機構の解析に有益な情報を与える可能性が考えられたからである。また、転写制御機構に関わるシグナルの実体が、明らかにされている例は多くない。光や温度、浸透圧など物理的な外的環境の検知機構と異なり、細胞の窒素栄養状態の検知機構は化学物質である Gln の代謝産物を検知する機構で、そのシグナルの実体を探索することが容易なシステムであると考えられる。

*nirA* オペロンを抑制する代謝シグナルを同定する最も単純な方法は、細胞に Gln の代謝物を投与し、*nirA* オペロンの転写を抑制する化合物を見つけだすことであると思われる。*nirA* オペロンの転写活性は、アンモニアで生育した細胞を硝酸培地へ移すと一時的に高まるが、硝酸が還元されて細胞内でアンモニアが生成されるようになると、たちまち低いレベルに押さえられてしまう。第2章に示した実験では、アンモニアを加えることによって、アンモニアの持つ転写抑制効果を示すことができた (図 2-6)。しかしこれは、アンモニアが細胞に取り込まれ易く、その効果が迅速に現れるため可能であったと思われる。それに対して、アンモニア培地から硝酸培地への転換直後に Gln を添加すると、無添加の場合に比べて *nirA* オペロンの転写産物の蓄積量を減少させはしたが、アンモニアのように転写産物の蓄積を完全に消去させることはできなかった (data not shown)。これは Gln が細胞に取り込まれにくいためであると思われた。Gln の代謝産物の中には細胞膜を容易に透過し難いものも多く、これらの化合物は、硝酸培地への転換後 *nirA* オペロンの転写活性が十分高いうちに効果を示すことは困難であろうと思われる。一方、硝酸を窒素源として定常的に生育する細胞における *nirA* オペロンの転写産物量はきわめて低く (図 2-5)、加えた化合物の転写に及ぼす抑制効果を転写産物の減少としてとらえることは、技術的に困難であることが予想される。

そこで、筆者はこれらの困難を回避し、細胞外に添加した物質の *nirA* オペロンの転写の抑制効果を感度よく検出するために、*Synechococcus* sp. PCC7942 の変異株 M45 を用いることにした。この株は硝酸の能動輸送能は欠損しているけれども、硝酸の還元活性は野生株と同等またはそれ以上に発現している (Omata et



al., 1989)。この株は硝酸培地では定常的な窒素欠乏ストレス条件下に置かれており、*nirA* オペロンの転写産物の蓄積を測定したところ、常に高いレベルに保っていると予測されたからである。さらに、いかなる化合物も非生理的な高濃度で投与すれば、非特異的に転写が阻害され、*nirA* オペロンの転写産物が減少する可能性が考えられる。このとき、その物質が抑制的效果を持つと誤認される。そこで、窒素充足条件下で転写が抑制されない遺伝子を、対照として比較することが必要である。トウモロコシにおいて、窒素充足条件下で炭酸固定系遺伝子の転写が活性化されることから(第1章)、筆者は、炭酸固定酵素 Rubisco の大小二つのサブユニットをコードする *rbcL* オペロン (Shinozaki and Sugiura, 1985) を対照実験に用いた。本章では、M45 を用いて窒素化合物の *nirA* オペロンの転写におよぼす抑制効果を検討するシステムを構築し、様々な Gln の代謝産物の効果を検討した。

## 3-2. 結果

### 3-2-1 M45 における *nirA* と *rbcL* の転写産物の蓄積

変異株 M45 は、*nirA* オペロンの第二遺伝子 *nrtA* (硝酸・亜硝酸結合タンパク質、Omata et al., 1989, Omata, 1991, Maeda et al., unpublished results) に *kan<sup>r</sup>* の挿入があり、NrtA を欠損するとともに NR の構造遺伝子である *narB* が構成的に発現している(図 3-1 A)。この株では硝酸の能動輸送能が欠損しており、細胞内に浸透してきた硝酸しか利用できない (Omata et al., 1989)。培地中の硝酸イオン濃度と M45 の硝酸イオン取り込み速度との間には比例関係があるが、硝酸の細胞内への取り込み速度はたとえ 70 mM もの硝酸イオンを与えても、能動輸送による取り込み速度よりも遅い (Omata et al., 1989)。したがって、細胞は硝酸のみを窒素源とする培養では、慢性的な窒素欠乏ストレス下に置かれることになる。この性質を利用して、M45 の細胞を異なる硝酸イオン濃度の培地で生育し、様々な程度の窒素欠乏ストレス下に細胞を曝し、*nirA* と *rbcL* の転写産物の蓄積量を測定した(図 3-1 B)。硝酸濃度 7.5 mM の培地では窒素欠乏のため色素タンパク質が減少して、培養液は黄色を呈した。このとき、*nirA* 転写産物は多量に蓄積していた。培地中の硝酸イオンの増加につれて、色素タンパク質の蓄積が増加し細胞の分裂も促進され (Omata et al., 1989)、*nirA* 転写産物量は減少した。60 mM 硝酸濃度の培地では、M45 の細胞は窒素充足条件下のラン藻の細胞に特徴的な青緑色を



呈したが、増殖速度はいぜんとして野生株の通常の BG-11 の硝酸濃度である 17.5 mM における分裂速度よりも遅く、*nirA* 転写産物の蓄積量は、野生株のおよそ 3 倍高かった。アンモニア培地で生育すると、細胞の窒素栄養は充足され、野生株で解析されているとおり (第 2 章)、*nirA* 転写産物の蓄積は最も低く検出限界に近かった。これらの結果から、M45 の定常状態における *nirA* 転写産物の蓄積量は、細胞の窒素源の利用効率と逆の相関が見られることが明らかになった。

*rbcL* 転写産物の蓄積は、*nirA* 転写産物の蓄積とは反対に窒素の利用効率と正の相関が見られた。7.5 mM の硝酸イオン濃度で培養したときには、*rbcL* 蓄積量は最も少なかった。そして外液の硝酸イオン濃度の上昇にともなって上昇したが、硝酸イオン濃度 60 mM の培地でもまだ野生株よりは低く、アンモニア培地で生育すると蓄積量は最大に達した。

### 3-2-2 M45 における *nirA* の活性化

M45 をシグナル物質の検索のために用いるためには、*nirA* オペロンの制御が正常に起こるかをまず検討する必要がある。そこで、アンモニア培地で生育した *Synechococcus* sp. PCC7942 の野生株と M45 の細胞を、それぞれ 17.5 mM と 30 mM の硝酸培地へ転換し、*nirA* の転写産物量 (図 3-2 A) と NiR 活性 (図 3-2 B) の変化を測定した。野生株 (白丸) の結果は、基本的に以前の我々の報告と一致していた (第 2 章)。アンモニア培地で生育した細胞からは転写産物はほとんど検出されなかったが、硝酸培地へ転換後、速やかに蓄積し始め 45 分後に最大に達し、NiR 活性が上昇してくると次第に減少した (図 3-2 B)。M45 においても、野生株の場合と同様速やかな転写産物の蓄積が観察され、その蓄積の最大値は野生株と同じレベルであった。この結果は、M45 では *kan<sup>r</sup>* が *nrtA* に挿入されて、オペロンの構造が破壊されてはいるが、オペロンの第一遺伝子である *nirA* は野生株と全く同様に制御され、アンモニア培地から硝酸培地へ転換すると、転写の抑制が解除されて転写産物が蓄積した。したがって、このオペロンの窒素による制御は正常であると考えられた。M45 の *nirA* 転写産物の蓄積は、図 3-1 に示した結果に対応して、培地の転換後 45 分以降は野生株よりも高く、NiR 活性も 3 時間後でおおよそ 70 % 野生株より高い値を示した。

### 3-2-3 *nirA* と *rbcL* の転写産物に及ぼすアンモニアおよび Gln の効果

30 mM の硝酸イオンを含む培地で生育した M45 の細胞を使って、培地中に



添加する化合物が *nirA* の転写産物の蓄積に及ぼす効果を、解析することにした (図 3-3)。 *nirA* オペロンの転写産物の蓄積は、より低い硝酸濃度で生育させた方が高いが、20 mM 以下の硝酸濃度では M45 の増殖はきわめて制限されるので (Omata et al., 1989)、30 mM の硝酸濃度で実験を行うことにした。30 mM の硝酸濃度で生育している M45 の培養液にアンモニアを添加すると、*nirA* オペロンの転写産物は急速に減少したことから、M45 における *nirA* の転写は野生株で報告されているように (第 2 章)、アンモニアによって抑制されることが示された (図 3-3 A)。一方、培地へのアンモニアの添加によって、*rbcL* の転写産物は蓄積した。M45 の培養液に転写阻害剤であるリファンピシンを添加した場合は (図 3-3 C)、*rbcL* 転写産物量の減少は遅く、この転写産物の分解は *in vivo* において比較的遅いと考えられた。したがって *rbcL* の転写産物の速やかな蓄積は (図 3-3 A)、分解速度が減少したためではなく、アンモニアの添加によって遺伝子の転写が活性化されたことによるものと考えられた。

M45 の培養液に、グルタミンを 15 mM の濃度で添加したときの影響を図 3-3 B に示した。グルタミンの添加の場合はアンモニアの場合に比べて変化の程度は小さかったが、やはり *nirA* 転写産物の減少と *rbcL* 転写産物の蓄積が見られた。量オペロンの転写産物は、Gln に対しても当初予想していたとおりの反応を示した。 *Synechococcus* は、Gln を窒素源として生育することができないので、Gln の輸送能が低いと思われる。転写に及ぼす Gln の影響がアンモニアに比べて小さいことは、ラン藻の細胞膜に対する Gln の透過性が低いことに起因すると考えられた。この実験系は、細胞への取り込み速度が小さい化合物においても、*nirA* オペロンの抑制におよぼす効果の検知が、ある程度は可能であることが予想された。

#### 3-2-4 Gln の代謝産物の *nirA* と *rbcL* の転写に及ぼす影響

Gln からのアミド基の転移により合成される化合物は多いが、代謝の上位に位置するものについてまず検討した。そこで、まずグルタミン酸 (Glu) とアスパラギン (Asn) の効果を検討した。これらは、Gln から的一段階のアミド基転移反応によって生合成され、Gln のアミド基の転移経路として量的に最も多いと予想されるものである。それぞれの化合物を、それぞれ 15 mM となるように培地に添加して、転写産物の蓄積に対する影響を調べた (図 3-4 A, B)。その結果、これらの化合物の添加は、*nirA* と *rbcL* の転写産物の蓄積に影響を与えなかった。これらの結果は、Glu と Asn が両オペロンの転写に及ぼす影響が、きわめて小さいこ



とを示している。その他の Gln からのアミノ基転移によって合成される化合物のうち、葉酸の合成に必要な *p*-アミノ安息香酸 (PABA)、トリプトファン合成の前駆体のアントラニル酸 (Ant)、糖タンパク質に含まれる *N*-アセチルグルコサミンの前駆体であるグルコサミン-6-リン酸 (Gluc6p) をそれぞれ 10 mM の濃度で与え、*norA* オペロンの転写産物量におよぼす影響を調べた (図 3-4 C, D, E)。芳香族化合物である PABA と Ant を添加した場合には、アンモニアの添加の場合と同じく *nirA* 転写産物は減少したが、*rbcL* の転写産物の蓄積は見られず、リファンピシンを添加したときと同様に徐々に減少していた。これらの結果から、上記の芳香族化合物の添加は、細胞の転写を阻害すると判断された (図 3-4 C, D)。Gluc6P の添加は *nirA*、*rbcL* どちらの転写産物の蓄積量も徐々に減少させ (図 3-4 E)、アンモニアの添加で見られた転写産物量の変化は起こらなかった。この結果から、Gluc6p も *nirA* オペロンの転写を抑制する代謝シグナルではないことが示された。これらの化合物はいずれもより低い濃度 (1 mM) では、どちらの遺伝子の転写産物の蓄積にもほとんど影響を与えなかった (data not shown)。それらに対し、カルバミルリン酸 (CP) は 1 mM の濃度で、アンモニアの添加と同様の、*nirA* 転写産物の減少と *rbcL* 転写産物の蓄積を誘導した (図 3-4 F)。この結果から、CP またはその下流の代謝産物が、*nirA* オペロンの発現を制御する可能性が考えられた。

### 3-2-5 CP の代謝産物の *nirA* と *rbcL* の転写に及ぼす影響

CP はアルギニンとピリミジンの生合成の中間体である。アルギニン合成経路では、CP はオルニチンと反応してシトルリン (Cit) を生じ、ピリミジン合成経路では、アスパラギン酸と反応してカルバミルアスパラギン酸 (CarAsp) を生じる。そこで、それらの化合物の、*nirA/rbcL* 転写産物の蓄積量におよぼす影響を検討した。10 mM の CarAsp は、PABA あるいは Ant の添加と同様の *nirA* の転写産物も *rbcL* の転写産物も減少させ (図 3-5 A)、細胞の転写活性に非特異的に影響を与えていると思われた。また 10 mM の Cit の添加は、いずれの遺伝子の転写産物の蓄積にも影響しなかった (図 3-5 B)。これらの結果から、CP の下流に位置する代謝産物は、*nirA* オペロンの転写を制御する物質ではないことが示唆された。CP はアルカリ性条件ではシアン酸に分解する (Allen and Jones, 1964)。そこで、M45 の培養液にシアン酸を添加した時の、*nirA* と *rbcL* の転写産物量に及ぼす影響を調べた (図 3-5 C)。1 mM のシアン酸の添加は、アンモニアや CP の添加と同様に、



*nirA* 転写産物の速やかな減少と *rbcL* 転写産物の蓄積を誘導した。この結果から、CP が分解されて生じたシアン酸が、転写産物のレベルを制御する可能性が示唆された。

### 3-2-6 シアン酸の効果に及ぼす MSX の影響

CP の代謝産物の Cit、CarAsp と分解物の一つであるシアン酸については、*nirA* と *rbcL* の転写産物に対する効果を検討した。しかしながら、CP は不安定な化合物で、酸性条件下では主にアンモニアと  $\text{CO}_2$  と正リン酸に分解し、アルカリ条件ではシアン酸と正リン酸に分解する (Allen and Jones, 1964)。また、CP はフォスファターゼによっても分解されてアンモニアを生じ (Suzuki et al., unpublished results)、*Synechococcus* の細胞は、ペリプラズムに CP の分解に十分なフォスファターゼ活性を発現していることが報告されている (Ray et al., 1991)。一方、シアン酸はシアナーゼ (シアン酸加水分解酵素; EC 3.5.5.3, Anderson, 1980, Anderson and Little, 1986) により、アンモニアと  $\text{CO}_2$  に分解される。最近、ラン藻 *Synechococcus* sp. UTEX625 の細胞質にこの酵素活性が見出された (Miller and Espie, 1994)。したがって、M45 の培養液に CP あるいはシアン酸を添加したときの、*nirA* および *rbcL* の転写産物の蓄積量に及ぼす影響が、それらの化合物が細胞外または細胞内で分解されて生じたアンモニアが、再固定されたためではないことを確認する必要がある。そこで、それら化合物と同時にアンモニア固定の阻害剤である MSX を添加して、転写産物量に及ぼす影響をノーザン解析により調べた (図 3-6, 3-7, 3-8)。30 mM の硝酸を窒素源として生育する M45 の培養液に、10  $\mu\text{M}$  の MSX を添加すると (図 3-6 レーン 2)、前章に記述したように (第 2 章)、MSX 無添加の細胞に比べて (図 3-6 レーン 1)、*nirA* の転写産物が著しく誘導された (図 3-6 レーン 2)。それに対し、アンモニア (図 3-6 レーン 3) の添加は図 3-3 A に示したのと同様転写産物を消失させたが、アンモニアと同時に添加した MSX (図 3-6 レーン 4) はアンモニアの効果を抑制し、転写産物の消失を阻害した。この結果は、培地中に添加したアンモニアは代謝されて、*nirA* オペロンの転写を阻害したことを示している。CP の添加も、アンモニアの添加と同様に *nirA* 転写産物を減少し (図 3-6 レーン 5)、MSX によってその減少は阻害された (図 3-6 レーン 6)。この結果から、CP の *nirA* オペロンに及ぼす効果は、分解されて生じたアンモニアの効果であることが示唆された。しかしながら、細胞による CP の分解



活性はこの時間内に添加した CP 全てを分解するほど高くなく (Suzuki et al., unpublished results)、このときの培養液中には CP とアンモニアとシアン酸が含まれていると推定できる。あらかじめ CP で処理した細胞に MSX を添加した別の実験においては、MSX の添加による *nirA* の転写の活性化を部分的に阻害することができた (Suzuki et al., unpublished results)。これらのことから、CP の効果の大部分は、その分解物であるアンモニアの再固定によると考えられるが、現時点で CP 自身またはもう一つの分解物であるシアン酸の効果を否定することはできない。それに対し、シアン酸の単独あるいは MSX との同時添加では、*nirA* の転写を完全に打ち消した (図 3-6 レーン 7, 8)。シアン酸も *Synechococcus* の細胞によって分解を受けアンモニアを生じるが、シアン酸の *nirA* に対する抑制効果は、アンモニアの再固定産物の蓄積に由来するものではなく、シアン酸自身の作用によるものと考えられた。

同じ RNA サンプルを用いて、*rbcL* オペロンに対する窒素源と MSX の影響を調べた (図 3-7)。30 mM 硝酸を窒素源として生育した場合の *rbcL* の転写産物量に比べて (図 3-7 レーン 1)、培養液にアンモニア、CP、シアン酸をそれぞれ添加すると (図 3-7 レーン 3, 5, 7)、*rbcL* の転写産物が蓄積し、なかでもシアン酸の添加が最も顕著に *rbcL* の転写産物の蓄積を誘導した。硝酸で生育した M45 に MSX を添加すると、転写産物の減少を引き起こした (図 3-7 レーン 2)。アンモニアあるいは CP と MSX を同時に添加した場合も、わずかではあるが転写産物は減少した (図 3-7; レーン 4, 6)。一方、シアン酸と MSX の添加では、*rbcL* 転写産物の減少はほとんど見られなかった (図 3-7 レーン 8)。これらの結果から、*rbcL* オペロンの転写の調節にもシアン酸が作用し、その分解物であるアンモニアの再固定によるものではないことが示された。

このラン藻において窒素同化系遺伝子の発現は、Crp 型の転写因子 NtcA によって調節されている (Vega-Palas et al., 1992, Luque et al., 1994)。シアン酸による *nirA* オペロンの抑制と NtcA との関わりを解析するために、NtcA で制御される GS をコードする *glnA* の転写産物についてもシアン酸の影響を調べてみた (Luque et al., 1994)。その結果、*glnA* の転写産物の蓄積量の変化も、*nirA* と同様にアンモニア、CP、シアン酸により減少し、MSX の効果はシアン酸によってのみ打ち消された (図 3-8)。このことから、シアン酸が何らかの形で NtcA を介して窒素同化系遺伝子群の発現を制御する可能性が示された。



### 3-3. 考察

硝酸輸送活性を欠く変異株 M45 の *nirA* 遺伝子は、アンモニアにより野生株と同様の抑制を受けていた。この株を用い、*nirA* オペロンと *rbcL* オペロンの転写産物の蓄積量の変動を指標にして、*nirA* オペロンの転写を抑制する窒素化合物を検索するシステムを構築した。Gln の代謝産物についてその効果を解析し、CP の分解物であるシアン酸が、その効果を持つことを示した (図 3-5, 3-7)。CP は全ての生物に存在し、アルギニンとピリミジンの生合成の代謝中間体である。CP はカルバミルリン酸合成酵素によって、Gln のアミド基と炭酸水素イオンと ATP のリン酸によって合成される (Lawrie, 1979, Meeks et al., 1977)。この酵素は、アルギニンとピリミジンの生合成のキーエンザイムで、ピリミジン合成の中間体である UMP により負に、アルギニン合成の基質であるオルニチンによって正に、それぞれ制御されるアロステリック酵素である。したがって、細胞の CP の蓄積量はそれらの代謝産物により制御を受けていると考えられる。*Clostridium pasteurianum* (Seto and Mortenson, 1974) と *Anabaena cylindrica* (Lawrie, 1979) において、CP はニトロゲナーゼの活性とその発現を抑制していることが報告されている。*A. cylindrica* の細胞内の CP 濃度は、アンモニアを窒素源とした場合は 290  $\mu\text{M}$  であり、窒素固定により生育しているときはほとんど検出できない (Lawrie, 1979)。CP は溶液中において非常に不安定で、その pH によってアンモニアまたはシアン酸に分解する (Allen and Jones, 1964)。したがって、ニトロゲナーゼの生合成の調節のように数時間を要する変化においては、報告されている CP の効果が CP 自身によるものか、CP の分解物によるものかは明確に区別することは困難であった。ラン藻 *Synechococcus* の窒素利用系遺伝子 *nirA* オペロンと、炭酸固定系遺伝子 *rbcL* オペロンにおいては、CP の効果はアンモニアと同様に MSX によって打ち消されてしまうけれども、シアン酸の効果は MSX によって阻害されないことから、CP よりもむしろシアン酸が代謝シグナルであろうと考えられた。*Synechococcus* において、異なる窒素栄養条件下における細胞内の CP 濃度は測定されていないけれども、*A. cylindrica* と同様に窒素充足条件下では高く欠乏条件下では低いと考えられ、それにつれてシアン酸の蓄積量も変動していると考えられる。しかしながら、シアン酸が本当の代謝シグナル物質であるかどうかの検討には、シアン酸の細胞内濃度の測定が必要であると思われる。



シアン酸は生体内または生理的な環境下で、CP あるいは尿素の非酵素的な分解によって生成される (Allen and Jones, 1964, Hagel et al., 1971)。いくつかの腸内細菌で、シアン酸はシアナーゼを誘導し (Taussig, 1960, Guilloton and Hargreaves, 1972, Anderson, 1980)、その酵素によりアンモニアと  $\text{CO}_2$  に分解されることが知られている。腸内細菌以外の生物では、植物からもシアナーゼ活性が検出されていたが (Lotti, 1965, Lisanti, 1963)、その後、生化学的あるいは分子生物学的な手法を用いては研究されていない。最近 *Synechococcus* sp. PCC7942 に近縁のラン藻 *Synechococcus* sp. UTEX625 から、シアナーゼの活性が検出され (Miller and Espie, 1994)、シアン酸の有無に関わらず構成的に発現していることが示された。筆者も *Synechococcus* sp. PCC7942 において、シアン酸で誘導した腸内細菌での活性と比較して十分に高いシアン酸分解活性が発現していることを見出している (Suzuki et al., unpublished results)。このことはラン藻の細胞においても、シアン酸が生成するか、それに曝される局面があることを示唆している。シアン酸をシグナル物質と仮定すると、シアナーゼの活性が十分に高いことは、細胞がシグナルの消去系を備えていることになり、鋭敏な情報の伝達に適していると考えられる。またシアン酸は、タンパク質のアミノ基、メルカプト基、カルボキシル基、イミダゾール基、フェノール性水酸基と反応してカルバミル化する性質を有する (Stark, 1964, 1965)。このため、低濃度のシアン酸でカルバミル化される「シアン酸シグナル検出タンパク質」を通して、検知と伝達が行なわれる可能性がある。シアン酸によって特異的にラベルされるタンパク質の同定が、この仮説の検証につながると考えられる。

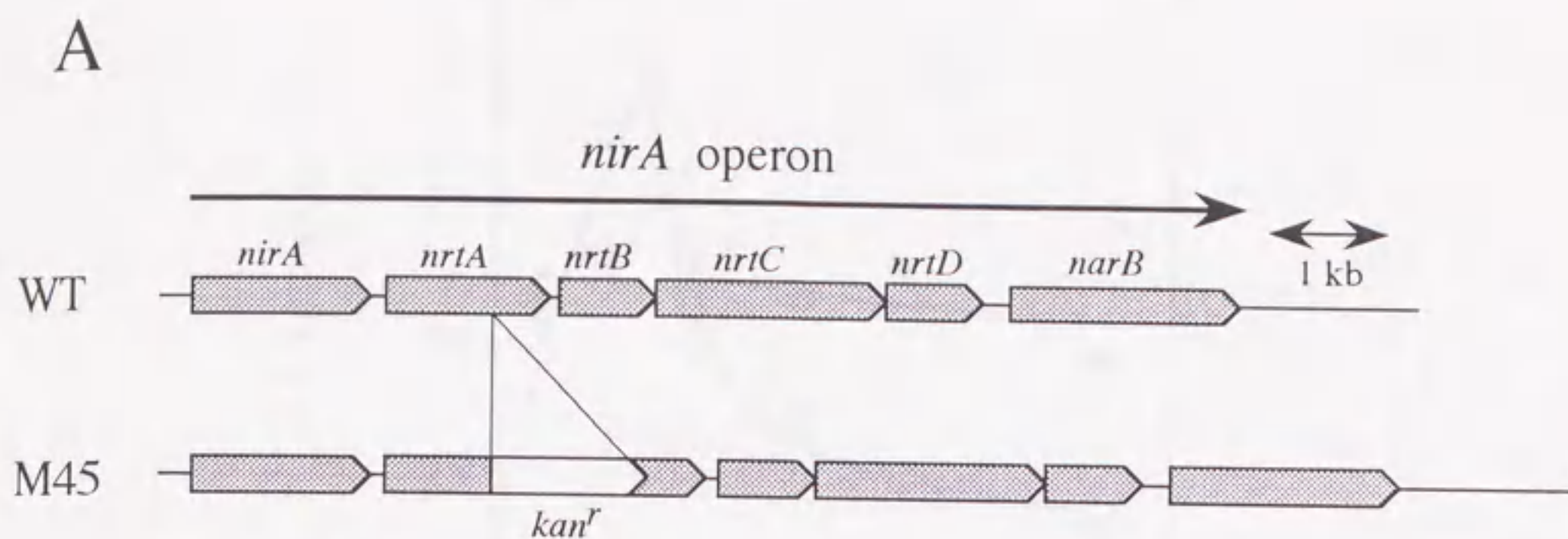
ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 において、窒素同化系遺伝子上流には NtcA の結合サイトがあり (Luque et al., 1994)、NtcA の結合によって転写が活性化されることが考えられている。NtcA に依存して転写調節される *nirA* と *glnA* の転写産物量がシアン酸で抑制されたことは、シアン酸のシグナルが NtcA を介して伝達していることを示唆する結果である。窒素固定能を有するラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120 がニトロゲナーゼを発現するためには、その酵素のひとつのサブユニットをコードする遺伝子 *nifD* のコード領域内に介在する DNA 配列が切り出されて再構成される必要がある。その介在配列の切り出しを触媒する酵素の発現に、NtcA が必須である (Brusca et al., 1990, Chastain et al., 1990)。以前に報告されている、*Anabaena cylindrica* のニトロゲナーゼの発現が、CP で抑制される現象 (Lawrie, 1979) も、CP から生じたシアン酸が NtcA を介して抑制的な効果を発揮



