

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 坂本 貴之

論 文 題 目

ラン藻のアンモニア耐性における P_{II} の機能解析

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	藤田祐一
委 員	名古屋大学教授	榊原 均
委 員	名古屋大学准教授	山篠貴史
委 員	名古屋大学助教	前田真一
委 員	名古屋大学助教	山本治樹

論文審査の結果の要旨

P_{II} タンパク質は原核生物全般および真核生物である藻類や植物に存在する調節タンパク質で、様々な環境条件や栄養条件を検知し、それに応じて窒素同化と炭素代謝のバランスを制御する機能をもつ。光合成生物においては、原核生物であるラン藻から真核生物である藻類や植物にいたるまで、P_{II} は 2-オキソグルタル酸をシグナル物質として検知し、アルギニン合成の活性化と脂肪酸合成の抑制に関わっている。ラン藻ではこれらの機能に加え、物質の輸送や代謝に関わる多くのタンパク質の活性制御と遺伝子発現制御に関わる。多岐にわたる P_{II} 機能の解明のためには P_{II} 遺伝子 (*glnB*) の欠損株の解析が不可欠であるが、これまで *glnB* の単独欠損株の単離に成功したという報告はない。その理由として、P_{II} の制御対象の一つである転写補助因子 PipX が脱制御状態で存在することで細胞に対し強い毒性を発揮するためと推定されている。*pipX* 遺伝子を欠損させても P_{II} 欠損に起因する他の障害が生じ、解析を一層困難にしている。本学位論文で、申請者はラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 を材料とし、P_{II} 欠損株の生育不良を、PipX 依存的な障害と非依存的な障害とに実験的に区別して評価し、後者が酸化ストレスを主因とすることを明らかにした。さらにこの知見を利用して P_{II} の単独変異株を単離し、PipX 依存的な障害の主因が光合成電子伝達系の障害であることを明らかにした。以上の内容は以下の 3 章にまとめられている。

1. P_{II} 欠損に起因するアンモニア感受性の遺伝学的解析

P_{II} 欠損株は、遊離の PipX の毒性による生育障害を示す。窒素制限条件下では PipX は別の転写制御因子 NtcA と結合してその毒性が低下するが、アンモニアを含む窒素充足条件下では NtcA から解離して特に強い生育障害を引き起こす。第 1 章では、P_{II} と PipX の二重欠損株 (PD4 株) を利用することで「P_{II} の制御から外れた PipX の毒性」を回避した上で「P_{II} 欠損に起因するアンモニア感受性」について遺伝学的な解析を実施した。方法としては、PD4 株が本来生育できないアンモニア含有培地においても生育が可能となった疑似復帰変異株を単離し、それらのゲノムリシーケンシングによって疑似復帰変異を同定するという手法を採用した。その結果、アンモニア輸送体 Amt1 の機能喪失変異、プロテアーゼ ClpC の 1 アミノ酸置換、機能未知の 2 種のタンパク質の 1 アミノ酸置換に加えて、プロトン排出輸送体 PxcA の機能昂進により PD4 がアンモニア耐性を獲得することを明らかにした。これら変異の効果は、PD4 に改めて同変異を導入してアンモニア耐性が獲得されること、さらに、各遺伝子の欠損株を作製してそれらの形質により確認した。以上の結果は、アンモニア耐性獲得には多様な要因が関与し、特に P_{II} はアンモニア吸収の抑制および PxcA によるプロトン排出の活性化を介して細胞内イオン環境の恒常性維持に関与していることを示している。

2. P_{II} 欠損株におけるアンモニア感受性と活性酸素の関係

第2章ではPD4を用いてP_{II}欠損が光合成機能に及ぼす影響とアンモニア感受性の関係を解析し、P_{II}欠損がPipX非依存的にPSII活性のアンモニアに対する感受性を増大させることを見出した。光照射下でのPSIIの活性低下は「光阻害」として知られる現象である。光阻害には活性酸素(ROS)が関与することに着目し、スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)、過酸化水素(H₂O₂)およびヒドロキシルラジカル(•OH)の3種のROSを一括して蛍光試薬5-(and 6-)chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA)を用いて測定した。また一重項酸素(¹O₂)はヒスチジンと不