している可能性が高いと思われる。

NtcA は *Anabaena* sp. PCC7120 のヘテロシストにおいて、ニトロゲナーゼ遺伝子の発現を誘導するとともに、炭酸固定系の *rbcL* オペロンのプロモーター領域 (-12~+12転写開始点) への結合によってその転写を阻害する (Ramasubramanian et al., 1994)。 *Synechococcus* sp. PCC7942 においても、窒素源の変動に伴って *rbcL* 転写産物の変動したが、塩基配列を検索する限りではそのプロモーター領域の近傍に NtcA の結合サイトは見出されなかった (Friedberg et al., 1989)。このことから、 *Synechococcus* においては *rbcL* の制御は NtcA によって調節されていないと考えられ、シアン酸をシグナルとする転写調節経路には NtcA を介する経路の他にも存在していることが考えられた。 *rbcL* の発現制御に関する分子生化学的な解析が、シアン酸による遺伝子発現制御機構の解明には、必要であると考えられる。





B

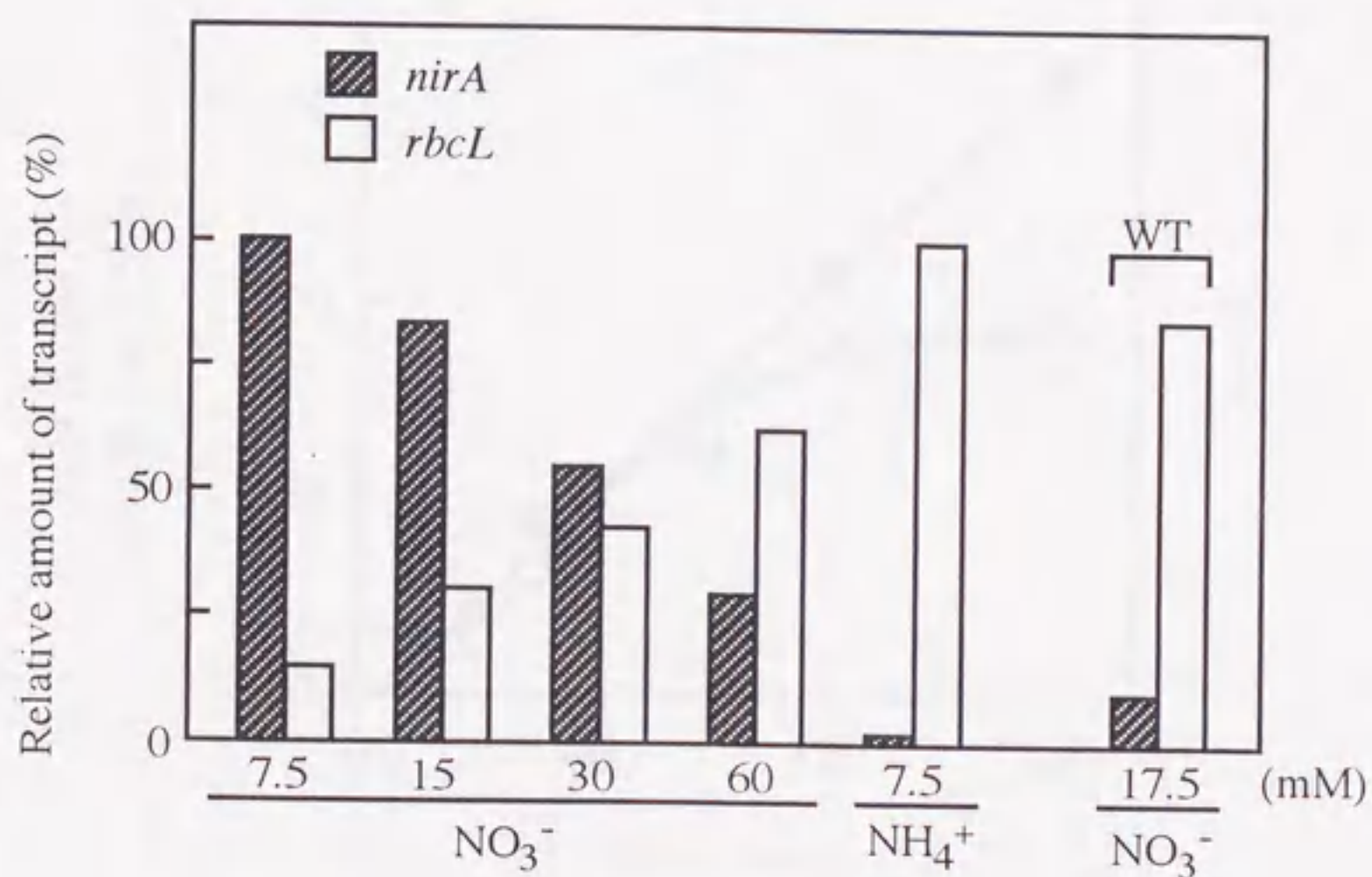


図 3-1. A. 野生株と *nrtA* 変異株 (M45) の *nirA* オペロンの物理地図。B. 異なる硝酸イオン濃度における M45 の *nirA* オペロンの転写産物の蓄積と *rbcL* オペロンの転写産物の蓄積。

60 mM の硝酸で生育した M45 の細胞を様々な硝酸濃度の培地へ転換し、12 時間後の細胞から RNA を抽出し、*nirA*、*rbcL* の特異プローブを用いてそれぞれの転写産物を測定した。



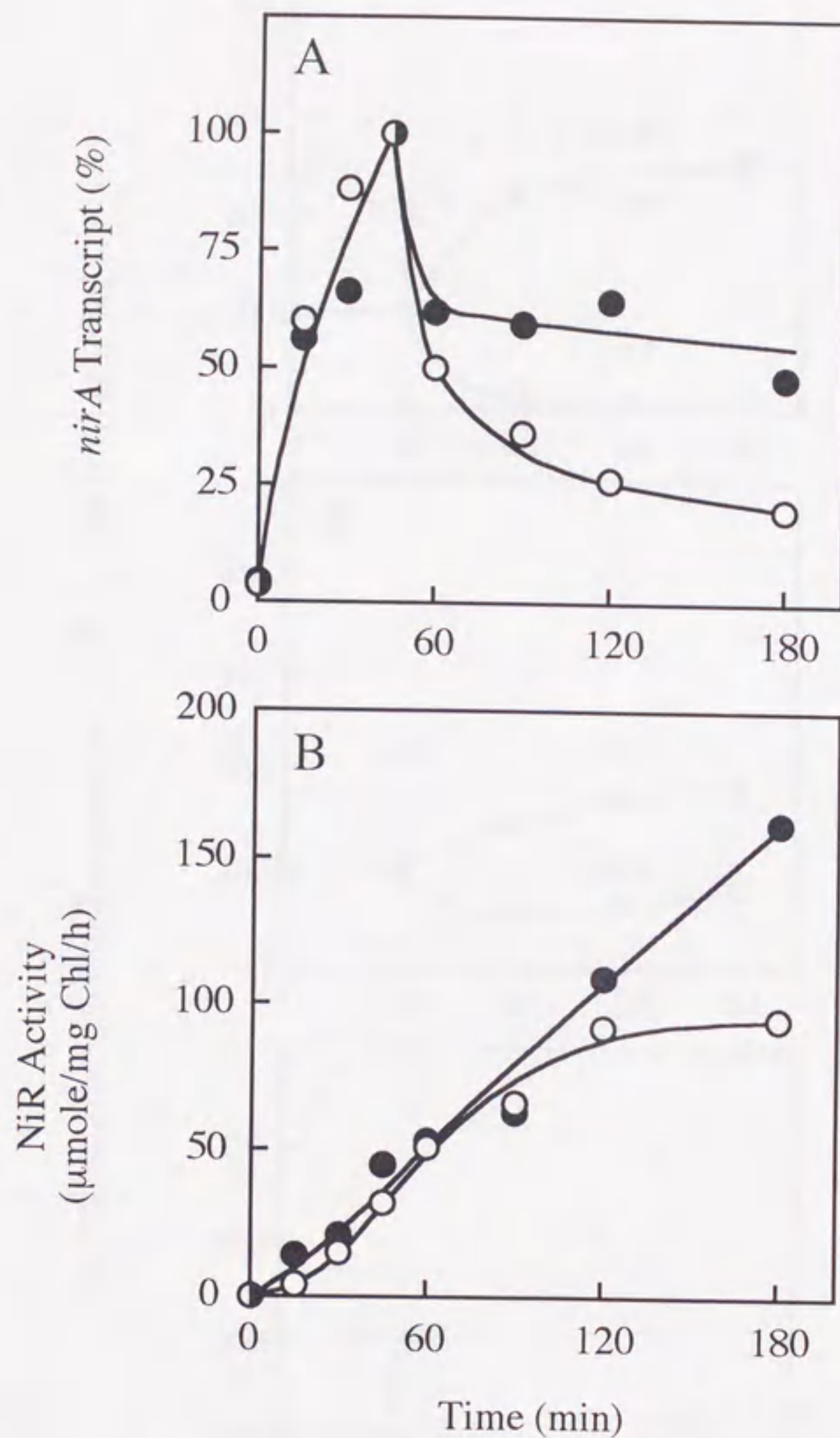


図 3-2. アンモニア培地で生育した野生株 (白丸) と M45 (黒丸) の細胞を硝酸を窒素源とする培地へ移したときの、*nirA* 転写産物の蓄積 (A) と亜硝酸還元酵素活性 (B) の誘導。

アンモニア培地で生育した野生株と M45 の細胞を洗浄後、それぞれ 17.5 mM と 30 mM の硝酸を含む培地へ転換した。以後、経時的に細胞を回収し *nirA* 転写産物量と NiR 活性を測定した。



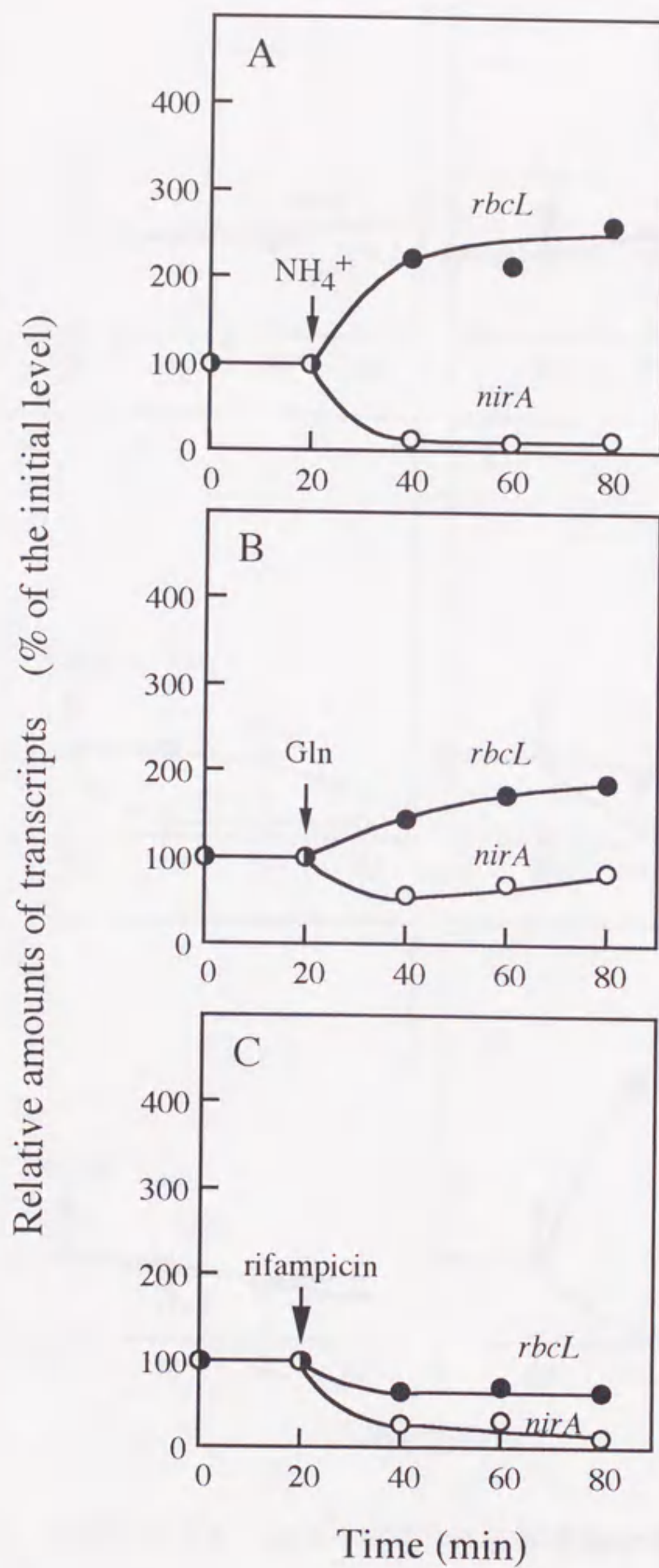


図 3-3. *nirA* (白丸)、*rbcL* (黒丸) の転写産物の蓄積量の変化。

30 mM の硝酸培地で生育した M45 に 7.5 mM のアンモニア (A)、15 mM グルタミン (B)、50  $\mu$ g/mL のリファンピシン (C) を矢印の時点で添加し、経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出し、ドットブロット法により転写産物量を測定した。



Relative amounts of transcripts (% of the initial level)

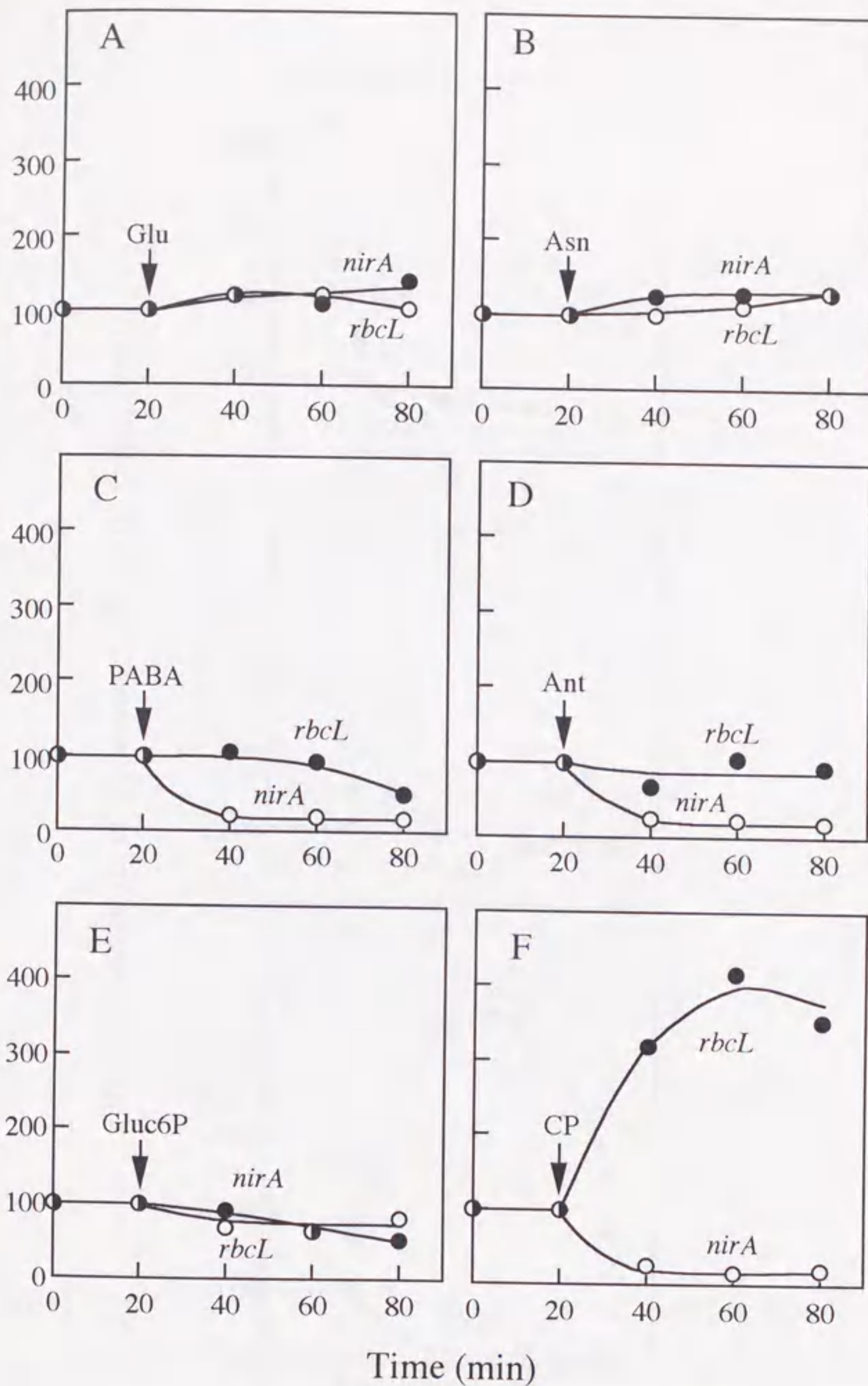


図 3-4. *nirA* (白丸)、*rbcL* (黒丸) の転写産物の蓄積量の変化。

30 mM の硝酸培地で生育した M45 に 15 mM のグルタミン酸 (A)、15 mM アスパラギン (B)、10 mM の *p*-アミノ安息香酸 (C)、10 mM のアントラニル酸 (D)、10 mM のグルコサミン6リン酸 (E)、1 mM カルバミルリン酸をそれぞれ矢印の時点で添加し、経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出し、ドットブロット法により転写産物量を測定した。



Relative amounts of transcripts (% of the initial level)

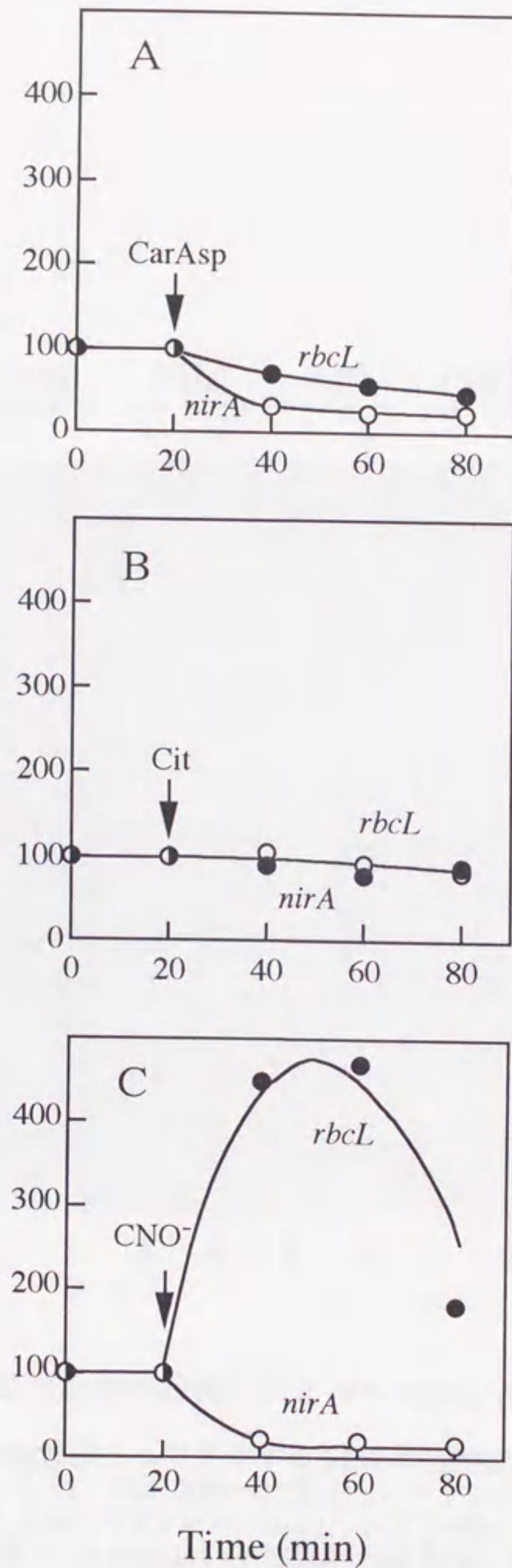


図 3-5. *nirA* (白丸)、*rbcL* (黒丸) の転写産物の蓄積量の変化。

30 mM の硝酸培地で生育した M45 に 10 mM のカルバミルアスパラギン酸 (A)、10 mM シトルリン (B)、1 mM のシアン酸 (C) を矢印の時点で添加し、経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出し、ドットブロット法により転写産物量を測定した。



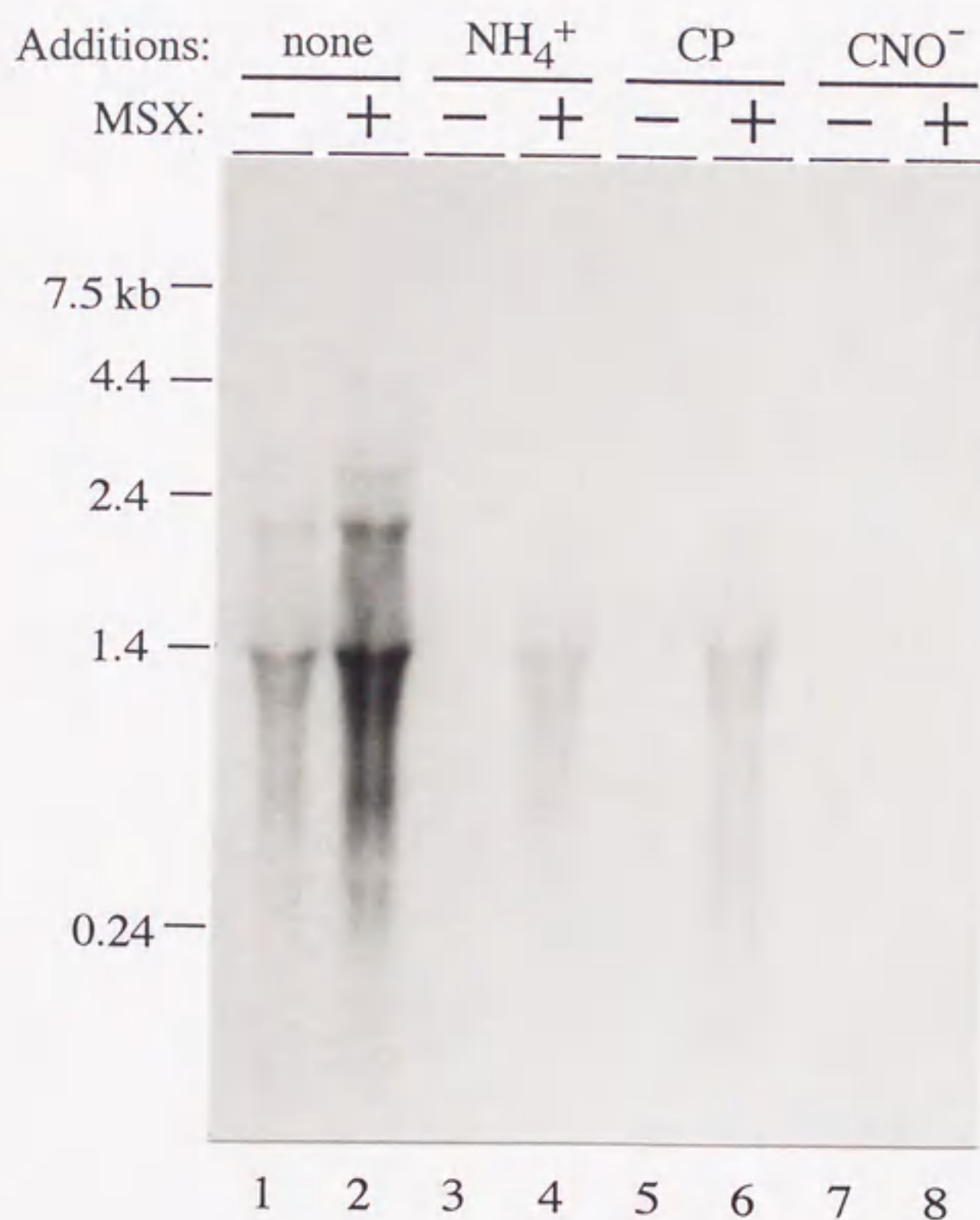


図 3-6. *nirA* 転写産物の蓄積におよぼす MSX と窒素源の影響。

30 mM の硝酸を窒素源として生育する M45 の細胞に、MSX を与えたもの (レーン 2, 4, 6, 8)、与えなかったもの (レーン 1, 3, 5, 7)、同時にアンモニア (レーン 3, 4)、CP (レーン 5, 6)、シアン酸 (レーン 7, 8) を与えたものを培養条件で 15 分間おいた細胞から全 RNA を抽出し、ノーザン解析を行った。



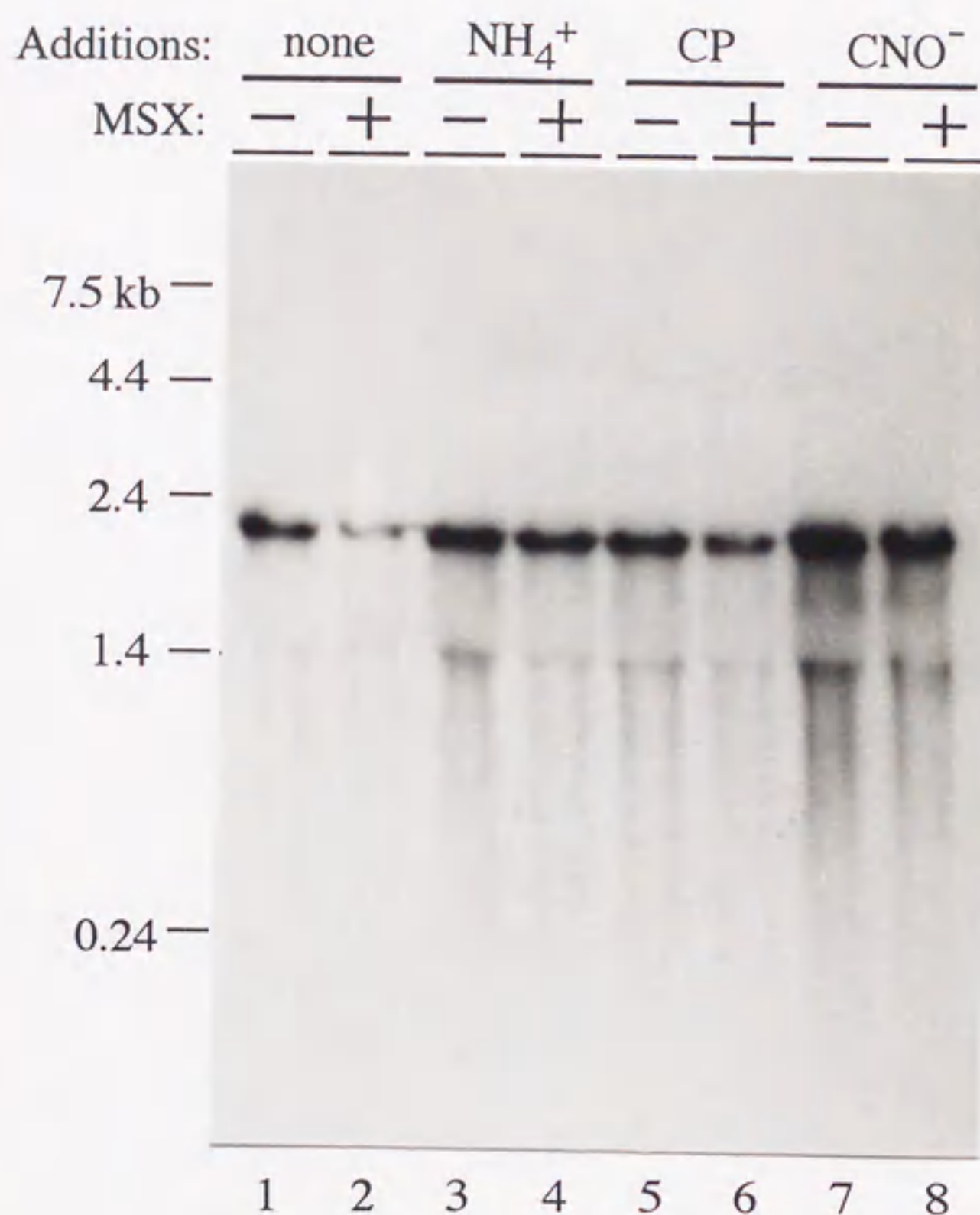


図 3-7. *rbcL* 転写産物の蓄積におよぼす MSX と窒素源の影響。

30 mM の硝酸を窒素源として生育する M45 の細胞に、MSX を与えたもの (レーン 2, 4, 6, 8)、与えなかったもの (レーン 1, 3, 5, 7)、同時にアンモニア (レーン 3, 4)、CP (レーン 5, 6)、シアン酸 (レーン 7, 8) を与えたものを培養条件で 15 分間おいた細胞から全 RNA を抽出し、ノーザン解析を行った。



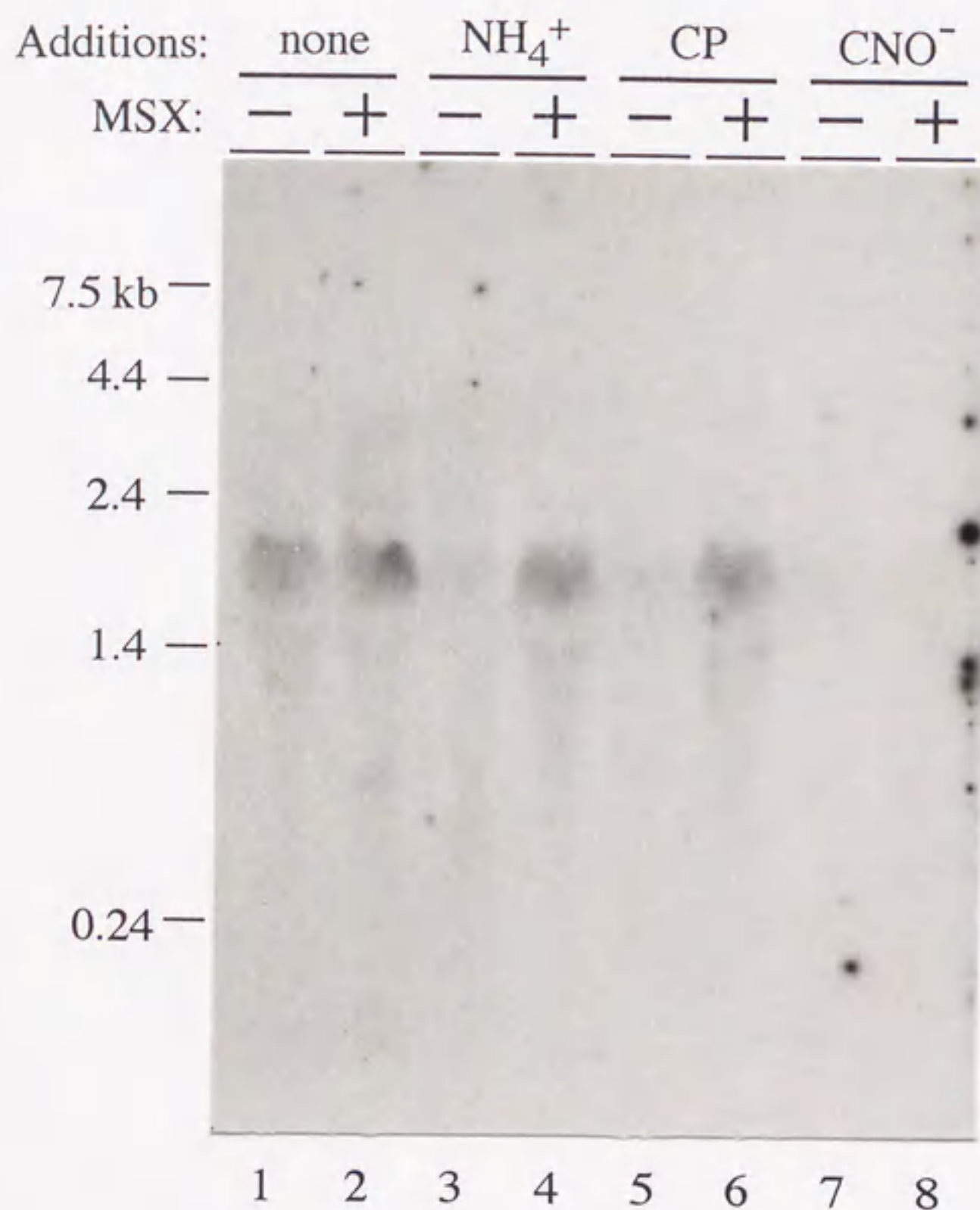


図 3-8. *glnA* 転写産物の蓄積におよぼす MSX と窒素源の影響。

30 mM の硝酸を窒素源として生育する M45 の細胞に、MSX を与えたもの (レーン 2, 4, 6, 8)、与えなかったもの (レーン 1, 3, 5, 7)、同時にアンモニア (レーン 3, 4)、CP (レーン 5, 6)、シアン酸 (レーン 7, 8) を与えたものを培養条件で 15 分間おいた細胞から全 RNA を抽出し、ノーザン解析を行った。



## 第 4 章

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の  
窒素同化とその調節に関わる  
新規遺伝子の同定と機能解析



## 4-1. 序論

前章までに示したように、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の硝酸同化系に関わる6つの遺伝子は、*nirA* オペロン (*nirA-nrtABCD-narB*) を形成している。その転写は、細胞の窒素栄養状態を反映したシアン酸の蓄積によって、抑制を受けると推定される。したがって、このオペロンの転写開始点の上流には、窒素栄養を検知して制御されるプロモーターが存在すると考えられる。そこで、第2章でクローニングした *nirA* の上流域を予備的に解析したところ、25 bp の一組の逆位反復配列が存在していた (図 2-2, 456-470, 607-583)。そして、その逆位反復配列をはさんで、*nirA* の翻訳開始点とほぼ対称な位置から逆向きにつながる ORF (図 2-2, 377-1) が存在していることがわかった。したがって、この未同定の ORF も *nirA* と同様窒素により制御を受け、硝酸同化に関わる遺伝子である可能性が考えられた。*nirA* オペロンに含まれる遺伝子の他にも、硝酸同化活性の発現やその調節に必要な遺伝子がある可能性は高い。たとえば、NR あるいは NiR の補酵素の生合成および、アッセンブリーに必要な遺伝子などの関与が考えられる。実際、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 において、NR 活性の発現に必須で、機能未同定の2つの遺伝子、*narA* と *narC* がクローニングされている (Kuhlemeier et al., 1984a, 1984b)。これらの遺伝子の機能の解明や、硝酸同化に関わる未知の遺伝子の単離とその解析は、硝酸同化系とその調節の包括的理解に必要であると思われる。著者らは、*nirA* オペロンの上流のDNA断片を取得し、その領域の塩基配列を決定した。さらに、その領域への *kan<sup>r</sup>* カセットの挿入により変異株を作製し、その領域に含まれる遺伝子の機能を推定した。

## 4-2. 結果

### 4-2-1 塩基配列と推定されるアミノ酸配列

これまでに、*nirA* 遺伝子の *SacI* サイトに、*kan<sup>r</sup>* を挿入した 4 kb の *BamHI* 断片がクローニングされていた (Omata et al., 1991, pTO5, 図 4-1)。この *BamHI* 断片は、塩基配列の解析から、663 bp の *nirA* 上流領域を含んでいることが明らかになった。pTO5 の 0.5 kb の *EcoRI*-*BamHI* 断片をプローブにして、*nirA* のさらに上流を含む 3.0 kb の *SacI*-*EcoRI* 断片をクローニングし (pNH9, 図 4-1)、塩基配



列を決定した。図 4-2 に、*nirA* 上流領域を含む 2500 bp の塩基配列を示した。この領域には、*nirA* とは逆向きに 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) が見出された (図 4-1, 4-2, *nirB*, *ntcB*)。2 つの ORF はお互いに 7 bp 重なっており、それぞれ 349 と 309 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。

親水性のタンパク質である NirB の推定アミノ酸配列は、既知のタンパク質と相同性が見られなかった。それに対し、NtcB タンパク質の推定配列は、LysR ファミリー (Henikoff et al., 1988) に属する細菌の転写活性化因子である *Bacillus subtilis* の GltC (Bohannon and Sonenshein, 1989)、*E. coli* の IlvY (Wek and Hatfield, 1986)、LysR (Stragier and Patte, 1983) と、280 アミノ酸以上にわたり高い相同性が認められた。図 4-3 に示したように、GltC とは 27 % のアミノ酸が同一であり、IlvY、LysR とは 24 % が同一であった。LysR ファミリーに属する転写調節因子はお互いに N 末端付近に特に高い相同性が見られる。NtcB の N 末端の 60 アミノ酸は、GltC、IlvY、LysR とそれぞれ、46、41、33 % が同一であった。また、他の LysR ファミリーに属する転写調節因子で見られるように、N 末端に DNA 結合領域と思われるヘリックス・ターン・ヘリックス構造を形成すると予想される配列が、18 から 37 番目のアミノ酸 (図 4-3 下線)に見られた。このタンパク質の推定ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフのスコアを、Dodd and Egan (1990) の方法に従って計算したところ、2269 であった。この値は、既知の LysR ファミリーのヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフ部分と比較しても高い値であった。これらの結果から、NtcB はその N 末端にヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを持ち、LysR ファミリーに属する DNA 結合タンパク質であることが強く示唆された。

#### 4-2-2 *nirB*、*ntcB* の転写とその調節

*nirB*、*ntcB* の転写産物の量と大きさに関する情報を得るために、*Synechococcus* sp. PCC7942 から抽出した RNA を用い、*nirB* および *ntcB* の DNA 断片をプローブとして、ノーザン解析を行った (図 4-4)。アンモニアを窒素源として生育した細胞では、*nirB*、*ntcB* の転写産物の蓄積は少なかった (図 4-4; レーン 1, 3)。アンモニアで生育した細胞を硝酸を唯一の窒素源とする培地へ移すと、転写産物は蓄積した (図 4-4; レーン 2, 4)。ハイブリダイゼーションにより検出されたシグナルは、0.25 から 1.5 kb の長さにわたっていた。同じ RNA を用いて行った *psbA* のノーザン解析の結果、Golden et al. (1986) によって報告されているとおりの明



瞭なシグナルが検出されたので(図 2-4)、不明瞭なシグナルは抽出と解析の操作の過程における RNA の分解を意味するのではなく、これらの遺伝子の転写産物が不安定なためであると推定した。*nirA* の場合と同じく *nirB*、*ntcB* の転写産物量は、アンモニアで生育した細胞を硝酸培地へ転換後およそ 30 分後に最も高く、その後徐々に減少した(図 4-5; 黒丸)。*Synechococcus* sp. PCC7942 においては、*nirA* を含む窒素同化系の遺伝子の発現は、Crp 型の転写因子である NtcA に依存していることが示されている (Vega-Palas et al., 1992, Luque et al., 1994)。*ntcA* の変異株においては、細胞のアンモニア培地から硝酸培地への転換によって、*nirB*、*ntcB* の転写の活性化は起こらなかった(図 4-5; 白丸)。このことは、*nirB*、*ntcB* の転写の活性化も NtcA に依存していることを示している。S1マッピングの結果、*nirB* の転写開始点は *nirB* の翻訳開始点の 30 bp 上流(図 4-2; ヌクレオチド 287)にマップされた。

#### 4-2-3 *nirB*、*ntcB* 遺伝子の破壊

*nirB*、*ntcB* 遺伝子は、細胞をアンモニア培地から硝酸培地に転換すると、NtcA に依存して転写が活性化されることから、何らかの形で窒素代謝に関わっている可能性が考えられた。*nirB*、*ntcB* の機能を解析するために、*kan<sup>r</sup>* をこれらの遺伝子のコード領域中に挿入して破壊した変異株を作製し、その表現型を調べることにした。ラン藻は複数のゲノムコピーを持つので、その全てを変異したゲノムコピーに置き換えたことを確認する必要がある。そこでまず、作製したそれぞれの変異株からゲノム DNA を抽出し、*nirB*、*ntcB* に特異的なプライマーによる PCR を行った。いずれの変異株も、二重相同組み替えによって遺伝子が破壊されている場合に予想される大きさの断片が、PCR によって増幅されたので、それらの遺伝子が破壊されていると判断した (data not shown)。

#### 4-2-4 *nirB* 変異株の表現型

野生型の *Synechococcus* sp. PCC7942 は、硝酸、亜硝酸、アンモニアのいずれを窒素源として生育させても、集光性色素タンパク質フィコシアニンが多量に蓄積し、細胞は特有の青緑色を呈する。*nirB* 変異株はアンモニアを窒素源として培養したときには、青緑色を呈し、野生株と同程度の速度で増殖するが、硝酸、亜硝酸を窒素源とする場合には、野生株より増殖が遅かった(表 4-1)。硝酸または亜硝酸培地で生育させた変異株のコロニーは、窒素欠乏状態の細胞に特有の



フィコシアニンの減少に起因する黄緑色を呈した(表4-1)(Omata et al., 1989)。これらの結果から、*nirB*は硝酸、亜硝酸の利用に必須ではないが、その効率を高めるために必要であると考えられた。

*Synechococcus* sp. PCC7942においては、硝酸と亜硝酸の利用に関わる6つの遺伝子がオペロンを構成している(*nirA-nrtABCD-narB*)(Omata et al., 1993, Suzuki et al., 1993)。*nirB*遺伝子が、このオペロンの発現に関わっているかどうかを検討するために、野生株と変異株から調製したRNAのノーザン解析を、オペロンの最初の遺伝子である*nirA*をプローブとして行った(図4-6; レーン1~4)。以前に示したように(Suzuki et al., 1993, 第2章)、野生型の細胞をアンモニア培地から硝酸培地に転換すると、0.2から5 kb以上にわたる大きさの*nirA*オペロンの転写産物が蓄積する(図4-6; レーン1, 2)。*nirB*変異株もアンモニアから硝酸に窒素源を変えると、*nirA*オペロンの転写産物は蓄積し、その量は野生株に匹敵していた(図4-6; レーン3, 4)。したがって、*nirB*変異株の硝酸、亜硝酸の利用効率の低下は、*nirA*オペロンの転写の過程の低下によるものではないと結論された。

*nirB*変異株では、窒素同化系酵素のうちNR、GS、GOGAT活性は野生株より高かったが、NiR活性は野生株の40%しかなかった(表4-2)。この変異株を硝酸培地で生育させると、培地中に亜硝酸イオンが蓄積したことから(図4-7)、この株においては亜硝酸還元過程が硝酸同化系を律速していることが示された。同じ条件下で野生株あるいは*ntcB*の変異株では亜硝酸の蓄積は観察されなかった(図4-7)。これらの結果から、*nirB*はNiR活性の最大発現に必要であることが示唆された。

#### 4-2-5 *ntcB* 変異株の表現型

硝酸、亜硝酸を窒素源とする培地では、*ntcB*変異株の細胞は、野生株に比べて生育が遅く黄緑色を呈した(表4-1)。アンモニアを窒素源とする培地では、野生株と同程度の増殖速度が観察されたが、細胞は黄緑色であった。したがって、この遺伝子は硝酸、亜硝酸培地のみでなくアンモニア培地においても、*Synechococcus*の正常な生育に必要であることが示された。この変異株においてはアンモニアの固定に関わる2つの酵素GS、GOGATの活性は、野生株より高かった。したがって、*ntcB*はGSおよびGOGATの遺伝子の発現を活性化する因子ではないと考えられる。変異株のGS、GOGATの活性は野生株より高かったのに対し、NR、NiR活性は低かった(表4-2)。LysRファミリーに属する転写因子の多くは、その



遺伝子上流に位置し、逆向きに転写されるオペロンの転写を活性化しているので、NtcBが *nirA* オペロンの活性化に関わっている可能性が考えられた。実際、*ntcB* 変異株においては *nirA* の転写産物の蓄積は、野生株に比べて30%程度少なく(図4-6; レーン5, 6)、NR、NiR活性も野生株に比べて、それぞれ35%、20%低かった。しかし、*ntcB* の変異株においても転写産物が観察されていることから、*ntcB* は *nirA* オペロンの転写に必須な因子ではない。また、転写産物およびNR、NiR活性の30%程度の低下が、はたして有意な差であるかどうかは明らかではなく、*ntcB* が *nirA* オペロンの転写の活性化に関与するかどうかについては決定できなかった。

### 4-3. 考察

この研究で、硝酸の取り込みと利用に関わる *nirA* オペロン (Omata et al., 1993, Suzuki et al., 1993) の上流に、2つの窒素同化に関わる遺伝子、*nirB* と *ntcB* を見出した。2つの遺伝子は *nirA* と逆向きに転写され、*nirB*、*ntcB* の順に存在する(図4-1, 4-2)。この二つの遺伝子の転写は、*nirA* の転写と同様アンモニアによって抑制された。*nirA* オペロンの発現は、窒素状態に応じて複数の窒素同化系遺伝子を制御する転写因子 NtcA (Luque et al., 1994, Vega-Palas et al., 1992) によって制御されるが、*nirB*、*ntcB* の活性化も同じく NtcA に依存していることが、NtcA 変異株を用いた解析から明らかである(図4-5)。最近、Luque et al. (1994) は、*nirA* の上流域に3つの NtcA の結合配列 (*nirI*, *nirII*, *nirIII*) の存在を明らかにした。その部位は GTAN<sub>8</sub>TAC というパリンδροームな共通配列であった。この章に示した研究から、3つの NtcA 結合配列は *nirA* と *nirB* の間の286 bp に対称に存在していることが示された(図4-2)。*nirA* に近接するサイト (*nirI*) は、*nirA* のコード領域から72.5 bp 離れて存在し、*nirB* に近接するサイト (*nirIII*) は、*nirB* のコード領域から74.5 bp 離れて存在する。そしてもう1つは、*nirA*、*nirB* からそれぞれ、141.5 bp と145.5 bp 離れたほぼ中央に位置している。筆者がこの章で記す研究を開始するにあたり予備的に見出していた、逆位反復配列は *nirI* と *nirIII* に相当する領域であった。Luque et al. (1994) は、*nirA* オペロンに見られるような NtcA で制御される遺伝子のプロモーターには、NtcA 結合サイトの23 bp 下流に TAN<sub>3</sub>T 配列の-10領域が存在すると報告している。この法則に従うと、*nirIII* の NtcA 結合配列とその23 bp 下流で *nirB* 転写開始点から10 bp 上流の



TTAGGT (図 4-2; ヌクレオチド 232 から 237) が *nirB* のプロモーター領域であると考えられる。-10 領域は提唱されているコンセンサス配列と完全に一致するわけではなかったが、この配列が-10 領域として機能していると思われる。*nirB* の終止コドンが *ntcB* の開始コドンの 7 bp 下流に位置していることと、*ntcB* のすぐ上流には NtcA 結合サイトがないことから、*nirB* と *ntcB* は、ポリシストロン性の mRNA として共転写されると推定される。

*kan<sup>r</sup>* の挿入により作製した *nirB*、*ntcB* の変異株は、硝酸または亜硝酸を窒素源とする培地での生育が、抑制された (表 4-1)。アンモニア培地で生育すると、*ntcB* の変異株は依然として窒素欠乏様の黄緑色を呈したが、*nirB* 変異株はアンモニア培地で正常に生育した (表 4-1)。このことは先に仮定した *nirB*、*ntcB* がポリシストロニックな mRNA として転写されるとする仮説に一見矛盾するが、この点については *nirB* 遺伝子の破壊に用いた C.K1 (Elhai and Wolk, 1988) 由来の *kan<sup>r</sup>* カセットの性質を考慮すれば説明できる。この *kan<sup>r</sup>* は、転写終結シグナルを含まず (Beck et al., 1982)、実際、この *kan<sup>r</sup>* を *nirA* オペロンの *nrtD* にオペロンの転写方向と同じ向きに挿入すると、その下流の遺伝子 *narB* は構成的に発現することが知られている (Omata et al., 1993)。したがって、*nirB* の変異株に、*kan<sup>r</sup>* の挿入による *ntcB* への極性効果が見られなかったことは、*kan<sup>r</sup>* のカセット中に転写終結シグナルがないためであり、*nirB* と *ntcB* がオペロンを構成しているという仮説に矛盾するものではないと考えられる。

*nirB* 遺伝子の破壊は、メチルビオロゲンを電子供与体として測定した NiR 活性の低下を引き起こしたが、NR、GS、GOGAT 活性は減少させなかった (表 4-2)。さらに、*nirB* 変異株は培地中に亜硝酸イオンを蓄積していた (図 4-7)。このことは、硝酸の還元により生じた亜硝酸の全てを還元するのに十分な NiR 活性が、*nirB* 変異株の細胞内に発現していないことを意味している。一方、*ntcB* 変異株においては NiR 活性の特異的な減少や、培地への亜硝酸の蓄積は観察されなかった (表 4-2、図 4-7)。これらの結果は、*nirB* は NiR の最大活性の発現に必要であることを示すものである。*nirB* 変異株においても、野生株の 30 % 程度の NiR 活性が検出されることから (表 4-2)、*nirB* は NiR の生合成やアッセンブリーに必須なものではないと考えられる。*nirB* の機能としては、i)、シロヘムや鉄イオウ中心のような、NiR の補欠分子族の生合成やアッセンブリーに関わる遺伝子を活性化する、ii)、NiR ポリペプチドと補欠分子族とのアッセンブリーを促進する、iii)、活性のある NiR 分子の安定性を高めるなどの、可能性が考えられる。NiR の推定ア



ミノ酸配列は、既知のタンパク質の配列と相同性が見られないので、構造の類似性からその機能を推測することはできなかった。NirB の機能の解明には、生化学的な解析がさらに必要である。

NtcB の推定一次構造は、その N 末端付近にヘリックス・ターン・ヘリックス構造の DNA 結合領域を持つ、典型的な LysR ファミリーに属する転写活性化因子のものであった (図 4-3)。*ntcB* の転写は窒素欠乏条件下で *ntcA* に依存して活性化される (図 4-5)。このことは、NtcB が窒素欠乏条件下での生育に必要な他の遺伝子 (群) を活性化していることを示唆するものである。しかしながら、アンモニアで生育させた細胞にも、*ntcB* の転写産物が少ないながら存在していること (図 4-4, 4-5) と、*ntcB* の変異株がアンモニア培地においても黄緑色を呈すること (表 4-1) は、NtcB が窒素充足条件下においても一定の役割を果たしていることを示している。アンモニアは、GS によってグルタミンのアミド基の窒素として固定された後、様々な有機窒素化合物の合成に利用されるので、固定された窒素の種々の生合成経路への分配を調節する機構が存在する可能性がある。細胞がこのような機構を的確に制御することにより、固定された窒素の利用のバランスを維持することは、特に窒素欠乏条件下で同化される窒素が制限され、複数の生合成経路が窒素の利用をめぐる競争する場合に特に重要だと考えられる。*ntcB* のアミノ酸配列が LysR ファミリーの転写活性化因子と高い相同性を示すこと、窒素制限条件下でその転写産物の蓄積が誘導されることから、*ntcB* はいずれかの生合成経路の活性を調節することにより、固定された窒素の配分を制御するのに関わる遺伝子であると推測される。NtcB によって制御される遺伝子を同定することが、*Synechococcus* sp. PCC7942 の窒素代謝における NtcB の機能を解明するのには必要である。



表 4-1. 野生株と変異株の様々な窒素源の培地での分裂速度と色調<sup>a</sup>。

変異	平均世代時間 <sup>b</sup> (色調) <sup>c</sup>		
	KNO <sub>3</sub>	NaNO <sub>2</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
なし (野生株)	4.7 (BG)	5.3 (BG)	4.4 (BG)
<i>nirB</i>	6.3 (YG)	7.1 (YG)	4.5 (BG)
<i>ntcB</i>	7.2 (YG)	7.8 (YG)	4.6 (YG)

<sup>a</sup>*Synechococcus* sp. PCC7942 野生株と変異株は、無窒素培地に 15 mM KNO<sub>3</sub>、5 mM NaNO<sub>2</sub>、3.75 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> をそれぞれ添加して作製した培地で 35 °C で生育させた。

<sup>b</sup> 分裂速度は 730 nm の濁度の増加時間から求めた。

<sup>c</sup> 培養液の色調の略語 BG は、細胞に色素タンパク質が蓄積し青緑色 (blue-green) で生育したことを、YG は明らかな色素の減少が観察され黄緑色 (yellowish green) を呈したことをそれぞれ示している。



表 4-2. 野生株と変異株の窒素同化系酵素活性<sup>a</sup>。

変異	酵素活性 <sup>b</sup> (値の変動の幅)			
	NR <sup>c</sup>	NiR <sup>c</sup>	GS <sup>d</sup>	GOGAT <sup>d</sup>
なし (野生株)	261 (252-270)	94 (88-102)	35 (33-36)	0.51 (0.36-0.66)
<i>nirB</i>	396 (362-421)	37 (25-51)	38 (37-41)	0.72 (0.66-0.78)
<i>ntcB</i>	170 (153-186)	73 (66-81)	51 (49-53)	0.94 (0.80-1.08)

<sup>a</sup>アンモニア培地で生育した野生株と変異株の細胞を硝酸培地へ転換し、12時間生育した後各酵素活性を測定した。

<sup>b</sup>独立した2連の実験 (GOGAT)、または3連の実験 (NR, NiR, GS) の平均値を示した。

<sup>c</sup>活性は、 $\mu\text{mol/mg Chl/h}$  で表示した。

<sup>d</sup>活性は、 $\mu\text{mol/mg protein/h}$  で表示した。



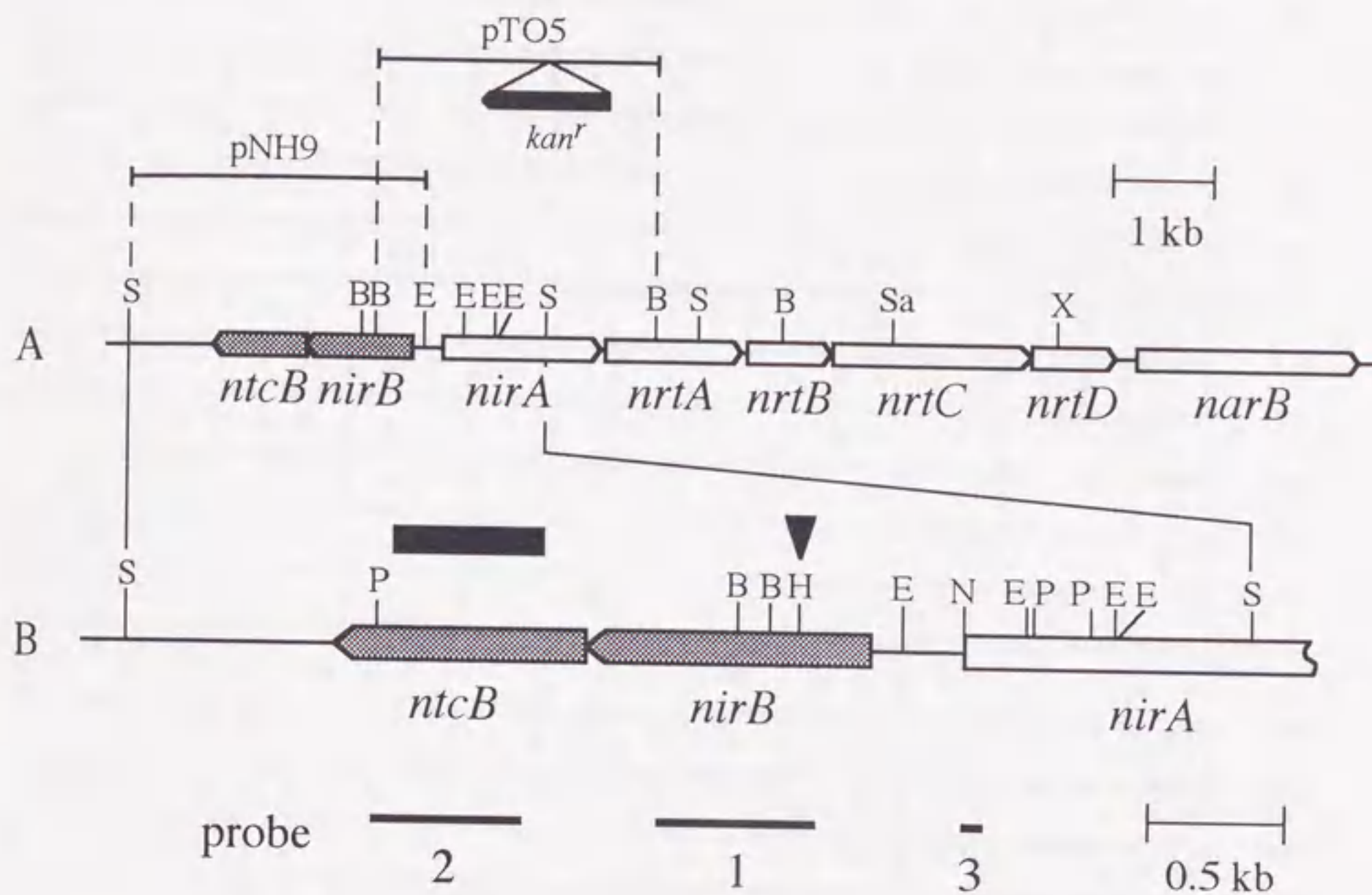


図 4-1. *nirA* オペロンの上流領域に存在する *nirB*、*ntcB* 遺伝子。

A. *Synechococcus* sp. PCC7942 ゲノム上の *nirB*、*ntcB* 遺伝子の領域の制限酵素地図。それぞれの遺伝子は転写方向を示した帯で表し、この章で詳細に記述する遺伝子については陰を付けた。地図の上方に、pTO5 と pNH9 にクローニングした断片を示した。B. *nirA*、*nirB*、*ntcB* 遺伝子の制限酵素地図。地図の下方に、ノーザン解析とドットブロット解析に用いたプローブ 1 から 3 の領域を、太線で示した。地図の上方には、*nirB* 変異株作製のために、カナマイシン耐性遺伝子を挿入した位置を黒矢印で、*ntcB* 変異株で置き換えた領域を黒の長方形でそれぞれ示した。制限酵素切断部位は以下のように略した。B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nco*I; P, *Pst*I; S, *Sac*I; Sa, *Sal*I; X, *Xba*I.







```

NtcB  1'      MRLEQLQAALRVAETGSFQEAAQKVGCSNSTISRQVKGLEDELGIALFRQGR-
          | | . . | | . | | . . . | | . | | . | | . | | . | |
GltC  1" MDVRQTWSLRQLRYFMEVAEREHVSEAADHLHVAQSAISRQIANLEEELNVTLFEREGRN

54' MKLTAAGERLLPRLRRICQEWQTACTEIEELLTGRQTELCMAIADSIGGCYLPVLRNRFQ
    . | | . | . . | . . . | . . | . . . . . . | . . | . . | .
61" IKLTPIGKEFLIHVKAMKAIDYAKEQIDEYLDPHRGTVKIGFPTSLASQLLPTVISAFK

114' QQWPSIHLRVSTLGSDRALKVLRDGLIDLAIVMDSPTLTTSAGLVVDLLLEEEVQVLLSV
    . . | . . . . . . . . | . | | | . . | . . . . . | . . | . . | .
121" EEYPHVEFLLRQGSYKFLIEAVRNRDIDLALLGPVPT--NFSDITGKILFTEKIYALVPL

174' DHPLADQKAIWEQLSHVPQVVFQDGYGMQRLVEQRFRELGLELNSCLELNSLDSFRGVV
    . | | | . | | . . | . . . | . | . . . . . . | . . . | . | . | .
179" NHPLAKQKTVHLIDLRNDQFVLFPEGFVLREMAIDTCKQAGFAPLVSTEGEDLDAIKGLV

234' REGYWLALLPQAALVDARHDPRLVIR-PTAEPRLTRRIKLVIPEEQSLPPVRHFRQLCR
    . . | . . | | . . . . . | | . . . | . . | . . | . . | . . |
239" SAGMGVTLLPESTFAET--TPRFTVKIPIEFQVKRTVGIIKPKNRELAPSANDFYEFVI

293' EAMTAELCDFKTLSQLF

297" QFFSKLEQYQ

```

図 4-3. FASTA プログラム (Pearson and Lipman, 1988) により最適化した NtcB の推定アミノ酸配列と GltC とのアラインメント。

縦線は同一のアミノ酸残基を表し、点は性質の類似したアミノ酸の間での置換を表している。それぞれの N 末端付近の、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造を取ると想定される領域に、線を引いて示した。



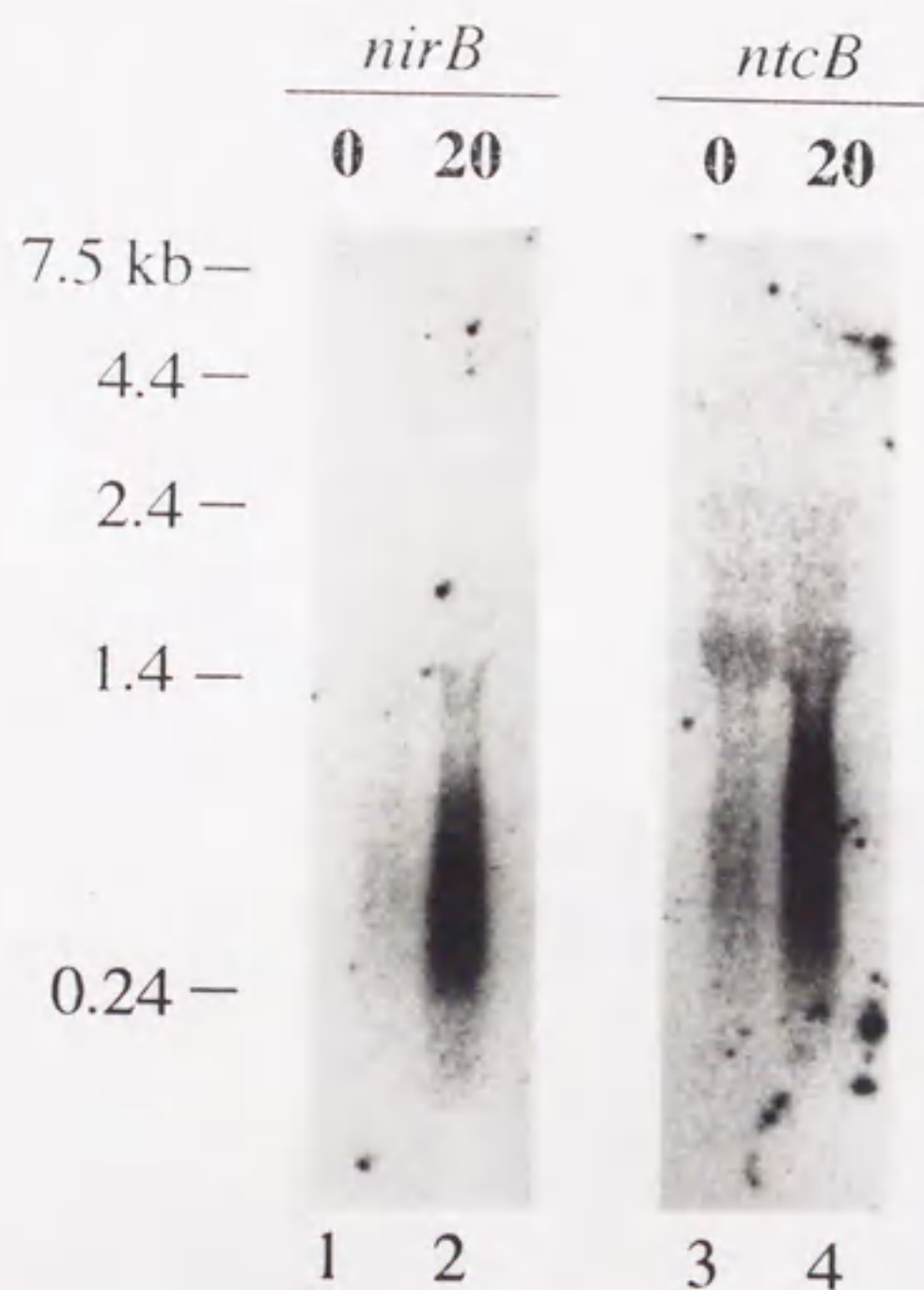


図 4-4. *Synechococcus* sp. PCC7942 から調製したRNAに対し、*nirB*、*ntcB* をプローブとして行ったノーザン解析。

アンモニアを窒素源として生育した細胞を硝酸培地に転換した。培地の転換前（レーン 0）と、転換後 20 分した細胞（レーン 20）からの RNA を比較した。各レーン 20  $\mu$ g の RNA を変性後電気泳動で分画し、正に帯電したナイロン膜に転写した。プロットは、先に示したそれぞれの遺伝子の特異プローブとハイブリダイズさせた。レーン 1 と 2、プローブ *nirB*、レーン 3 と 4、プローブ *ntcB*。



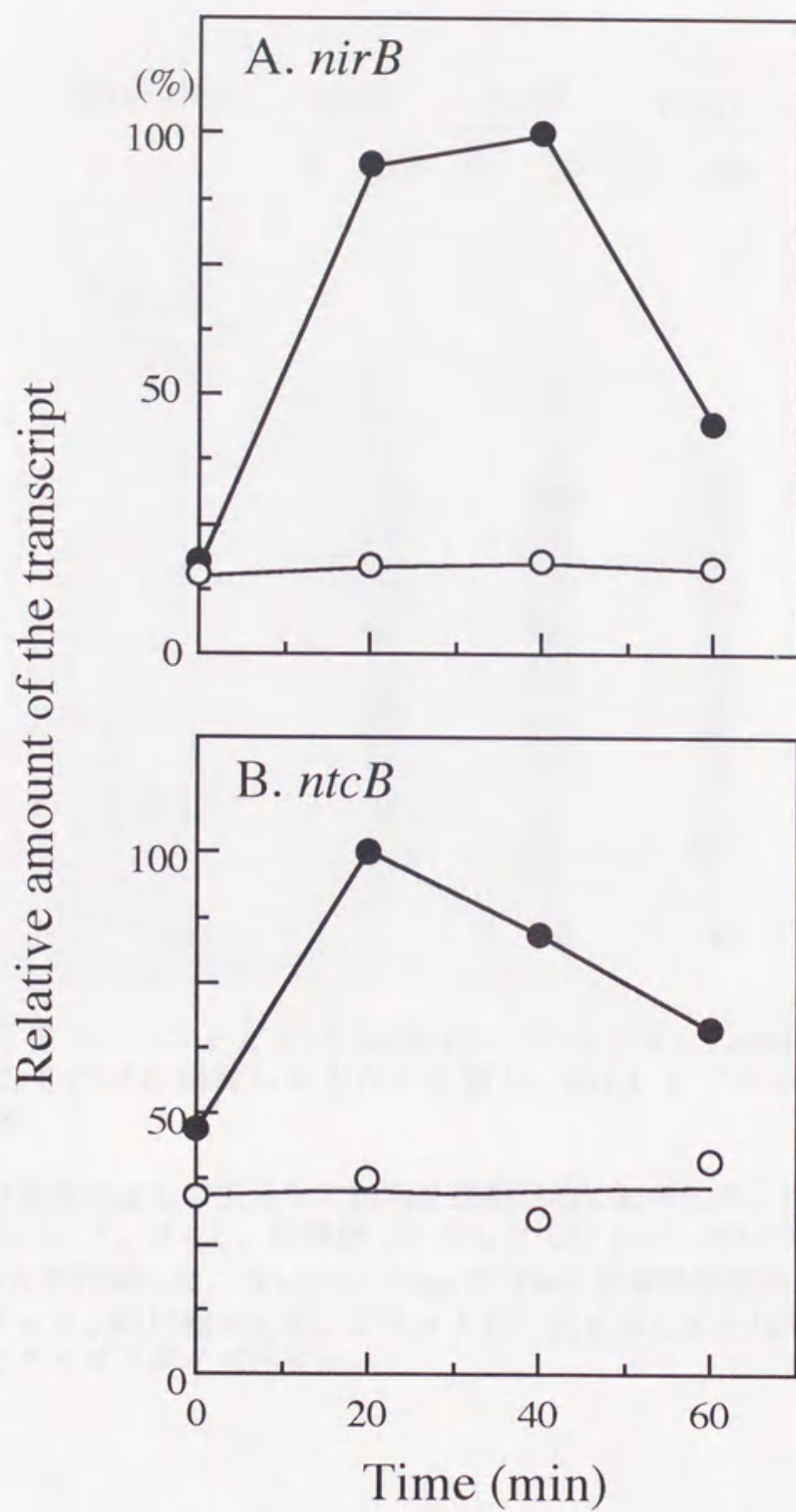


図 4-5. アンモニア培地で生育した野生株 (黒丸) と、*ntcA* 変異株 (白丸) の細胞を硝酸培地へ転換後の、*nirB* 転写産物 (A) と *ntcB* 転写産物 (B) の蓄積量の変化。



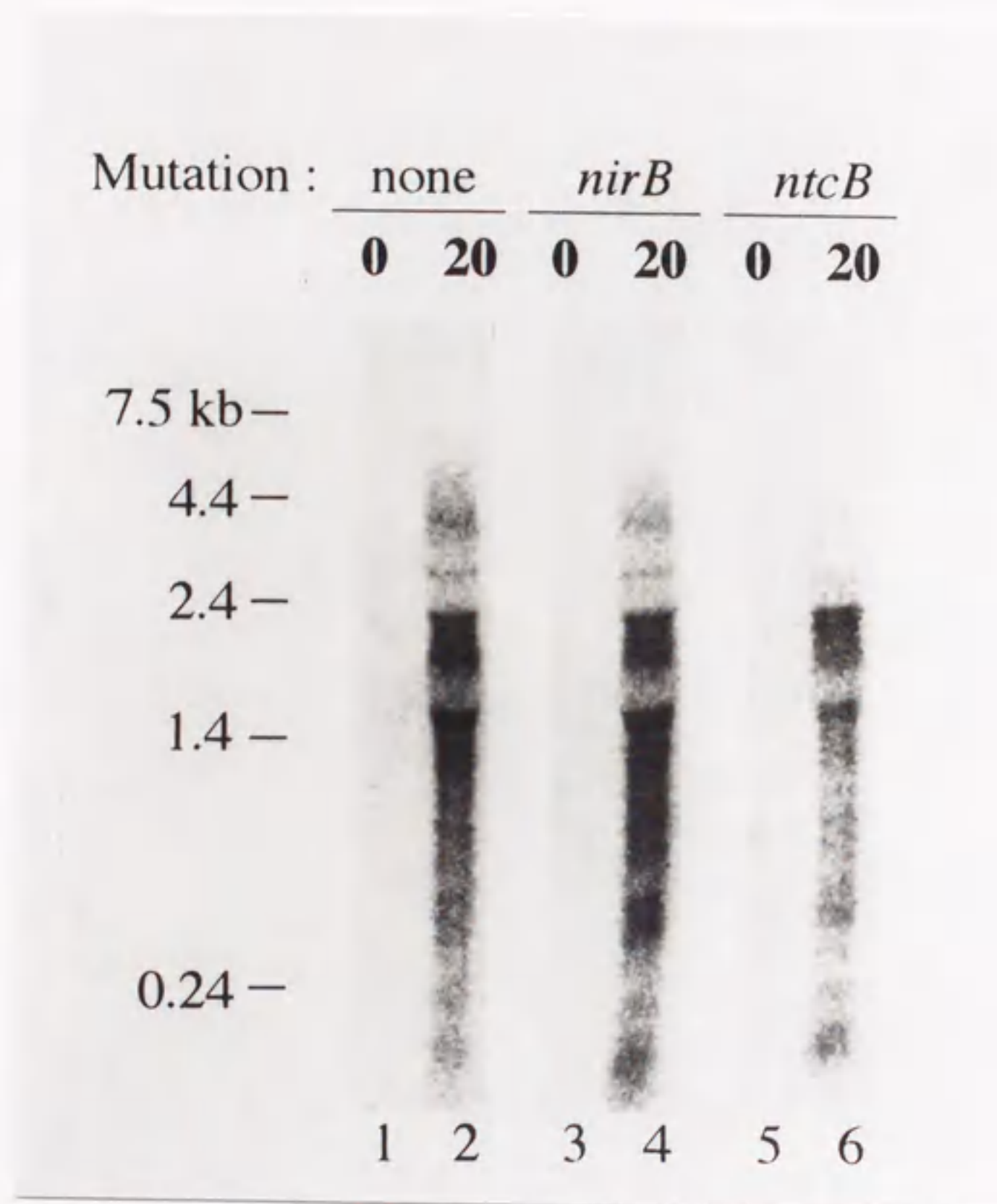


図 4-6. 野生株 (レーン 1 と 2) と *nirB* (レーン 3 と 4)、*ntcB* (レーン 5 と 6) の変異株からそれぞれ調製した RNA に対し、*nirA* をプローブとして行ったノーザン解析。

アンモニアを窒素源として生育した細胞を硝酸培地に転換した。培地の転換前 (0 と示したレーン 1、3、5) と、転換後 20 分した (20 と示したレーン 2、4、6) 細胞からの RNA を比較した。各レーン 10  $\mu$ g の RNA を変性後電気泳動で分画し、正に帯電したナイロン膜に転写した。ブロットは、先に示したそれぞれの遺伝子の特異プローブとハイブリダイズさせた。



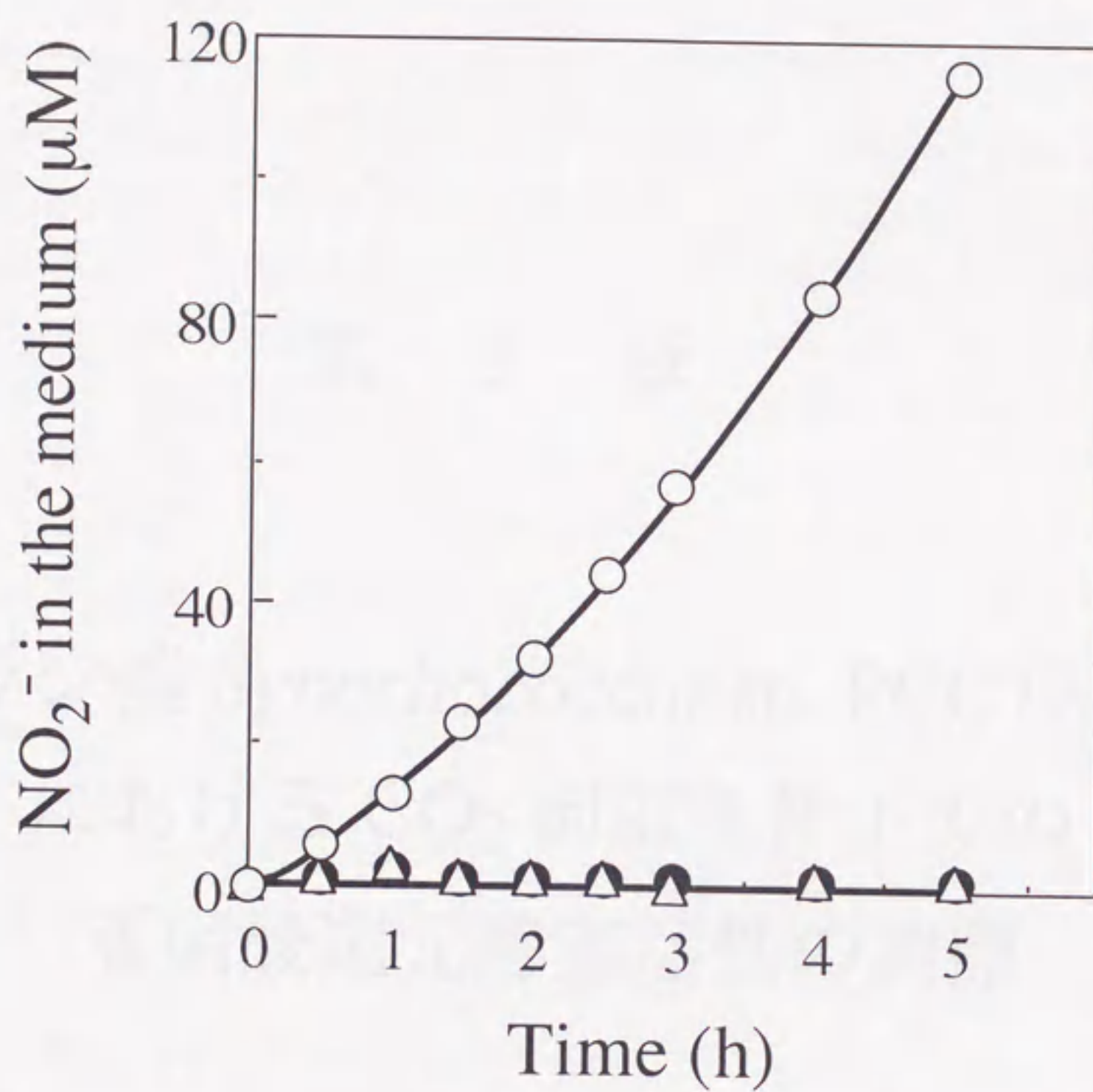


図 4-7. アンモニア培地で生育した野生株 (黒丸)、*nirB* 変異株 (白丸)、*ntcB* 変異株 (白三角) の細胞を硝酸培地へ転換後の、培地中の亜硝酸濃度の変化。

細胞を集めて洗浄した後、0 時間に Chl 量が  $6 \mu\text{g/mL}$  の濃度になるように硝酸培地に植菌した。



## 第 5 章

### ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 における CO<sub>2</sub> 制限条件下での 亜硝酸還元酵素活性の調節



## 5-1. 序論

前章までに明らかにしたように、細胞の窒素栄養の充足あるいは欠乏によって、窒素同化系と炭素同化系の様々な遺伝子の転写が調節を受けている。さらに、窒素は、翻訳後の調節によっても窒素同化系の活性を制御することが知られている。*Synechococcus* sp. PCC 7942 ときわめて近縁のラン藻である *Synechococcus* sp. PCC6301 (以前は *Anacystis nidulans* L1402-1 と呼ばれていた) では、硝酸で生育している細胞にアンモニアを添加すると、細胞への硝酸の取り込みが速やかに停止する (Flores et al., 1980)。この硝酸の取り込みの阻害は、硝酸の能動輸送の過程が阻害されて起こることが、細胞内の硝酸イオン濃度を測定する実験により確認されており (Lara et al., 1987)、最近小林らは、*Synechococcus* sp. PCC7942 において、NrtC の 2 つのドメインのうち C 末端側のドメインが、アンモニアによる亜硝酸の取り込みの阻害に関わっていることを明らかにしている (unpublished results)。このアンモニアによる硝酸能動輸送の阻害は (Lara et al., 1987)、*nirA* オペロンの転写の抑制と同様 (Suzuki et al., 1993, 第 2 章)、アンモニアそれ自身の作用ではなく、GS により Gln へ固定された後に発揮される。

それでは、炭素の同化は窒素同化系の遺伝子の発現や活性制御に、どのような影響を及ぼすのであろうか。高等植物においてもラン藻においても硝酸の同化は、細胞の窒素栄養状態のみならず、CO<sub>2</sub> の固定に依存している (Aslam et al., 1979, Kaiser and Förster, 1989, Pace et al., 1990, Flores et al., 1983b, Romero et al., 1985, Lara and Romero, 1986)。CO<sub>2</sub> の欠乏は、高等植物においては NR の活性を阻害するけれども、*Synechococcus* sp. PCC6301 においては、短時間の CO<sub>2</sub> の欠乏では NR 活性は変動しない (Lara et al., 1987)。それでは、*Synechococcus* sp. PCC6301 においてどのような制御が知られているかということ、細胞を炭素固定の阻害剤 DLG で処理することによって CO<sub>2</sub> 同化量を制限する実験から、硝酸の取り込み過程が阻害されるという調節系が存在することが明らかにされている (Lara et al., 1987)。したがって、*Synechococcus* sp. PCC7942 においても、この硝酸の輸送過程が、炭素と窒素の供給に応じて翻訳後の調節機構により制御される、最も主要な過程であると考えられている。しかしながら筆者は、前章で扱った *nirB* の変異株 (NiR 活性が低く培地中に亜硝酸イオンを蓄積する) の表現型の解析中、偶然に野生型の *Synechococcus* sp. PCC7942 の場合も CO<sub>2</sub> 制限条件下に置かれると、培地中に多量の亜硝酸イオンを蓄積することを見出した。このことは、CO<sub>2</sub> 欠乏



下では亜硝酸の還元過程が、硝酸同化の律速段階であることを示すものであり、従来の硝酸の輸送過程が硝酸同化過程を律速しているとする仮説とは異なるものであったので、さらに詳細に解析した。

## 5-2. 結果

### 5-2-1 細胞の生育、硝酸イオンの取り込みと亜硝酸イオンの放出に及ぼすCO<sub>2</sub> 欠乏の影響

図5-1Aは、*Synechococcus* sp. PCC7942の細胞を硝酸イオンを窒素源として、高CO<sub>2</sub>条件とCO<sub>2</sub>欠乏条件で培養した時の生育曲線を示したものである。50 mLの培養液に、0.1%のCO<sub>2</sub>を含む空気を0.6 L/hの速度で通気したとき、すなわちCO<sub>2</sub>通気量27  $\mu$ mol/h(黒丸)の場合には、2%のCO<sub>2</sub>を含む空気を2.2 L/hで通気したとき、すなわちCO<sub>2</sub>通気量2 mmol/h(白丸)の場合に比べて、細胞の増殖は遅かった。つまり、CO<sub>2</sub>通気量27  $\mu$ mol/h(黒丸)では、細胞の増殖がCO<sub>2</sub>の供給量によって制限されていた。高CO<sub>2</sub>条件下(CO<sub>2</sub>通気量2 mmol/h)で培養した細胞は、測定の間内(t=0~12 h)に1 mLの培養液あたり2.6  $\mu$ molの硝酸イオンを取り込んだ(図5-1B)。この硝酸の取り込み量(2.6  $\mu$ mol/mL)を、クロロフィル量を時間で積分した値(図5-1Aの曲線の下側の面積; 0.075 mg Chl h/mL)で割って硝酸の取り込みの平均速度を計算すると、34  $\mu$ mol/mg Chl/hであった。この値は、以前に高CO<sub>2</sub>条件で別の方法で測定された硝酸の取り込み速度、30  $\mu$ mol/mg Chl/h (Omata et al., 1989; 図6, 7)とよく一致するものであった。CO<sub>2</sub>欠乏条件下(CO<sub>2</sub>通気量27  $\mu$ mol/h)での硝酸取り込み速度は、t=0からt=12の間に取り込んだ硝酸の量1.3  $\mu$ mol/mLを、時間で積分したクロロフィル量0.06 mg Chl h/mLで割算して、22  $\mu$ mol/mg Chl/hと求められた。CO<sub>2</sub>欠乏条件下で培養した細胞の硝酸の取り込み速度は、高CO<sub>2</sub>条件の細胞のおよそ65%に低下していた。ここでは、硝酸イオンの取り込み速度をクロロフィルあたりで示したが、測定開始時(t=0)に $2.5 \times 10^{-14}$  gであった細胞あたりのクロロフィル含量は、CO<sub>2</sub>



制限条件下においても高  $\text{CO}_2$  条件下においても、この実験の間ほぼ一定に保たれていた (data not shown)。したがって、この硝酸イオンの取り込み速度は細胞あたりの取り込み速度を反映するものと考えられた。

上述の実験中に培地中の亜硝酸イオンを測定したところ、細胞を  $\text{CO}_2$  制限条件に移して3時間後から、培地中に亜硝酸イオンが蓄積し始め、12時間で  $330\ \mu\text{M}$  程蓄積することがわかった (図 5-1 C; 黒丸)。それに対し、高  $\text{CO}_2$  条件の細胞の培養液からは、全く亜硝酸を検出できなかった (図 5-1 C; 白丸)。窒素無添加あるいは、 $7.5\ \text{mM}$  のアンモニアを窒素源とする培養液では、 $\text{CO}_2$  制限条件下であっても亜硝酸イオンの蓄積は見られなかった (data not shown)。これらの結果から、 $\text{CO}_2$  制限下における亜硝酸イオンの培地中への蓄積は、硝酸イオンの亜硝酸イオンへの還元依存していることが示された。 $\text{CO}_2$  制限条件下の細胞は、細胞の  $\text{CO}_2$  供給量を制限しはじめてから4時間から12時間の8時間で  $1\ \text{mL}$  培養液あたり、 $1\ \mu\text{mol}$  の硝酸を取り込み、 $0.31\ \mu\text{mol}$  の亜硝酸を放出した (図 5-1 B, C)。つまり、硝酸の還元によって生じた亜硝酸の約 30 % が、培地中に放出されていた。グルタミン合成酵素の阻害によって、培地中に放出されることが知られているアンモニアは (Flores et al., 1983a)、 $\text{CO}_2$  の供給量に関わらず培地中に検出されなかった (data not shown)。これらの結果は、 $\text{CO}_2$  制限条件下で培養した *Synechococcus* sp. PCC7942 においては、亜硝酸還元過程が硝酸同化の速度を規定することを示している。

#### 5-2-2 硝酸還元酵素の局在性

上記の結果は、 $\text{CO}_2$  欠乏条件下では亜硝酸の還元が硝酸同化の律速段階になっていて、硝酸が細胞内に輸送され亜硝酸に還元された後、細胞外へ流出したと解釈することができる。これは、 $\text{CO}_2$  欠乏条件下において硝酸の細胞内への輸送が硝酸還元速度を律速するという定説とは相いれない。筆者が提唱した仮説が成り立つためには、硝酸の亜硝酸への還元が細胞内で起こっていることが前提となる。グラム陰性菌のなかにはペリプラズムに異化的硝酸還元に関わる NR を持つものがある (Siddiqui et al., 1993) ので、この点に注意して検討する必要がある。

*Synechococcus* sp. PCC7942 において、*narB* (Kuhlemeier et al., 1984, Andriesse et al., 1990, GenBank/EMBL/DDBJ, X74597) は、NR 活性の発現と硝酸



の同化に必要であること、ならびにこの遺伝子がコードするタンパク質が、*Klebsiella pneumoniae* の同化型 NR (Lin et al., 1993)あるいは、*Alcaligenes eutrophus* のペリプラズムの NR (Siddiqui et al., 1993) と相同性があることから、NR の構造遺伝子であると考えられている。また、*narB* の変異株は NR の活性が検出されないので、このラン藻では *narB* の産物が、唯一の硝酸還元酵素であると考えられている (Kuhlemeier et al., 1984)。さらに、低濃度の硝酸の同化には *nrt* 遺伝子にコードされた硝酸能動輸送系の関与が必要であるので、*narB* の産物が細胞質に局在していることは間違いない。しかしながら、これらはあくまでも、CO<sub>2</sub> 充足条件下で検証された結果であり、CO<sub>2</sub> 制限条件下で第2の NR がペリプラズムに誘導されている可能性は残されている。そこで、CO<sub>2</sub> 制限条件下においても、*narB* にコードされた NR が唯一の NR であるかどうかを確かめるために、我々は *narB* の変異株 ( $\Delta narB::kan^r$ ) を作製し、CO<sub>2</sub> 制限条件下での NR 活性を測定した。すると、その変異株においては、CO<sub>2</sub> 制限条件に移す前も後もいずれも NR の活性は検出されなかった。この結果は、CO<sub>2</sub> 制限条件下で培養した細胞で見られる亜硝酸の放出が、この条件下で新たに誘導されるペリプラズム局在性の NR によるものではないことを、証明するものである。したがって、CO<sub>2</sub> 制限条件下での培地中への亜硝酸イオンの蓄積は、細胞質で還元された亜硝酸が放出されることによると結論した。

### 5-2-3 細胞の生育、NR、NiR 活性と亜硝酸イオンの放出に及ぼす CO<sub>2</sub> 欠乏の影響

細胞を CO<sub>2</sub> 制限条件下におくと、細胞内での NR と NiR 活性の不均衡が生じ、培地中に亜硝酸が蓄積することが予想された。そこで、CO<sub>2</sub> 制限条件下で NR が活性化されるのかあるいは NiR が抑制されるのかを明らかにするため、細胞を様々な CO<sub>2</sub> 環境下で生育させ、細胞の増殖、亜硝酸の培地への蓄積、および NR、NiR 活性を測定した。図 5-2 A に CO<sub>2</sub> の供給と、*Synechococcus* sp. PCC 7942 の増殖の関係を示した。2% の CO<sub>2</sub> を含む空気を 2.2 L/h の流速で (CO<sub>2</sub> 流量 2 mmol/h) 通気すると、培養液のクロロフィル量と 730 nm の濁度は 17 時間で 170% に増加した (図 5-2 A)。0.1% の CO<sub>2</sub> を含む空気であっても、2.2 L/h 以上の流速で (CO<sub>2</sub> 流量 0.1 mmol/h 以上) 通気すると、高 CO<sub>2</sub> 条件と同程度のクロロフィル量と 730 nm の濁度増加が見られた。このことは、これらの通気量では細



胞の生育に十分な  $\text{CO}_2$  が供給されていたことを示している。これ以下の  $\text{CO}_2$  の通気では、細胞の増殖は抑制され (図 5-2 A)、そのとき培地中に亜硝酸イオンが蓄積した (図 5-2 C)。  $\text{CO}_2$  の制限により細胞の生育が抑制されている条件では、NR と NiR の活性は、  $\text{CO}_2$  充足条件下のおよそ 50 %、25 % にそれぞれ低下していた (図 5-2 B)。  $\text{CO}_2$  制限条件下での亜硝酸イオンの培地中への蓄積は、NiR の活性の低下が NR の活性の低下に比べて大きく、亜硝酸の生成と消費に関わる酵素活性に不均衡が生じていることが原因であろうと考えられた。

#### 5-2-4 $\text{CO}_2$ 制限条件下での NiR と NR の活性の変動

細胞を  $\text{CO}_2$  制限条件下においたときに、NiR 活性がいかなる機構で低下するのかを検討するため、高  $\text{CO}_2$  条件で培養した細胞を  $\text{CO}_2$  制限条件下に移したときの、NiR と NR の活性の経時的変化を測定した (図 5-3)。細胞を高  $\text{CO}_2$  条件の新しい培地へ移した場合は、NiR 活性は変化しなかった (図 5-3 A; 黒丸)。それに対し、  $\text{CO}_2$  制限条件下に移すと、NiR 活性は 0.5 時間後から減少し始め、3 時間後には最初のおよそ 50 % にまで低下した (図 5-3 A、図 5-4 A; 白丸)。高  $\text{CO}_2$  条件の細胞に転写阻害剤であるリファンピシン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を与えた場合の NiR 活性の低下は 3 時間で 15 % であり、リファンピシンの添加の場合の活性の低下に比べて、  $\text{CO}_2$  の欠乏条件下に置いた細胞での NiR 活性の低下の方が大きかった。筆者はこれまでの研究により、NiR をコードする *nirA* の転写産物は、細胞内で速やかに分解され、リファンピシンの添加後 20 分以内に完全に消失することを明らかにしている (Suzuki et al., 1993, 第 2 章)。それゆえ、  $\text{CO}_2$  の欠乏条件下での NiR 活性の低下は、*nirA* の mRNA のレベルの低下、あるいは、翻訳効率の低下によるのではなく、既に発現していた NiR 活性が  $\text{CO}_2$  供給量の制限によって不活性化されることによるものであることが示された。細胞を  $\text{CO}_2$  制限条件下に 3 時間おいても、NR の活性の低下は NiR 活性の低下に比べてより小さかった (図 5-3 A、図 5-4 A; 黒丸)。これらの結果から、  $\text{CO}_2$  制限条件下で NR と NiR の活性に不均衡が生じていると考えられた。

#### 5-2-5 無機炭素源の再添加による NiR 活性の増加

$\text{CO}_2$  制限条件下での NiR の不活性化が、可逆的な機構によるものかあるいは不可逆的のものかを明らかにするために、1.5 時間  $\text{CO}_2$  制限条件下において



NiR 活性を不活性化した細胞に、10 mM の炭酸水素ナトリウムの形で  $\text{CO}_2$  を補填して、NiR と NR の活性の変化を解析した (図 5-4)。無機炭素の添加後 1.5 時間で NiR 活性は、高  $\text{CO}_2$  条件で培養した細胞と同程度にまで回復し (図 5-4 A; 白丸)、NR 活性は高  $\text{CO}_2$  条件下の細胞の値の 120 % にまで増加した (図 5-4 B; 黒丸)。リファンピシンの添加は、NiR と NR のどちらの活性の上昇も阻害した (図 5-4 A,B; 白三角)。 *Synechococcus* sp. PCC7942 においては、NiR をコードする *nirA*、硝酸輸送体をコードする *nrtABCD* そして NR をコードする *narB* がオペロンを構成しているので (Suzuki et al., 1993, 第 2 章)、これらの結果は、 $\text{CO}_2$  の添加による NiR と NR の活性の増加には、*nirA* オペロンの転写の活性化と de novo のタンパク質合成が必要であることを示している。したがって、 $\text{CO}_2$  制限条件下での NiR の活性の低下は、酵素の不可逆的な不活性化によることが明らかにされた。

### 5-3. 考察

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 に近縁の *Synechococcus* sp. PCC6301 (*Anacystis nidulans*) (Rippka et al., 1979) では、 $\text{CO}_2$  の固定を阻害する DLG が (Stokes and Walker, 1972; Shelp and Calvin, 1984; Romero et al., 1985)、細胞の硝酸の取り込み活性を阻害することが報告されている (Lara et al., 1987)。したがって、ラン藻においては、 $\text{CO}_2$  制限の効果は硝酸の輸送過程を阻害するであろうと考えられてきた。しかしながら筆者は、 $\text{CO}_2$  の制限条件下で、NiR 活性の不活性化とそれにとまなう亜硝酸イオンの放出が起こることを示した。それ故に、硝酸同化系路に及ぼす  $\text{CO}_2$  制限の効果は、DLG の効果と異なっているといえる。 $\text{CO}_2$  制限条件下においた細胞に無機炭素を供給して NiR を活性化するには、*nirA* オペロンの転写が必要であることから、NiR の不活性化はおそらく酵素の分解をとまなう不可逆的な機構によると考えられる。 $\text{CO}_2$  供給状態の検知機構と NiR の不活性化の分子機構は、今後解明すべき問題である。また、NirB を欠きもともと NiR 活性が低下している細胞も  $\text{CO}_2$  供給量が減少すると、野生株と同様に NiR の低下が見られた (data not shown)。このことから、 $\text{CO}_2$  供給による NiR 活性の低下は、NirB の有無とは無関係であると考えられた。

高  $\text{CO}_2$  条件で生育した細胞を、 $\text{CO}_2$  制限条件下で 20 時間培養すると、培地中の亜硝酸イオン濃度は 400 から 700  $\mu\text{M}$  の間の定常値に達する (data not



shown)。この細胞を亜硝酸イオンを含まない新鮮な培地へ移すと、直ちに亜硝酸イオンの蓄積が観察され、20 時間後には再び定常値に達した。細胞を  $\text{CO}_2$  制限条件下で数世代培養を繰り返しても、新しい培地へ移す度に亜硝酸の蓄積が観察された (Suzuki et al., unpublished results) ことから、細胞を高  $\text{CO}_2$  条件から  $\text{CO}_2$  制限条件へ移した直後だけでなく、 $\text{CO}_2$  制限条件下で定常的に培養している細胞の硝酸同化系路も、亜硝酸の還元過程が律速していることが示された。また、培地中の亜硝酸濃度が定常値に達し、その蓄積が停止するのは、外液に亜硝酸イオンが蓄積したことにより、細胞内に取り込まれる亜硝酸と細胞から漏れだす亜硝酸が平衡に達し、その結果、亜硝酸濃度が一定の値に保たれていると考えられた。

高等植物において、 $\text{CO}_2$  の供給量の低下により組織中に高濃度の亜硝酸が蓄積する現象は知られていないが、光独立栄養的に生育する緑藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*) において、低  $\text{CO}_2$  条件で培地中に亜硝酸が蓄積されることが報告されている (Azuara and Aparicio, 1983; Krämer et al., 1988)。Synechococcus の NiR と高等植物の NiR はお互いに相同性が高いので (Luque et al., 1993, Suzuki et al., 1993)、緑藻の NiR もラン藻の NiR と相同と考えられる。このことから類推して、ラン藻と緑藻に共通の NiR の調節機構の存在を否定することはできない。しかしながら、これらの生物で  $\text{CO}_2$  制限により、NiR が制御されるかどうかは明らかにされていない。*Chlamydomonas reinhardtii* において観察された  $\text{CO}_2$  制限による亜硝酸の放出は、一義的には NR の活性化によるものであると説明されているが、NiR が制御される可能性は否定されていない (Azyara and Aparicio, 1983)。それに対して、*Chlorella fusca* においては、亜硝酸イオンの培地への蓄積と NR と NiR 活性との間に相関が見られない (Krämer et al., 1988)。しかしながら、*Chlorella* の細胞を  $\text{CO}_2$  制限下で長期間培養すると、NiR 活性が特異的に減少することが報告されている (Krämer et al., 1988)。真核光合成細胞において、NiR の制御が存在するか否かは興味深い。



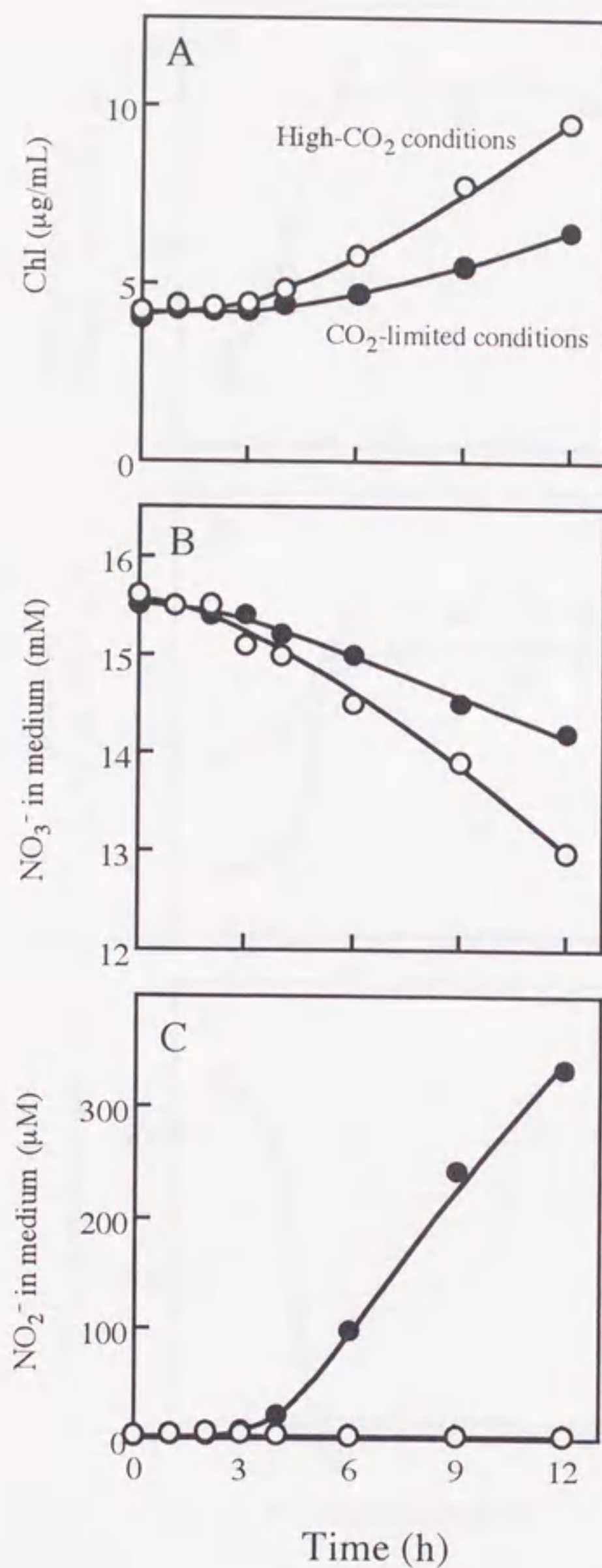


図 5-1. ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 を異なる CO<sub>2</sub> 条件で生育させた時の、クロロフィル量 (A)、培養液の硝酸濃度 (B)、亜硝酸濃度 (C)。

CO<sub>2</sub> 濃度を 2 % (v/v) に高めた空気を通じて培養した細胞を集め、時間 0 に新しい培地 50 mL に植菌し、2 % (v/v) CO<sub>2</sub> にした空気を 2.2 L/h (高 CO<sub>2</sub> 条件、白丸)、または、0.1 % (v/v) CO<sub>2</sub> にした空気を 0.6 L/h (低 CO<sub>2</sub> 条件、黒丸) を通気した。



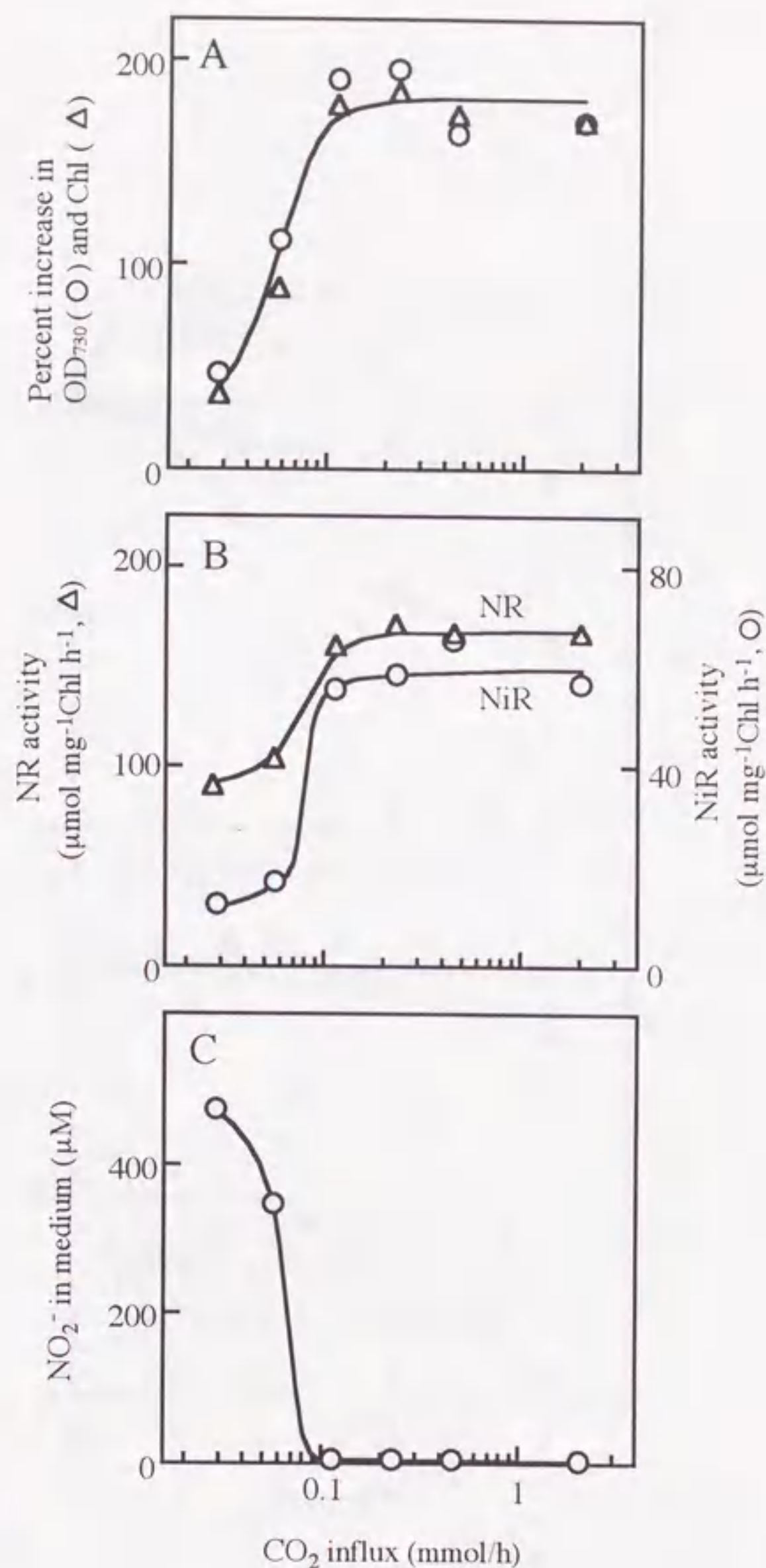


図 5-2. *Synechococcus* sp. PCC7942 の生育 (A)、NR、NiR 活性 (B)、培養液の亜硝酸濃度 (C) に及ぼす、CO<sub>2</sub> 供給量の影響。

高 CO<sub>2</sub> 条件で生育した細胞を新鮮な培地に移し、様々な CO<sub>2</sub> 供給量のもと 17 時間培養した。CO<sub>2</sub> 供給量は 50 mL の培養液あたり 1 時間に通気した CO<sub>2</sub> を mmol で表示した。A、クロロフィル量 (白三角) と 730 nm の濁度 (白丸) で表した 17 時間培養後の細胞の増加率 (%)。0 時間の細胞の濃度は、クロロフィル 2 μg/mL、OD<sub>730 nm</sub> 0.4 であった。B、様々な CO<sub>2</sub> 供給量のもとで 17 時間培養した後の NR (白三角)、NiR (白丸) 活性。NR、NiR 活性は、in vitro でジチオナイトで還元したメチルビオロゲン電子供与体として測定し、mg Chl あたり 1 時間での亜硝酸イオンの生成あるいは消費された μmole で示す。C、様々な CO<sub>2</sub> 供給量のもとで 17 時間培養後の細胞懸濁液中の亜硝酸イオン濃度。



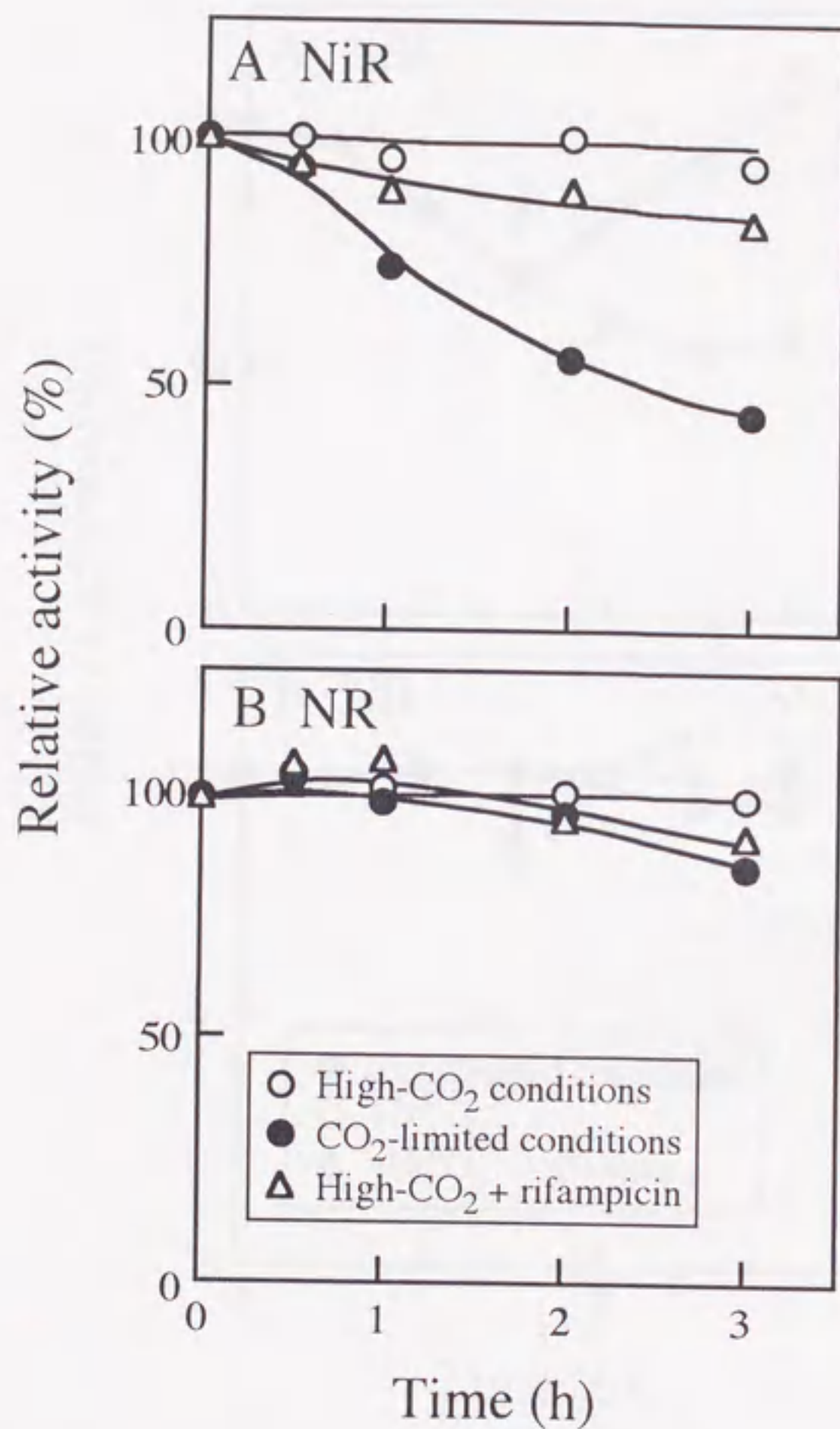


図 5-3. *Synechococcus* sp. PCC7942 の NiR (A)、NR (B) 活性に及ぼす CO<sub>2</sub> 制限の効果。

高 CO<sub>2</sub> 条件で培養した細胞を、0 時間に新しい培地に移した。CO<sub>2</sub> 制限条件下 (黒丸)、高 CO<sub>2</sub> 条件 (白丸)、50 µg/mL リファンピシン存在下で高 CO<sub>2</sub> 条件で生育し、NiR、NR 活性を測定した。各時間における NiR、NR 活性は、それぞれの 0 時間での値、110 µmol/mg Chl/h、200 µmol/mg Chl/h を 100 % として相対値で示した。



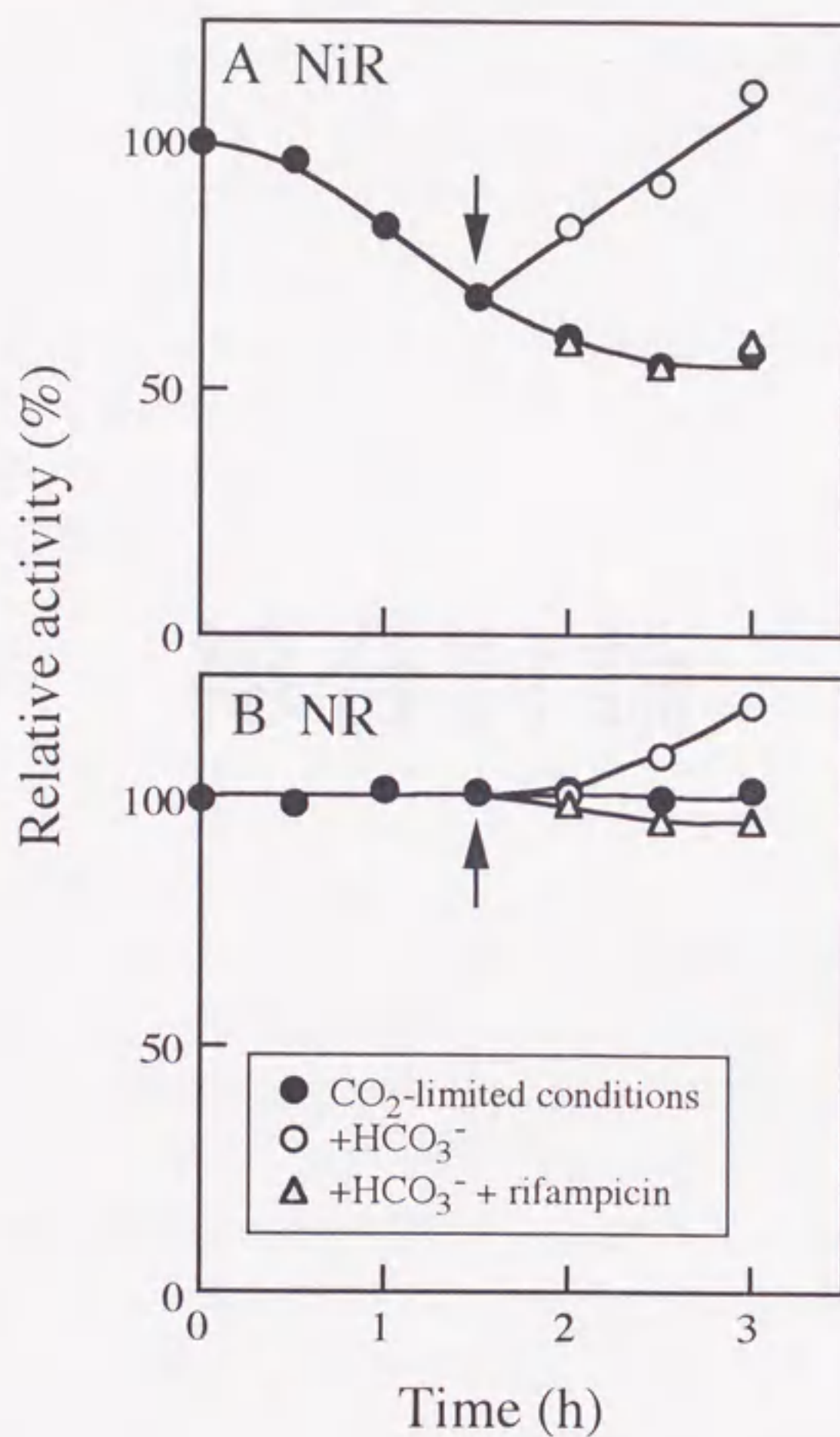


図 5-4. CO<sub>2</sub> 制限下においた細胞に対する CO<sub>2</sub> 添加の、NiR (A)、NR (B) 活性に及ぼす影響。

高 CO<sub>2</sub> 条件で培養した細胞を、0 時間に新しい培地に移した。1.5 時間 CO<sub>2</sub> 制限条件下においた後矢印の時点で、50 μg/mL リファンピシンの存在下 (白三角)、非存在下 (白丸) で 10 mM NaHCO<sub>3</sub> を添加した。引き続き低 CO<sub>2</sub> 条件下においたもの (黒丸) をコントロールとして示した。各時間における NiR、NR 活性は、それぞれの 0 時間での値、80 μmol/mg Chl/h、170 μmol/mg Chl/h を 100 % とし、相対値で示した。



## 総合討論



## 1. トウモロコシの $C_4$ 炭酸固定系酵素遺伝子発現の窒素による制御

トウモロコシなどの  $C_4$  植物の葉組織では、 $C_4$  回路と呼ばれる付属的な  $CO_2$  濃縮回路が存在し、そのキーエンザイムである  $C_4$  型フオスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ PEPC は、炭酸固定系路 (カルビン・ベンソン回路) の主要酵素 Rubisco とともに多量に存在するタンパク質のひとつである。このタンパク質は、投与する窒素源の量が増加すると他のタンパク質の増加に優先して蓄積する (Sugiharto et al., 1990)。また、PEPC タンパク質の増加は、トウモロコシの炭素固定能の増大をもたらすことが示されている (Sugiyama et al., 1984, Yamazaki et al., 1986)。これまでに、窒素による PEPC タンパク質の増加が、その mRNA の蓄積の窒素による誘導に起因することが示されている。また、この mRNA の蓄積には Gln と サイトカイニンが必要であることが明らかにされている。筆者は本論文で、1) サイトカイニンの効果が *C4ppc1* 遺伝子の転写を特異的に活性化すること、2) 窒素が同化されて生じたグルタミン (Gln) あるいはその下流の代謝産物は *C4ppc1* の mRNA の安定性を高めるのに寄与するであろうこと、3) サイトカイニンによる *C4ppc1* 遺伝子の転写の活性化には新たなタンパク質の合成が必要であること、を明らかにした (第 1 章)。この現象は、窒素同化量が炭素固定系の遺伝子の発現を制御する一例である。炭素同化系遺伝子 PEPC, PPDK, Rubisco の発現は、窒素だけでなく炭素同化産物の蓄積によっても影響を受け、抑制されることが知られている (Sheen, 1993)。それに対して、高等植物の硝酸還元酵素 (NR)、亜硝酸還元酵素 (NiR) の発現は、まず基質である硝酸の存在によって誘導され、その同化産物である Gln の蓄積により著しく抑制されることが知られている (Deng et al., 1991)。また、その発現は炭素の同化産物の供給によって活性化されることが、明らかにされている (Cheng et al., 1992, Vincentz et al., 1993)。これらの現象を総合的に解釈すると、炭素固定系遺伝子と窒素同化系遺伝子の発現は炭素固定産物あるいは、窒素同化産物量をシグナルとしてそれぞれ反対の方向に制御される。すなわち、窒素同化産物の蓄積によって炭素固定系を活性化するとともに窒素同化系を抑制し、炭素同化産物の蓄積が炭素固定系を抑制し、窒素同化系を活性化する機構の存在が予想される。また、NR, NiR の転写産物の蓄積は、*C4ppc1* に対して効果のあったサイトカイニンの投与によっても、誘導されることが報告されている (Lu et al., 1990, 1992)。サイトカイニンがどのように炭素代謝系と窒素代謝系の遺伝子を制御するかは今後解析されるべき研究課題であるが、サイトカ



イニンに対して不感受性のアラビドプシスの変異株のなかには、炭素代謝と窒素代謝のバランスが影響を受ける事例が知られており (Faure et al., 1994)、その変異の解析からサイトカイニンと代謝との関わりが明らかにされるかもしれない。

サイトカイニンが、細胞分裂の促進や葉の成長促進などの生物活性を示すこと、および根で合成されて葉に輸送されるサイトカイニン量が窒素源の投与によって増加することなどが、古くから知られていた (Feldman, 1975)。近年では、サイトカイニンによる植物遺伝子の発現誘導に関する情報の蓄積は多いが (Lerbs et al., 1984, Funckes-Shippy and Levine, 1985, Flores and Tobin, 1986, 1989)、サイトカイニンの代謝に関する分子レベルでの解析はあまり進んでいない。例えば、サイトカイニンの合成と輸送はどのように行われ、それらは窒素栄養状態に応じていかに調節されているのか。また、葉組織でのサイトカイニンの受容とシグナルの伝達にはどのような機構が存在するのかなど、未同定の部分がほとんどである。これらの経路の解析が、サイトカイニンによる遺伝子発現制御機構の解明には必要であると思われる。

## 2. ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の *nirA* オペロンの発現調節機構

著者らはラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の硝酸利用系遺伝子の発現の窒素による制御様式を解析し、硝酸の取り込みと還元に関与する 6 つの遺伝子がオペロン (*nirA* オペロン) を構成していること (第 2 章)、またそれらの窒素代謝系のオペロンの発現を抑制すると同時に、炭素代謝系のキーエンザイム Rubisco をコードするオペロンの発現を活性化できる代謝化合物を同定した (第 3 章)。この化合物は、Gln からアミド基転移を受けて合成されるカルバミルリン酸 (CP) が分解されて生じるシアン酸であった。また *nirA* オペロンの上流に位置し、*nirA* オペロンと同様窒素により発現制御を受ける新規オペロンの存在を明らかにし、亜硝酸の還元酵素の活性発現に関わる遺伝子を見出した (第 4 章)。

炭素代謝と窒素の同化の効率の制御機構に関する研究は、大腸菌などの腸内細菌で詳細に解析されている (Magasanik, 1988)。窒素同化量の増加により 2-OG に対する Gln の量比が増大すると、アロステリックな変化を介してウリジルトランスフェラーゼが不活性化し、 $P_{II}$  タンパク質が脱ウリジル化される。 $P_{II}$  の脱修飾は、二成分情報伝達系 (NtrB/NtrC) により GS 遺伝子などの窒素同化系遺伝子の転写を不活性化すると同時に、GS 分子のアデニル化を促進し活性を抑制すると



いう転写調節と翻訳後調節の2つのカスケード系によって制御されている。それに対し、ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC6301 ではアミノ酸の蓄積量と硝酸同化系の発現との間に明確な相関が見出されていない (Coronil and Lara, 1991)。ラン藻においても  $P_{II}$  と相同なタンパク質が同定されているけれども、窒素同化系の制御に関わっている直接的証拠は得られていない (Tsinoremas et al., 1991)。また、ラン藻の GS 活性はアデニル化によって調節を受けていない (Mérida et al., 1991)。これらのことからラン藻において腸内細菌と同一のシステムが機能しているとは考えにくかった。

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞が窒素充足条件下に置かれると、アンモニアの Gln への固定が増加し、細胞内の Gln のプールが増大する。その結果、Gln からのアミド基転移によって合成される CP のプールが増加し、それにつれて CP が分解して生じるシアン酸が蓄積し、*nirA* オペロンの転写が抑制されると考えられる。そこで、シアン酸のシグナルがどのようにして、窒素同化系遺伝子の転写を抑制するかを解明することが今後の課題である。ラン藻の窒素同化系遺伝子は転写調節因子 NtcA によって活性化される。NtcA による窒素同化系遺伝子の転写の活性化をシアン酸が直接抑制するのか、あるいは NtcA とは別に *nirA* オペロンの抑制に関わる因子が存在し、シアン酸によりその抑制効果が誘導されるのかは明らかではない。また、*Synechococcus* sp. PCC7942 ではシアン酸による *rbcL* の活性化に NtcA は関与していないと考えられるので (第3章)、*rbcL* の調節機構についても明らかにする必要がある。筆者はまた、NtcA により誘導されるタンパク質で LysR 型転写制御因子と推定される NtcB を見出した (第4章)。NtcB は、何らかの遺伝子の転写を制御することによって生合成経路の活性を調節し、細胞の窒素代謝系の均衡を保持していると思われる。NtcB により制御される遺伝子の機能の解析が、一連の窒素同化系の制御機構の解析に新しい視点を提供する可能性がある。

シアン酸は細胞内あるいは生理的条件下において、CP または尿素の非酵素的分解によって生じる (Allen and Jones, 1964)。CP はアルギニンとピリミジンの生合成の中間代謝産物である。CP を生成する酵素、カルバミルリン酸合成酵素はアロステリック酵素として詳細に研究されている酵素で、CP が代謝されて生じる UMP によって阻害され、アルギニン合成経路の基質であるオルニチンによって活性化される。また、多くの酵素の活性はシアン酸によって阻害を受けるが、特にカルバミルリン酸合成酵素はシアン酸に対して感受性が高く、過剰な CP の生成



はシアン酸を通して酵素活性を抑制すると考えられる (Anderson et al., 1973, Anderson and Carlson, 1975)。このように、細胞内の CP の蓄積量はその代謝産物あるいは分解物によって絶妙に調節されていると考えられる。したがって、CP の分解物であるシアン酸の蓄積量も CP の蓄積量につれて精密に制御されていると思われる。このように通常の生育条件下では、その蓄積量が比較的安定しているが、代謝のバランスが変化したときに一時的にレベルが変動するような化合物はシグナル物質としての条件を備えていると思われる。

また、シアン酸は反応性の高い化合物で、タンパク質のアミノ基、メルカプト基、カルボキシル基、イミダゾール基、フェノール性水酸基を非特異的にカルバミル化することが可能である (Stark, 1964, 1965)。この修飾のうち、アミノ基に対するものは不可逆的であるが、その他の官能基に対する修飾は可逆的である。pH が中性付近ではメルカプト基に対する反応性が高く、細胞内においてはタンパク質のシステインのメルカプト基と S-カルバミル基を形成して結合していると言われている (Stark, 1964, 1965, Konishi and Imanari, 1987)。細胞がシアン酸をシグナルとしてどのように検知しているかを考えた場合、上記のシアン酸の性質は都合がよいと考えられる。たとえば、シアン酸シグナル検知タンパク質が存在し、このタンパク質の特定の残基は低濃度のシアン酸によって修飾されシグナルを検知し、シアン酸の減少によって何らかの機構によりカルバミル化された残基が解放されると、シグナルは消去されるというモデルを想定することができる。

シアン酸の投与は鎌状赤血球貧血症のヘモグロビンの酸素に対する低い親和性を改善したり、酸素非結合型のヘモグロビンの凝集を阻害する (Cerami et al., 1973)。また、タンパク質合成を阻害することによって、ある種のガン細胞の増殖を抑制することも知られている (Allfrey et al., 1977)。けれどもシアン酸は潜在的にどの細胞においても生成し、タンパク質と容易に反応して変性させることから、細胞にとって有毒である。シアン酸の代謝はこれまで大腸菌などの腸内細菌で主に研究され (Taussig, 1960, Anderson, 1980, Guilloton and Karst, 1987, Kunz and Nagappan, 1989, Anderson et al., 1990)、シアン酸加水分解酵素、シアナーゼの活性が培地中のシアン酸によって誘導されることが明らかにされている。シアナーゼの発現はシアン酸の毒性を軽減するが全ての細菌がその活性を有するわけではなく、シアナーゼの生理的意義は明らかではなかった (Anderson et al., 1990)。最近になって、ラン藻 *Synechococcus* sp. UTEX625 においてシアナーゼの活性が検出され、培地中のシアン酸の有無に関わらず構成的に発現していることが示された



(Miller and Espie, 1994)。我々が研究材料としてきたラン藻 *Synechococcus* sp. PCC7942 においても十分に高いシアナーゼ活性が検出され、その活性は窒素充足条件で低く、窒素制限条件では約2倍ほど高い活性を示した (Suzuki et al., unpublished results)。これらのことはラン藻においてもシアン酸が生成する状況があることを示すとともに、シグナルの消去系を細胞が有していることになり、シアン酸をシグナルの候補と仮定する一つの根拠にもなると思われた。さらに興味深いことに、最近大腸菌のシアナーゼと相同なアミノ酸配列をコードする cDNA が、アラビドプシス cDNA のランダムシーケンス解析により同定され、データベースに登録された (Philipps and Giot, unpublished results, EMBL/Genbank/DDBJ, Z34747, Z33938)。シアナーゼの遺伝子がクローニングされていたのは大腸菌のみであり、それ以外の生物からの報告は初めてのことである。このことは、植物にもシアナーゼが存在することを示しており、ラン藻で発見されたシアン酸による調節機構が高等植物にも存在している可能性を示唆するものである。高等植物における、グルタミンあるいはその下流の代謝産物による、炭素同化系遺伝子の活性化、窒素同化系遺伝子の抑制にラン藻の場合と同様に、シアン酸が機能しているかどうかは大変興味深い課題である。高等植物の緑葉では、カルバミルリン酸合成酵素の活性の大部分は葉緑体に局在していると言われている (Shibata et al., 1986, Anderson and Beardell, 1991)。したがって、シアン酸も多くは葉緑体で生成すると考えられ、それがシグナルとして核コードの遺伝子に作用するためには、さらに複雑なシグナル伝達機構を想定する必要がある。そこで、ラン藻におけるシアン酸シグナルの検知と伝達機構を解明することが、高等植物におけるシグナル伝達機構解明の糸口となると考えられる。

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 における炭素代謝と窒素代謝の調節は、硝酸同化系遺伝子の転写段階だけでなく硝酸同化系酵素の翻訳後の過程においても見出された。具体的には、CO<sub>2</sub> 制限条件下で生育したラン藻においては、NiR の活性が不可逆的に減少することを明らかにした (第5章)。ラン藻 *Anabaena cylindrica* において、CO<sub>2</sub> の供給量の低下は、窒素同化量が制限された細胞にアンモニアを与えたのと同様に、細胞内の Glu 量を減少させ、Gln と Cit の量を増加させることが報告されている (Ohmori and Ohmori, 1990)。CO<sub>2</sub> の欠乏はおそらく 2-OG の供給を減少し、GOGAT による Glu の再生が制限されることにより Gln を蓄積する。また、Cit の蓄積は Gln からのカルバミルリン酸の合成が増加していることを意味し、おそらくシアン酸の蓄積も増加していると考えられる。し



たがって、以前から報告されている  $\text{CO}_2$  固定量の減少による細胞内への硝酸イオンの能動輸送の活性の抑制あるいは、著者が明らかにした NiR の抑制にもシアン酸の関与の可能性が考えられ大変興味深い。大腸菌などに存在する窒素同化の制御系で知られている様に、転写段階と酵素の翻訳後の制御が同一のシグナル検知機構で認識される可能性は十分にあると思われる。ラン藻の NiR は高等植物の NiR と相同性が高く、反応性も類似しているが、高等植物の NiR には  $\text{CO}_2$  供給量による活性の制御は知られていない。しかしながら、高等植物では  $\text{CO}_2$  供給量の低下にともなって、NR が翻訳後調節を受ける (Aslam et al., 1979, Kaiser and Förster 1989, Pace et al., 1990)。高等植物の NR の活性調節機構は、明暗あるいは  $\text{CO}_2$  固定量の変動によって酵素のリン酸化を介して行われる (Huber et al., 1992a, Huber et al., 1992b, Kaiser and Brendle-Behnisch, 1991, Kaiser et al., 1992)。予備的な結果ながら酵素の分解をとまなうと考えられているラン藻の NiR の活性の抑制とは仕組みが異なっていると予想される (Aichi et al., unpublished results)。



## 材料及び方法



### トウモロコシ幼植物の生育

トウモロコシ (*Zea mays* L. cv Golden Cross Bantam T51) は、Sugiharto et al. (1992a)の方法に基づき、明期 14 時間、暗期 10 時間、温度 28/20 °C (明期/暗期)、湿度 60 % 以上、500  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度に制御された人工気象機内で生育した。バーミキュライトを担体として栽培し、窒素欠乏植物には 0.8 mM、窒素充足植物には 16 mM の硝酸カリウムを窒素源として含む Arnon and Hoagland (1940) の培養液を与えた。播種後およそ 2 週間窒素欠乏条件下で生育し、第 3 葉が完全に展開した時点で、16 mM 硝酸カリウムを含む培養液に転換した。培養液の転換は明期の中間の時間、つまり明期に入ってから 7 時間後に行った。経時的に第 3 葉を切り取り、基部側の組織半分を液体窒素で凍結し保存した。窒素欠乏からの回復過程で  $\text{C}_4$  PEPC はこの葉の基部の部分で優先的に蓄積することがわかっている (Sugiharto et al., 1990)。窒素欠乏からの回復過程における *C4ppc1* 遺伝子の転写の活性化に及ぼす、窒素源、サイトカイニン、シクロヘキシミドの効果を調べるためには、切り取り葉の系を用いた (Sugiharto et al., 1992a, 1992b)。窒素欠乏条件下で生育して第 3 葉が完全に展開した時点で、第 3 葉を付け根から切りはなした。0.8 mM または 16 mM の硝酸カリウムを窒素源とする Arnon and Hoagland (1940) の培養液に立て、人工気象機内で一定時間静置し、葉の基部のみを材料として収穫し、すばやく液体窒素で凍結し保存した。サイトカイニン、シクロヘキシミドはそれぞれ 5  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で用いた。

### グルタミンの定量

グルタミンの含有量は以前の報告に従い、凍結組織から冷エタノールで抽出し、*o*-フタルアルデヒドで処理後、HPLC で分析した (Sugiharto and Sugiyama, 1992)。

### PEPC mRNA の定量

凍結した組織から、グアニジウム・チオシアネート法により全 RNA を抽出した (Sugiharto et al., 1992a)。全 RNA を Hybond N+ (Amersham) にドットブロットし、トウモロコシ *C4ppc1* cDNA (pM52, Izui et al., 1986) の 1.3 kb の *EcoRI* 断片をプローブとして用い、Sugiharto et al. (1992) の方法に従ってハイブリダイゼーションを行い *C4ppc1* の転写産物を定量した。 $\text{C}_3$  型 PEPC をコードする



mRNA の定量には、poly A<sup>+</sup>-RNAを用い、ソルガム *C3ppc1* (CP21, Crétin et al., 1991) の 3' 非翻訳領域の 0.12 kb の *RsaI*-*HindIII* 断片をプローブとして行った。

### 核の単離

Luthe and Quatrano (1980) の方法に基づき、葉組織から核を単離した。凍結した葉の基部を液体窒素中で破碎し、NIB (nuclear isolation buffer; 1 M hexylene glycol, 10 mM PIPES-KOH [pH 7.0], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5% [v/v] Triton X-100) に浸潤し、中速回転のポリトロンで 20 秒間攪拌した。130  $\mu$ m のメッシュでの濾過した後、2 枚重ねたミラクロスを通した。濾液を 2000 g で 10 分間遠心して得た沈殿を NIB で 2 回洗浄し、さらに Triton X-100 を含まない NIB で 1 回洗浄し、粗核画分を得た。この画分を Triton X-100 を含まない NIB に懸濁し、パーコール不連続密度勾配遠心 (40 % パーコール-95 % パーコール- sucrose cushion) によって分画した。40 %-95 % パーコールの境界面に分画された核を精製核画分として回収し、nuclear resuspension buffer (1M hexylene glycol, 10 mM PIPES-KOH [pH 7.0], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 25% [v/v] glycerol) で 2 回洗浄し、-80 °C で保存した。

### 単離核による run-off 転写活性の測定

単離核における in vitro RNA 合成活性 (RNA の伸長反応) は、以下の組成の反応液を用いて行い (Gallager and Ellis, 1982: 20 mM Tris-Cl [pH 7.9], 75 mM KCl, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATP, CTP, GTP, 5 mM DTT, 0.5 unit RNase inhibitor [RNasin, Toyobo], 100  $\mu$ Ci [ $\alpha$  <sup>32</sup>P] UTP [3000Ci/mmol, Amersham], 単離核 [200  $\mu$ g DNA/mL 反応液]), 30 °C で 20 分間反応させた。in vitro で合成した RNA を精製し、以下の cDNA を含むプラスミドに対してハイブリダイズさせた。*C4ppc1* (pM52, Izui et al., 1986)、GS1、GS2 (pGS107, pGS202, Sakakibara et al., 1992b)、Fd-GOGAT (pFDGGT, Sakakibara, 1991)、rRNA (VER17, Yukura and Tanifuji, 1983) の cDNA を挿入されたプラスミド 0.18 pmol を、それぞれ単一の制限酵素サイトで切断し、Hybond N+ にドットプロットした。pUC18 または pUC19 を同様に処理しコントロールとした。膜の放射活性は、オートラジオグラフィーにより検出した後、各ドットを切り出し液体シンチレーションカウンターで測定し



た。様々な条件の植物における遺伝子の転写活性を測定するために、一連の実験においては、ハイブリダイゼーションに用いる *in vitro* 転写産物の放射活性を一定にして行った。ハイブリダイズに用いる放射活性と *C4ppc1* cDNA とハイブリダイズする放射活性との間には、少なくとも  $1 \times 10^7$  から  $1.25 \times 10^8$  cpm/mL ハイブリダイズ溶液の範囲で、定量性があることを確認しており、全ての実験はこの範囲内で行った。

### ラン藻の培養

*Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞は、白色蛍光灯による  $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  の連続光照射下で光独立栄養的に生育した。生育温度は特に記述しない限り  $30^\circ\text{C}$  である。基本培地は、BG11 (Stainer et al., 1977) の  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 、クエン酸アンモニウム鉄を、それぞれ、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、クエン酸鉄に置き換えて作った無窒素培地を用いた。基本培地に、 $3.75 \text{ mM}$  の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $15 \text{ mM}$  の  $\text{KNO}_3$ 、あるいは、 $5 \text{ mM}$  の  $\text{NaNO}_2$  を添加し、様々な窒素源の培地を作製した。いずれの培地も、 $20 \text{ mM}$  の HEPES-KOH (pH8.0) で緩衝し、固形培地には  $1.5\%$  アガーを加えた。液体培地には通常  $50 \text{ mL}$  の培養液に対し  $2.2 \text{ L/h}$  の通気量で、 $2\%$   $\text{CO}_2/98\%$  空気の混合気を通気した、いわゆる高  $\text{CO}_2$  条件で培養した。硝酸同化系の遺伝子群を誘導するためには、 $3.75 \text{ mM}$  の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を窒素源として生育し、対数増殖期にある細胞を  $25^\circ\text{C}$ 、 $3500 g$  で  $5$  分間遠心分離し集めた。その細胞を無窒素培地で  $2$  回洗浄し、新しい硝酸培地に植えついだ。グルタミン合成酵素、グルタミンアミド基転移酵素を阻害するためには、それぞれ  $10 \mu\text{M}$  MSX,  $150 \mu\text{M}$  DON を培地に添加した。*nirA* オペロンの調節の代謝シグナルを同定するためには、

*Synechococcus* sp. PCC7942 の変異株 M45 を  $30 \text{ mM}$  の  $\text{KNO}_3$  で生育し、その培養液に、 $3.75 \text{ mM}$  の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $15 \text{ mM}$  の L-Gln、L-Glu モノナトリウム塩、L-Asn、 $10 \text{ mM}$  の PABA、Ant、Gluc6P ナトリウム塩、 $1 \text{ mM}$  の CP リチウム塩、シアン酸カリウムをそれぞれ添加し、以後経時的に細胞を集めた。上記の条件での化合物の培養液への添加は、その pH を変化させないことを確認した。シグナル物質と MSX を競合させるためには、 $30 \text{ mM}$  で生育している M45 に  $100 \mu\text{M}$  の MSX の存在下と非存在下で  $1 \text{ mM}$  の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $2 \text{ mM}$  の CP リチウム塩、シアン酸カリウムをそれぞれ添加し、 $15$  分後に細胞を回収した。細胞の  $\text{CO}_2$  制限条件への移行は以下のように行った。高  $\text{CO}_2$  条件で培養した細胞を、対数増殖期に



25 °C, 3500 g で 5 分間遠心分離し集めた。細胞を培養液で 2 回洗浄し、径 3 cm x 長さ 20 cm の試験管に入れた 50 mL の新しい培地に植菌した。CO<sub>2</sub> 供給量が 27 μmol/h となるように、0.1 % の CO<sub>2</sub> を含む空気を 0.6 L/h の速度で通気した。硫酸カナマイシンを添加する場合は、10 μg/mL の濃度で培地に添加した。

### 大腸菌の培養

プラスミドと M13 ファージのそれぞれの宿主に用いた大腸菌株、DH5α (Bethesda Research Laboratories) と JM 105 は、必要に応じて 50 μg/mL のアンピシリンナトリウムまたは、50 μg/mL の硫酸カナマイシンを添加した LB 培地で生育した。プラスミドの調製は常法に従って行った (Sambrook et al., 1989)。

### クローニングと DNA 塩基配列の解析

*nirA* 遺伝子のコード領域の 3' 側約 80 % を含む 5.4 kbp の *SphI*-*SaII* 断片は、*Synechococcus* sp. PCC7942 の挿入変異株 M45 からクローニングした (Omata, 1991)。5' 側の残りの領域は、以下に示すように薬剤耐性遺伝子の挿入による、標識法によりクローニングした。前記の 5.4 kbp の *SphI*-*SaII* 断片より、1.1 kb, *EcoRI*-*PstI* 断片を pUC119 (Vieira and Messing, 1987) にサブクローンし、pTO4 を作製した (図 2-1)。Tn903 由来のカナマイシン耐性遺伝子を、pTO4 の 1.1 kb 断片中の *SacI* サイトに *nirA* の転写方向と反対に挿入し、pTO5 を作製した。得られたプラスミドを *Synechococcus* sp. PCC7942 に導入し、ゲノム DNA との相同組み替えによりカナマイシン耐性となる株を選別した (Williams and Szalay, 1983)。N1 と名付けたこの形質転換体は、カナマイシン耐性遺伝子を *nirA* の *SacI* サイトに挿入された形で保持していた。N1 株から Williams (1988) の方法により染色体 DNA を抽出精製し、*Bam*HI で消化後、pUC119 にライゲートした。そのプラスミドを大腸菌 DH5α 株形質転換し、アンピシリンとカナマイシンに耐性を示す株選別した。この大腸菌の持つプラスミドから、*SacI* サイトにカナマイシン耐性遺伝子が挿入された *nirA* 遺伝子を含む 4 kb の *Bam*HI 断片を回収した (図 2-1; pTO5)。さらに上流の DNA をクローニングするために、*Synechococcus* sp. PCC7942 の DNA を *EcoRI*-*SacI* で切断し、pUC19 に構築したライブラリーを、*nirA* の上流側を含む 0.5 kb の *Bam*HI-*EcoRI* 断片をプローブに用いてスクリーニ



ングし、3.0 kb の *EcoRI*-*SacI* 断片を単離した (図 4-1; pNH9)。ヌクレオチド配列の決定には種々の制限酵素断片を pUC119 または、M13 mp18/19 にサブクローンし、エキソヌクレアーゼ III/マングベーンヌクレアーゼ を用いて適当に欠失させ (Sambrook et al., 1989)、Kraft et al の方法 (1988) で調整した 2 本鎖プラスミドまたは、Vieira and Messing (1987) の方法で M13 ファージから調製した 1 本鎖 DNA を鋳型として、蛍光ラベルしたプライマー (Prober et al, 1987) を用いてジデオキシチェインターミネーション法 (Sanger et al, 1977) により塩基配列を決定した。データベースの検索は、BLAST プログラムを用いた (Altschul et al., 1990)。塩基配列から推定したアミノ酸配列の、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造の推定は、Dodd and Egan (1990) に方法に従った。

### RNA の精製とノーザン解析

Aiba らの方法 (1981) により、*Synechococcus* sp. PCC7942 の細胞から全 RNA を抽出精製した。10  $\mu$ g の RNA をホルムアルデヒドで変性させ、ホルムアルデヒドを含む 1.2 % アガロースゲルで展開した。Hybond N+ (Amersham) に転写し、Church and Gilbert (1984) の方法により、以下に示すそれぞれの遺伝子の特異プローブと、ハイブリダイズした。230 bp の *nirA* 断片 (図 2-1; プローブ 1)、あるいは *nirA* のコード領域 +1 から +20 の相補鎖に対応するオリゴヌクレオチド (GTAGCGGTGGCTTGAGCCAT) (図 2-1; プローブ 7)、*nrtA* の 410 bp の *Bam*HI-*Sac*I 断片 (図 2-1; プローブ 2)、500 bp の *nrtB* 断片 (図 2-1; プローブ 3)、470 bp の *nrtC* 断片 (図 2-1; プローブ 4)、410 bp の *nrtD* 断片 (図 2-1; プローブ 5)、*narB* のコード領域 -3 ~ +15 ヌクレオチドと相補的な 18-mer のオリゴヌクレオチド (CGAGAGATCGAACATTCC) (図 2-1; プローブ 6)、530 bp の *nirB* 断片 (図 4-1; プローブ 1)、510 bp の *ntcB* 断片 (図 4-1; プローブ 2)。ハイブリダイズ実験のコントロールとして、PSII 反応中心の D1 タンパク質をコードする 3 つの *psbA* 遺伝子 (*psbAI*, *II*, *III*) の転写産物のいずれも認識できる、*psbAI* の 1.5 kb の *Sal*I-*Bam*HI 断片 (Golden et al., 1986) を用いた。*rbcL* の転写産物の定量のためには、*Synechococcus* sp. PCC6301 の 1.5 kb の *Bam*HI/*Pst*I 断片を (Shinozaki and sugiura, 1985)、*glnA* の転写産物の検出のためには、*Synechococcus* sp. PCC7942 の 290 bp の DNA 断片 (Cohen-kupiec et al., 1993) をプローブとした。二本鎖 DNA は、Feinberg and Vogelstein (1983) の方法に従って、 $^{32}$ P でラベルし、オリゴヌクレ



オチドは  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と  $\text{T}_4$  ポリヌクレオチドキナーゼによってラベルした。ハイブリダイズしたシグナルは、X線フィルムのオートラジオグラフィーまたは、バイオイメージアナライザー (Fuji Photo Film) で検出した。転写産物蓄積量の変化は、上記の特異プローブを用いたドットブロット法により測定した。変性した全 RNA を 0.5, 1, 2  $\mu\text{g}$  となるように、ドットブロット装置を用いて Hybond N+ にブロットした。それぞれの遺伝子の特異プローブとハイブリダイズした後、各ドットの放射活性はバイオイメージアナライザー (Fuji Photo Film) で検出した。

### S1 マッピング

*nirA* の転写開始点を決定するために、pTO5 から *nirA* コード領域 -173 ~ +208 に相当する *EcoRI* 断片を、pUC19 にサブクローンした (図 2-1)。挿入した *nirA* 断片の上流側にある *BamHI* サイトでプラスミドを直鎖上にし、それを鋳型として、*nirA* コード領域の +1 から +20 の相補鎖に対応するオリゴヌクレオチド (プローブ 7) をプライマーとする単一プライマー PCR を行い、1 本鎖 DNA を合成した。*nirB* の転写開始点の決定には、pTO5 から *nirB* の 5' 領域とその上流領域を含む 0.9 kb の *BamHI*-*PstI* 断片を切り出し、pUC19 にサブクローンした。このプラスミドを、*nirB* の翻訳開始点の -290 bp 上流の *NcoI* サイト (図 4-1; ヌクレオチド 28) で切断した。*NcoI* サイトで切断したプラスミドを鋳型とし、*nirB* の +2 から +20 の相補鎖に相当するオリゴヌクレオチドをプライマーとして単一プライマー PCR を行った。増幅されたそれぞれの一本鎖 DNA を、1.5 % アガロースゲル電気泳動により精製し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と  $\text{T}_4$  ポリヌクレオチドキナーゼを用いてラベルした。標識した 1 本鎖 DNA (10 ng,  $3 \times 10^6$  cpm) を、*nirA* 転写開始点の決定のためには、*Synechococcus* sp. PCC7942 全 RNA 10  $\mu\text{g}$  と、*nirB* 転写開始点決定のためには RNA 40  $\mu\text{g}$  とハイブリダイズし、プロトコール (Sambrook et al, 1990) に従い S1 ヌクレアーゼで消化した。それぞれの単一プライマー PCR を行った、プラスミドとプライマーを用いたシーケンス反応を行い、サイズマーカーとして同一の 6 % ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し、S1 ヌクレアーゼ消化から保護された DNA 断片の長さを決定した。



## 挿入変異株の作製

*nirB* の変異株の作製のために、pNH9 を *Hind*III で限定分解し、Tn5 (Beck et al., 1982) 由来の *kan*<sup>r</sup> を C.K1 (Elhai and Walk, 1988) から切り出し、*nirB* の *Hind*III サイトに挿入したプラスミドを作製した。*ntcB* の変異株の作製のためには、2種の欠失変異を導入した pNH9 から、この遺伝子の 5' 領域とその外側の領域を含む断片 (図 4-2; ヌクレオチド 585-1553) と、3' 領域とその外側の領域を含む断片 (図 4-2; ヌクレオチド 2090-*Sac*I サイトまで) を切り出し、同一のプラスミド上にその間に *Kpn*I サイトができるように連結した。Tn903 (Oka et al., 1981) 由来の *Kan*<sup>r</sup> を pUC4K (Vieira and Messing, 1982) から切り出し、*ntcB* の一部を含む前記のプラスミドの *Kpn*I サイトに挿入した。このプラスミドは、*ntcB* の内部の 536 bp (図 4-2; ヌクレオチド 1554-2089) を薬剤耐性遺伝子によって置換されている。*ntcA* (Vega-Palas, et al., 1992) の変異株の作製のためには、まず翻訳開始点から +82 から +577 塩基までの 496 bp を PCR によって増幅し、得られた断片を *Bam*HI-*Hind*III で消化した。403 bp の *Bam*HI-*Hind*III 断片を pUC19 にクローニングし、*ntcA* 中の 2 つの *Pst*I サイトに pUC4K 由来の *Kan*<sup>r</sup> を挿入した。*narB* を破壊するためには、まず、*nrtD* の 3' 側 (コード領域の +235-+825) と *narB* の 5' 側 (コード領域の +1-+1166) と *nrtD* と *narB* の間の領域 197 塩基を含むプラスミド pTO1 (Omata et al., 1993) の、2.0 kbp の *Xba*I-*Eco*RI 断片を pUC19 にサブクローンし、pTO6 を作製した。*narB* の翻訳開始点から -155-+522 塩基までに相当する pTO6 中の二つの *Bgl*II サイト間の 0.68 kb を、pUC4K (Vieira and Messing, 1982) から切り出し、1.3 kb のカナマイシン耐性遺伝子に取り替えた。いずれの場合も *Kan*<sup>r</sup> の転写方向は、分断される遺伝子と同じ方向に挿入した。これらのプラスミドは、Williams and Szalay (1983) の方法に従い、*Synechococcus* sp. PCC7942 に導入し、相同組み替えによるカナマイシン耐性の獲得を指標として、形質転換体を得た。形質転換体は 3.75 mM の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> と 10 µg/mL のカナマイシンを含む固形培地で選別した。同一のゲノム構成を持つ変異株を分離するために、3回新しい培地に植え継いだ後 (Williams, 1988)、ゲノム DNA を単離し、PCR 法によって *Kan*<sup>r</sup> の挿入とその部位を確認した。

## DNA の精製と PCR による解析

*Synechococcus* sp. PCC7942 の野生株と変異株の染色体 DNA は、Williams



(1988)の方法により抽出、精製した。*nirB*、*ntcB*、*ntcA*、*narB*に特異的な2組のプライマーを用い、およそ30 ngの染色体DNAを鋳型としてPCR反応を行った。

#### 酵素活性の測定

NR、NiR活性はトルエン処理した細胞を用い、ジチオナイトで還元したメチルピオロゲンを電子供与体として、それぞれ Herrero et al. (1981)、Herrero and Guerrero (1986)の方法に従った。GS、GOGAT活性の測定は、Marqués et al (1992)の方法で調整した細胞抽出液を用いた。GSの転移反応の活性は、Cullimore and Sims (1980)の方法を用い、GOGAT活性は、基本的には Marqués et al (1992)の方法に従い、フェレドキシンの代わりにジチオナイトで還元したメチルピオロゲンを電子供与体として用いた (Lea and Mifflin, 1975)。全ての酵素活性は30 °Cで測定した。

#### 細胞外の硝酸イオン、亜硝酸イオン、アンモニア濃度の定量

培養液から細胞を除くために、すばやく15,000 gで1分間遠心して得た上清を、0.20 µmの酢酸セルロース膜(東洋濾紙)を通した。濾液は無窒素培地で適当に希釈した後、フローインジェクションアナライザー (NOX-1000W, 東京化成)で、まず、硝酸イオンと亜硝酸イオンを合わせた濃度を測定した。この装置は、硝酸の亜硝酸への還元、生じた亜硝酸のスルファニルアミドとN-1-ナフチル-エチレンジアミン塩酸塩とのカップリング反応、それによって生じるジアゾ化合物の比色定量の過程を自動的に行うものである。亜硝酸イオンの定量には、上記の装置の硝酸の還元過程を省略して用いることにより行った。硝酸イオン濃度は、硝酸と亜硝酸を合わせて測定した値から、亜硝酸イオンのみの測定で得た値を引いて求めた。アンモニアの測定には、Snell and Snell (1949)の方法に基づいて調整したネスラー試薬を用いた。

#### グルタミン、グルタミン酸の定量

ラン藻細胞のグルタミン、グルタミン酸の定量は、0.5 M 過塩素酸を細胞懸濁液に加え、0 °Cで20分放置しアミノ酸を抽出した。0.3 MのK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加え中



和し、生じた  $\text{KClO}_4$  を 15,000 g, 10 分間の遠心分離により除去した後、既報 (Sugiharto and Sugiyama, 1992) に従い *o*-フタルアルデヒドで処理して、逆相 HPLC により分画し定量した。

#### その他の測定法

細胞の増殖は培養液のクロロフィル量と 730 nm の吸光度を測定し指標とした。クロロフィルの定量は Mackinney (1941) の方法に従った。タンパク質量は Lowry et al. (1951) の方法に従って測定した。



## 要 約



## 第1章

トウモロコシ (*Zea mays* L.) の  $C_4$  光合成遺伝子の窒素栄養状態に依存した発現の制御機構を解析する目的で、窒素欠乏からの回復過程にある植物から単離した核を用いて、run-off assay を行い フォスフォエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) 遺伝子の転写活性を測定した。PEPC 遺伝子は窒素の補填に依存して顕著に転写が誘導され、またその現象は  $C_4$  光合成に関わる PEPC の遺伝子 (*C4ppc1*) に特異的であった。しかしながら、遺伝子の転写の活性化の度合いに比べ、mRNA 蓄積量の増加の割合は小さかった。このことは窒素による *C4ppc1* の発現は、転写の段階だけでなく転写後の段階においても制御されていることを示している。切り取り葉を用いた実験系で、mRNA の蓄積を誘導するにはサイトカニンと窒素源の両方の添加が必要であることが明らかにされていた。切り取り葉を用いた実験系においては、*C4ppc1* の転写活性はサイトカニンのみの添加で著しく活性化された。それに対し、窒素源のみの添加ではその誘導は観察されなかった。これらのことから、窒素栄養状態に応じた *C4ppc1* の発現は、サイトカニンによって転写段階で活性化され、グルタミンあるいはその下流の代謝産物によって転写後の段階で正に制御されていることが示された。また、シクロヘキシミドによって *C4ppc1* の転写は完全に阻害されることから、サイトカニンによる転写の活性化には、細胞質でのタンパク質の新規な合成が必要であることが明らかになった。

## 第2章

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 において、フェレドキシン依存性亜硝酸還元酵素 (NiR: EC 1.7.7.1) の遺伝子 (*nirA*) は、その下流に存在する硝酸イオンの輸送に関わる遺伝子群 *nrtABCD*、還元に関わる遺伝子 *narB* と共転写されることが明らかになり、この *nirA-nrtABCD-narB* からなる遺伝子群を *nirA* オペロンと名付けた。このオペロンの転写産物は、不安定であり細胞内で速やかに分解されていた。また、その転写産物はアンモニアを窒素源として生育する細胞には蓄積せず、培地中からアンモニアを除去するかまたは、グルタミン合成酵素の阻害剤である、L-メチオニン-D,L-スルフォキシミン (MSX) を添加して、アンモニアの固定を阻害すると速やかに蓄積した。10 mM のグルタミンであらかじめ処理しておいた細胞に、MSX を添加しても転写産物の蓄積は観察されなかったが、グルタミ



ン酸合成酵素の阻害剤 5-ジアゾ-6-オキソ-L-ノルロイシン (DON) を添加するとオペロンの転写の誘導が観察された。これらの結果は、グルタミンからのアミド基転移反応によって、生合成される窒素化合物あるいは、その代謝産物が *nirA* オペロンの転写の抑制因子として作用していることを示している。

### 第3章

ラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の硝酸能動輸送能を欠損した株 M45 を実験材料にして、硝酸の同化と炭酸の同化にかかわる遺伝子の窒素による制御を研究した。M45 の細胞を 30 mM の硝酸を窒素源として生育すると、細胞は恒常的な窒素欠乏ストレス下に置かれる。この条件で生育した M45 の細胞は、通常の硝酸イオン濃度 17.5 mM で生育させた野生株の細胞に比べて、およそ 5 倍の亜硝酸還元酵素遺伝子 *nirA* の転写産物を蓄積した。それに対し、この細胞の Rubisco の大サブユニットをコードする *rbcL* 遺伝子の転写産物の蓄積は、野生株の 40 % に減少していた。M45 の培養液にアンモニアを添加すると、*nirA* の転写の抑制と *rbcL* の転写の活性化が見られた。グルタミンの培地への添加は程度は小さいものの、*nirA* 転写産物量の減少と *rbcL* 転写産物量の蓄積を引き起こした。いくつかのグルタミンの代謝産物のうちカルバミルリン酸だけが、アンモニアやグルタミンと類似の効果を示した。カルバミルリン酸の代謝産物にはその効果はなかったが、分解物であるシアン酸は同様の効果を発揮した。シアン酸の効果はアンモニア同化の阻害剤であるメチオニンスルフォキシミンによって打ち消されず、シアン酸が分解されて生じるアンモニアが再固定されたためではないことがわかった。シアン酸の効果は *nirA* 以外のアンモニアで抑制されるグルタミン合成酵素遺伝子 *glnA* に対しても同様に見られた。これらの結果から、*Synechococcus* sp. PCC 7942 においてシアン酸の蓄積が、窒素同化系遺伝子群と炭酸同化系遺伝子の発現を制御する代謝シグナルであることが示された。

### 第4章

*Synechococcus* sp. PCC 7942 の硝酸の取り込みと還元に関わる *nirA* オペロンの上流に、窒素により発現が調節される 2 つの遺伝子を見出した。二つの遺伝子 (*nirB* と *ntcB*) は、*nirA* と逆向きに転写され、それぞれ 349 アミノ酸、309 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。*nirB* と *ntcB* の転写産物は、アンモニア培地で生育した細胞には少なく、アンモニアで培養した細胞を硝酸イオンを



窒素源とする培地へ移すと蓄積した。NirB の推定アミノ酸配列は、既知のタンパク質の配列と相同性が認められなかったが、NtcB の推定アミノ酸配列は、LysR ファミリーに分類される細菌の転写因子と相同性が見られた。薬剤耐性遺伝子の挿入により作製した *nirB* あるいは *ntcB* の変異株は、アンモニア培地では野生株と同様の速度で増殖したが、硝酸または亜硝酸を窒素源とする培地では、野生株に比べて増殖が抑制された。*nirB* の変異株は、硝酸還元酵素、グルタミン合成酵素、グルタミン酸合成酵素の活性は野生株より高かったが、亜硝酸還元酵素活性は野生株の 40 % に減少していた。この変異株は硝酸培地で生育させると、培地中へ亜硝酸イオンを放出したので、亜硝酸の還元過程が硝酸同化系路を律速し、この株の生育を抑制したと考えられた。これらの結果から、*nirB* は亜硝酸還元酵素の最大活性の発現に、必須であると考えられた。*ntcB* の変異株はアンモニア培地でも、窒素の欠乏に特徴的な黄緑色を呈して生育した。このことから、NtcB は窒素同化に関わる何らかの遺伝子の発現調節を介して、同化された窒素の利用を制御していると思われた。

## 第 5 章

CO<sub>2</sub> 制限条件下で生育したラン藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 の細胞は、硝酸の還元によって生じた亜硝酸の約 30 % を培養液中に放出する。一方、CO<sub>2</sub> 充足条件下で培養した場合には、亜硝酸の放出は見られない。CO<sub>2</sub> 充足条件下で培養した細胞を、CO<sub>2</sub> 欠乏条件下へ移すと、亜硝酸還元酵素活性は 30 分後から減少し始め、3 時間で最初の値の 50 % に減少したが、この間硝酸還元酵素活性は変化しなかった。CO<sub>2</sub> 欠乏条件下に細胞を移すと、およそ 3 時間後から亜硝酸イオンが培地中に蓄積し始め、17 時間後には 0.4 mM 以上の濃度に達した。これらの結果は、亜硝酸の放出は亜硝酸還元酵素と、硝酸還元酵素の活性の不均衡によるものと考えられた。亜硝酸還元の結果生じるアンモニアは、培地中に検出されないことから、CO<sub>2</sub> 制限条件下では、亜硝酸還元の過程が硝酸還元の過程を規定していることを示している。CO<sub>2</sub> 制限条件下での亜硝酸還元酵素の減少は、CO<sub>2</sub> 充足条件下の細胞に、リファンピシンをあたえて転写を阻害したときより大きかった。CO<sub>2</sub> を制限した細胞に、炭酸水素イオンの形で CO<sub>2</sub> を補填すると、亜硝酸還元酵素活性は上昇した。この増加はリファンピシンの添加により抑制された。これらの結果は、CO<sub>2</sub> 制限下で、亜硝酸還元酵素を不可逆的に阻害する機構が存在することを、示唆している。



## References

- Aiba H, Adhya S, de Crombrughe B (1981) Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* 256:11905-11910
- Allen Jr. CM, Jones ME (1964) Decomposition of carbamylphosphate in aqueous solutions. *Biochem* 3: 1238-1247
- Allfrey VG, Boffa LC, Vidali G (1977) Selective inhibition with sodium cyanate of protein synthesis in color cancer cells. *Cancer (Phila.)* 40: 2692-2698
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Anderson JW, Beardell J (1991) Synthesis of nitrogenous compounds from amino acids. *In*, Molecular activities of plant cells. An introduction to plant biochemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 245-256
- Anderson PM (1980) Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochem* 19: 2882-2888
- Anderson PM, Carlson JD (1975) Reversible reaction of cyanate with a reactive sulfhydryl group at the glutamine binding site of carbamyl phosphate synthetase. *Biochem* 14: 3688-3694
- Anderson PM, Carlson JD, Rosenthal GA, Meister A (1973) Effect of potassium cyanate on the catalytic activities of carbamyl phosphate synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 55: 246-252
- Anderson PM, Little RM (1986) Kinetic properties of cyanase. *Biochem* 25: 1621-1626
- Anderson PM, Sung Y-C, Fuchs JA (1990) The cyanase operon and cyanate metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 87: 247-252
- Andriessse X, Bakke H, Weisbeek P (1990) Analysis of nitrate reduction genes in cyanobacteria. *In* W.R. Ullrich, C. Rigano, A. Fuggi, and P.J. Aparicio eds., Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms. Springer, Berlin, pp 303-307
- Arnon DI, Hoagland DR (1940) Crop production in artificial solutions and soils with special reference to factors in fluencing yield and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci* 50: 463-471
- Aslam M, Huffaker RC, Rains DW, Rao KP (1979) Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol* 63: 1205-1209
- Azuara MP, Aparicio PJ (1983) *In Vivo* blue-light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. *Plant Physiol* 71: 286-290
- Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336
- Bennett J (1979) The protein that harvests sunlights. *Trend Biochem Sci* 4: 268-271
- Bohannon DE, Sonenshein AL (1989) Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 171: 4718-4727
- Brusca JS, Chastain CJ, Golden JW (1990) Expression of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *xisA* gene from a heterologous promoter results in excision of the *nifD* element. *J Bacteriol* 172: 3925-3931
- Caboche M, Rouze P (1990) Nitrate reductase: a target for molecular and cellular studies in higher plants. *Trends Genet* 6: 187-192
- Cerami A, Allen TA, Graziano JH, DeFuria FG, Manning JM, Gillete PN (1973) Pharmacology of cyanate. I. General effects on experimental animals. *J Pharmacol Exp Ther* 185: 653-666
- Chastain CJ, Brusca JS, Ramasubramanian TS, Wei T-F, Golden JW (1990) A sequence-specific DNA-binding factor (VF1) from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 vegetative cells binds to three adjacent sites in the *xisA* upstream region. *J Bacteriol* 172: 5044-5051



- Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1861-1864
- Church GM, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1991-1995
- Cohen-Kupiec R, Gurevitz M, Zilberstein A (1993) Expression of *glnA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 is initiated from a single *nif*-like promoter under various nitrogen conditions. *J Bacteriol* 175: 7727-7731
- Coronil T, Lara C (1991) Amino acid levels and expression of the nitrate assimilation system in *Anacystis nidulans* cells. *Plant Physiol Biochem* 29: 651-655
- Crétin C, Santi S, Keryer E, Lepiniec L, Tagu D, Vidal J, Gadal P (1991) The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene* 99: 87-94
- Cullimore JV, Sims AP (1980) An association between photorespiration and protein catabolism: studies with *Chlamydomonas*. *Planta* 150: 392-396
- Deng MG, Moureaux T, Cherel I, Boutin JP, Caboche M (1991) Effects of nitrogen metabolites on the regulation and circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol Biochem* 29: 239-248
- Dodd IB, Egan JB (1990) Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequence. *Nucleic Acid Res* 18: 5019-5026
- Elhai J, Wolk CP (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68: 119-138
- Epstein E (1965) Mineral metabolism. In: *Plant Biochemistry*, eds, Bonner J, Varner JE
- Faure J-D, Jullien M, Caboche M (1994) *Zea3*: a pleiotropic mutation affecting cotyledon development, cytokinin resistance and carbon-nitrogen metabolism. *Plant J* 5: 481-491
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
- Feldman LJ (1975) Cytokinins and quiescent center activity in roots of *Zea*. In JG Torrey, DT Clarkson, eds, *The Development and Function of Roots*. Academic Press, London, pp 55-72
- Flores E, Guerrero MG, Losada M (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch Microbiol* 128: 137-144
- Flores E, Guerrero MG, Losada M (1983a) Photosynthesis nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 722: 408-416
- Flores E, Romero JM, Guerrero MG, Losada M (1983b) Regulatory interaction of photosynthetic nitrate utilization and carbon dioxide fixation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* 725: 529-532
- Flores S, Tobin EM (1986) Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation. *Planta* 168: 340-349
- Flores S, Tobin EM (1989) Cytokinin modulation of LHCP mRNA levels: the involvement of post-transcriptional regulation. *Plant Mol Biol* 11: 409-415
- Friedberg D, Kaplan A, Ariel R, Kessel M, Seijffers J (1989) The 5'-flanking region of the gene encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase is crucial for growth of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 at the level of CO<sub>2</sub> in air. *J Bacteriol* 171: 6069-6076
- Fritz CC, Herget T, Wolter FP, Schell J, Schreier PH (1991) Reduced steady-state levels of *rbcS* mRNA in plants kept in the dark are due to differential degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4458-4462
- Funckes-Shippy CL, Levine AD (1985) Cytokinin regulates the expression of nuclear genes required for photosynthesis. In KE Steinback, S Bonitz, C]



- Arntzen, L. Bogorad, eds, Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp 407-411
- Gallagher TF and Ellis RJ (1982) Light-stimulated transcription of genes for two chloroplast polypeptides in isolated Pea leaf nuclei. EMBO J 1: 1493-1498
- Golden SS, Brusslan J, Haselkorn R (1986) Expression of a family of *psbA* genes encoding a photosystem II polypeptide in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. EMBO J. 5:2789-2798.
- Guerrero MG, Lara C (1987) Assimilation of inorganic nitrogen, In P. Fay, and C. Van Baalen eds, The Cyanobacteria. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 163-186
- Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu Rev Plant Physiol 32:169-204
- Guilloton M, Hargreaves AB (1972) Hydrolyse du cyanate par une bactérie du genre *Flavobacterium*. C.R. Acad Sc Paris 275: 1827-1830
- Guilloton M, Karst JJ (1987) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants lacking inducible cyanase. J Gen Microbiol 133: 645-653
- Hagel PJ, Gerding JT, Hiegggen W, Bloemendal H (1971) Cyanate formation in solutions of urea. Biochim Biophys Acta 243: 366-373
- Harpster MH, Tayler WC (1986) Maize phosphoenolpyruvate carboxylase: cloning and characterization of mRNAs encoding isozymic forms. J Biol Chem 261: 6132-6136
- Hayakawa S, Matsunaga K, Sugiyama T (1981) light induction of phosphoenolpyruvate carboxylase in etiolated maize leaf tissue. Plant Physiol 67: 133-138
- Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM, Wallace JC (1988) A large family of bacterial activator proteins. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6602-6606
- Herrero A, Flores E, Guerrero MG (1981) Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. strain 6719. J Bacteriol 145:175-180
- Herrero A, Guerrero MG (1986) Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. J Gen Microbiol 132:2463-2468.
- Hirel B, Bouet C, King B, Layzell D, Jacobs F, Verma DPS (1987) Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. EMBO J 6: 1167-1171
- Horgan JM, Waering PF (1980) Cytokinins and the growth responses of seedlings of *Betula pendula* Roth. and *Acer pseudoplatanus* L. to nitrogen and phosphorous deficiency. J Exp Bot 31: 525-532
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG (1992a) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. Arch Biochem Biophys 296: 58-65
- Huber SC, Huber JL, Campbell WH, Redinbaugh MG (1992b) Apparent dependence of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves on protein synthesis. Plant Cell Physiol 33: 639-646
- Iludspeth RI, Glackin CA, Bonner J, Grula JW (1986) Genomic and cDNA clones for maize phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, orthophosphate dikinase: expression of different gene-family members in leaves and roots. Proc Natl Acad Sci USA 83: 2884-2888
- Ida S, Mikami B (1983) Purification and characterization of assimilatory nitrate reductase from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Plant Cell Physiol. 24:649-658.
- Izui K, Ishijima S, Yamaguchi Y, Katagiri F, Murata T, Shigesada K, Sugiyama T, Katsuki H (1986) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C<sub>4</sub>-pathway from maize. Nuc Acid Res 14: 1615-1628



- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO<sub>2</sub> availability. *Plant Physiol* 96: 363-367
- Kaiser WM, Förster J (1989) Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol* 91: 970-974
- Kaiser WM, Huber SC (1994) Posttranslational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Physiol* 106: 817-821
- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E (1992) Rapid light-dark modulation of assimilatory nitrate reductase in spinach leaves involves adenine nucleotides. *Planta* 186: 236-240
- Konishi I, Imanari T (1987) Determination of S-carbamyl group in biological materials. *Anal Sci* 3: 59-62
- Kraft R, Tardiff J, Krauter KS, Leinwand LA (1988) Using mini-prep plasmid DNA for sequencing double stranded templates with sequenase™. *Bio Techniques* 6: 544-547
- Krämer F, Tischner R, Schmidt A (1988) Regulation of assimilatory nitrate reduction at the level of nitrite in *Chlorella fusca*. *Planta* 176: 28-35
- Ku SB, Schmitt MR, Edwards GE (1979) Quantitative determination of RuBP carboxylase/oxygenase in leaves of several C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant. *J Exp Bot* 30: 89-98
- Kuhlemeier CJ, Logtenberg T, Stoorvogel W, van Heugten HAA, Borrias WE, van Arkel GA (1984a) Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* 159:36-41.
- Kuhlemeier CJ, Teeuwsen VJP, Janssen MJT, van Arkel GA (1984b) Cloning of a third nitrate reductase gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 using a shuttle gene library. *Gene* 31: 109-116
- Kuiper D, Kuiper PJC, Lambers H, Schuit J, Staal M (1989) Cytokinin concentration in relation to mineral nutrition and benzyladenine treatment in *Plantago major* ssp. *pleiosperma*. *Physiol Plant* 75: 511-517
- Kunz DA, Nagappan O (1989) Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIB11764. *Appl Environ Microbiol* 55: 256-258
- Lara C, Romero JM (1986) Distinctive light and CO<sub>2</sub>-fixation requirments of nitrate and ammonium utilization by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol* 81: 686-688
- Lara C, Romero JM, Flores E, Guerrero MG, Losada M (1984) Regulation of nitrate utilization by CO<sub>2</sub>-fixation products in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. In: Sybesma C, ed, *Advances in Photosynthesis Research*, Vol 2. Martinus Nijhoff/Dr.W. Junk Publishers, The Hague, pp 715-718
- Lara C, Romero JM, Guerrero MG (1987) Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* 169: 4376-4378
- Lawrie AC (1979) Effect of carbamoyl phosphate on nitrogenase in *Anabaena cylindrica* Lemm. *J Bacteriol* 139: 115-119
- Lea PJ, Milfin BJ (1975) Glutamate synthase in blue-green algae. *Biochem Soc Trans* 3: 381-384
- Lea PJ, Milles R, Wallsgrove RM, Milfin BJ (1982) Assimilation of nitrogen and synthesis of amino acids in chloroplast and cyanobacteria (blue-green algae). In Schiff JA, ed, *On the Origin of Chloroplasts*. Elsevier North Holland, New York, pp 149-178
- Lerbs S, Lerbs W, Klyachko NL, Romanko EG, Kulaeva ON, Wollgiehn R, Pathier B (1984) Gene expression in cytokinin- and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 162: 289-298
- Lin JT, Goldman BS, Stewart V (1993) Structure of genes *nasA* and *nasB* encoding assimilatory nitrate and nitrite reductase in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *J Bacteriol* 175: 2370-2378
- Lisanti LE (1963) Distribuzione della cianasi nei vegetali. I. - Attività cianatolitica nel *Cicer arietinum*. *Ann Speriment Agaria* 17: 45-51



- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Lotti G (1965) Ricerche sulla cianasi del frumento. *Chim Ind* 45: 561-563
- Lu J-I, Ertl JR, Chen C-M (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Mol Biol* 14: 585-594
- Lu J-I, Ertl JR, Chen C-M (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abscisic acid interactions in etiolated barley leaves. *Plant Physiol* 98: 1255-1260
- Luthe DS, Quatrano RS (1980) Transcription of isolated nuclei: I. Isolation of nuclei and elimination of endogenous ribonuclease activity. *Plant Physiol* 65: 305-308
- Luque I, Flores E, Herrero A (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol Biol* 21: 1201-1205
- Luque I, Herrero A, Flores E, Madueño F (1992) Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Gen Genet* 232: 7-11
- Luque I, Flores E, Herrero A (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J* 13: 2862-2869
- Mackinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* 140: 315-322
- Madueño F, Borrias WE, van Arkel GA, Guerrero MG (1988a) Isolation and characterization of *Anacystis nidulans* R2 mutants affected in nitrate assimilation: establishment of two new mutant types. *Mol Gen Genet* 231: 223-228
- Madueño F, Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A (1988b) A cytoplasmic-membrane protein repressible by ammonium in *Synechococcus* R2: altered expression in nitrate-assimilation mutants. *FEBS Lett* 239: 289-291
- Magasanik B (1988) Reversible phosphorylation of an enhancer binding protein regulates the transcription of bacterial nitrogen utilization genes. *Trend Biol Sci* 13: 475-479
- Marqués S, Florencio FJ, Candau P (1992) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC6301. *Eur J Biochem* 206: 69-77
- Meeks JC, Wolk CP, Thomas J, Lockau W, Shaffer PW, Austin SM, Chien W-S, Galonsky A (1977) The pathways of assimilation of  $^{15}\text{NH}_4^+$  by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* 252: 7894-7900
- Méndez JM, Vega JM (1981) Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp. 7119. *Physiol Plant* 52: 7-14
- Mérida A, Candau P, Florencio FJ (1991) Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J Bacteriol* 173: 4095-4100
- Miller AG, Espie GS (1994) Photosynthetic metabolism of cyanate by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Arch Microbiol* 162: 151-157
- Miao GH, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW, Verma DPS (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell* 3: 11-22
- Ohmori M, Ohmori K (1990) Ammonium-nitrogen partitioning under different balances of nitrogen and carbon in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Gen Appl Microbiol* 36: 171-177
- Oka A, Sugisaki H, Takanami M (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* 147: 217-226
- Omata T (1991) Cloning and characterization of the *nrtA* gene that encodes a 45-kDa protein involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* 32: 151-157



- Omata T, Andriessen X, Hirano A (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Mol Gen Genet* 236:193-202.
- Omata T, Ohmori M, Arai N, Ogawa T (1989) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942 defective in nitrate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6612-6616.
- Pace GM, Volk RJ, Jackson WA (1990) Nitrate reduction in response to CO<sub>2</sub>-limited photosynthesis. *Plant Physiol* 92: 286-292
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448
- Peltier G, Schmidt GW (1991) Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4791-4795
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 238: 336-341
- Plumley FG, Schmidt GW (1989) Nitrogen-dependent regulation of photosynthetic gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2678-2682
- Ramasubramanian TS, Wei T-F, Golden JW (1994) Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J Bacteriol* 176: 1214-1223
- Ray JM, Bhaya D, Block MA, Grossman AR (1991) Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 173: 4297-4309
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 111: 1-61
- Romero JM, Lara C, Guerrero MG (1985) Dependence of nitrate utilization upon active CO<sub>2</sub> fixation in *Anacystis nidulans*: a regulatory aspect of the interaction between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism. *Arch Biochem Biophys* 237: 396-401
- Sakakibara H, Watanabe M, Hase T, Sugiyama T. (1991) Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *J Biol Chem* 266: 2028-2035
- Sakakibara H, Kawabata S, Takahashi, H., Hase T, Sugiyama T. (1992a) Molecular cloning of the family of glutamine synthetase genes from maize: expression of genes for glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthase in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol* 33: 49-58
- Sakakibara H, Kawabata S, Hase T, Sugiyama T. (1992b) Differential effects of nitrate and light on the expression of glutamine synthetases and ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Plant Cell Physiol* 33: 1193-1198
- Salama AMSEA, Waering PF (1979) Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Exp Bot* 30: 971-981
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Seto BL, Mortenson LE (1974) Mechanism of carbamyl phosphate inhibition of nitrogenase of *Clostridium pasteurianum*. *J Bacteriol* 117: 805-812
- Sheen J (1993) Protein phosphatase activity is required for light-inducible gene expression in maize. *EMBO J* 12: 3497-3505
- Shelp BJ, Calvin DT (1984) Evidence for bicarbonate accumulation by *Anacystis nidulans*. *Can J Bot* 62: 1398-1403
- Shinozaki K, Sugiura M (1985) Genes for the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase constitute a single operon in a cyanobacterium *Anacystis nidulans* 6301. *Mol Gen Genet* 200: 27-32



- Sibata H, Ochiai H, Sawa Y, Miyoshi S (1986) Localization of carbamoylphosphate synthetase and aspartate carbamoyltransferase in chloroplasts. *Plant Physiol* 80: 126-129
- Siddiqui RA, Warnecke-Eberz U, Hengsberger A, Schneider B, Kostka S, Friedrich B (1993) Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* III6. *J Bacteriol* 175: 5867-5876
- Sivak MN, Lara C, Romero JM, Rodríguez R, Guerrero MG (1989) Relationship between a 47-kDa cytoplasmic membrane polypeptide and nitrate transport in *Anacystis nidulans*. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 257-262
- Snell FD, Snell CT (1949) Colorimetric methods of analysis, Vol.2. Van Nostrand, New York
- Son D, Kobe A, Sugiyama T (1992) Nitrogen-dependent regulation of the gene for alanine aminotransferase which is involved in the C4 pathway of *Panicum miliaceum*. *Plant Cell Physiol* 33: 507-509
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev* 35:171-205.
- Stark GR (1964) On the reversible reaction of cyanate with sulphydryl groups and the determination of the NH<sub>2</sub> terminal cystein and cystine in proteins. *J Biol Chem* 239: 1411-1414
- Stark GR (1965) Reaction of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochem* 4: 1030-1036
- Staswick PE (1990) Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell* 2: 1-6
- Stokes DM, Walker DA (1972) Photosynthesis by isolated chloroplasts. Inhibition by DL-glyceraldehyde of carbon dioxide assimilation. *Biochem J* 128: 1147-1157
- Stragier P, Patte J-C (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. III. Nucleotide sequence and regulation of the *lysR* gene. *J Mol Biol* 168: 333-350
- Sugiharto B, Burnell JN, Sugiyama T (1992a) Cytokinin is required to induce the nitrogen-dependent accumulation of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaves. *Plant Physiol* 100: 153-156
- Sugiharto B, Miyata K, Nakamoto H, Sasakawa H, Sugiyama T (1990) Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiol* 92: 963-969
- Sugiharto B, Sugiyama T (1992) Effects of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiol* 98: 1403-1408
- Sugiharto B, Suzuki I, Burnell JN, Sugiyama T (1992b) Glutamine induces the N-dependent accumulation of mRNAs encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and carbonic anhydrase in detached maize leaf tissue. *Plant Physiol* 100: 2066-2070
- Sugiyama T, Mizuno M, Hayashi M (1984) Partitioning of nitrogen among ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase as related to biomass productivity in maize seedling. *Plant Physiol* 5: 665-669
- Suzuki I, Sugiyama T, Omata T (1993) Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* 34:1311-1320.
- Taniguchi M, Kobe A, Kato M, Sugiyama T (1995) Aspartate aminotransferase isozymes in *Panicum miliaceum* L., an NAD-malic enzyme-type C4 plant: Comparison of enzymatic properties, primary structures, and expression patterns. *Arch Biochem Biophys* in press
- Taussig A (1960) The synthesis of the induced enzyme, "cyanase", in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 44: 510-519



- Thorsteinsson B, Eliasson L (1990) Growth retardation induced by nutritional deficiency or abscisic acid in *Lemna gibba*: the relationship between growth rate and endogenous cytokinin content. *Plant Growth Regul* 9: 171-181
- Ting IP, Osmond CB (1973) Multiple forms of phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant Physiol* 51: 448-453
- Tsinoremas NF, Castets AM, Harrison MA, Allen JF, Tandeau de Marsac N (1991) Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of posttranslational modification of the *glnB* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4565-4569
- Vega-Palas MA, Madueño F, Herrero A, Flores E (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *J Bacteriol* 172: 643-647
- Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol Microbiol* 6: 1853-1859.
- Vieira J, Messing J (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 256-268
- Vieira J, Messing J (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* 153: 3-11
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker M-T, Vaucheret H, Caboche M (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J* 3: 315-324
- Wei T-F, Ramasubramanian TS, Golden JW (1994) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene required for growth on nitrate and heterocyst development. *J Bacteriol* 176: 4473-4482
- Wek RC, Hatfield GW (1986) Nucleotide sequence and *in vivo* expression of the *ilvY* and *ilvC* genes in *Escherichia coli* K12: transcription from divergent overlapping promoters. *J Biol Chem* 261: 2441-2450
- Williams JGK (1988) Construction of specific mutations in photosystem II reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol* 167: 766-778
- Williams JGK, Szalay AA (1983) Stable integration of foreign DNA into the chromosome of the cyanobacterium *Synechococcus* R2. *Gene* 24: 37-51
- Yamazaki M, Watanabe A, Sugiyama T (1986) Nitrogen-related accumulation of mRNA and protein for photosynthetic carbon assimilating enzymes in maize. *Plant Cell Physiol* 27: 443-452
- Yukura K, Tanifuji S (1983) Molecular cloning and restriction analysis of *EcoRI* fragments of *Vicia faba* rDNA. *Plant Cell Physiol* 24: 1327-1330



## 謝辞

本論文における全ての研究は、名古屋大学大学院農学研究科在学中になされたものであり、先見的なテーマの設定、合理的な解析の方針、論理的なデータの解釈とその発表の全ての段階にわたり、公務多忙のなか辛抱強くご指導頂きました。植物分子生理学研究室、杉山達夫教授に心より感謝申し上げます。また、私の生来の不遜な態度にも関わらず、常に寛容な心で受けとめ正しい方向に修正して下さいましたことを感謝するとともに、数々の無礼を心より謝罪いたします。

本論文の特にラン藻を材料とした研究において、日々の確なアドバイスと斬新なアイデアを与えて下さり、ともすれば見落としがちな事象を冷静に見極める目を身を持ってご教授して下さいました、小俣達男助教授に心より感謝申し上げます。また、先生には日頃から科学者としての思考法、心構えをご高説していただき、かつ実践して示していただきました。ありがとうございました。今後少しでもその理想に近づけるように、努力していきたいと考えております。

当時、大学3年生で研究室の配属に関して迷っていた私に、具体的な助言をしていただき、また配属後は、実験結果を客観的に解釈する大切さを教えていただきました。現大阪大学蛋白質研究所の長谷俊治教授に心から感謝申し上げます。

Bambang Sugiharto 博士の、強い意志と努力で難題に立ち向かう姿が、後輩の私には良いお手本でした。ありがとうございました。貴方の研究をさらに成熟したものにしたいのですが、私の未熟のために大きく進歩しなかったのが残念です。

James Burnell 博士、貴方の実験に対する情熱と積極性は、当時修士課程の学生だった私には衝撃的でした。ありがとうございました。

Claude Crétin 博士、C3ppcI の転写産物の定量をしていただきありがとうございました。短期間ではありましたが、貴方のような有能な研究者とともに実験できたことを幸せに思います。また、貴方の訃報に接し残念でなりません。心よりご冥福をお祈りいたします。

修士課程の学生で右も左もわかっていなかった私に、当時最新の技術を試みる機会を与えて下さった、元農水省生物資源研究所主任研究員、現名古屋大学生物応答センターの松岡信教授に感謝申し上げます。

谷口光隆先生、榊原均先生、私が4年生になって研究室に配属されたときから、いつもご迷惑ばかりおかけいたしました。実際に詳細な実験方法を指導していただくと同時に、私のわがままや不平不満を聞いてもらえる良い先輩でした。ありがとうございました。

本論文の第3章に記した、*nirB*, *ntcB* の同定とその機能解析の研究を中心的に進めてくれた堀江宣行君、*nicA* オペロンの転写調節変異株のスクリーニングに挑んでくれた前田真一君、ラン藻 *Plectonema boryanum* の亜硝酸還元酵素のクロニングを行ってくれた中西早恵子さん、NirB の機能解析を精力的に進めてくれた愛知真木子さん、気まぐれで確固たる指導もできなかった私を、どうかお許し下さい。その他植物分子生理学研究室に縁の皆様、私がこれだけ楽しく実験できたのは皆様のおかげです。大変ありがとうございました。また、数多くのご迷惑をおかけしたと思います。どうかお許し下さい。

1995年3月



## 報文のリスト

1. Iwane Suzuki, Claude Crétin, Tatsuo Omata, Tatsuo Sugiyama  
"Transcriptional and posttranscriptional regulation of nitrogen-responding expression of phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize."  
Plant Physiol. 105: 1223-1229 (1994)
2. Iwane Suzuki, Tatsuo Sugiyama, Tatsuo Omata  
"Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942."  
Plant Cell Physiol. 34: 1311-1320 (1993)
3. Iwane Suzuki, Nobuyuki Horie, Tatsuo Sugiyama, Tatsuo Omata  
" Identification of two nitrogen-regulated genes for the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation."  
J. Bacteriol. 177: 665-669 (1995)
4. Iwane Suzuki, Tatsuo Sugiyama, Tatsuo Omata  
"Regulation of nitrite reductase activity under CO<sub>2</sub> limitation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942."  
Plant Physiol. in press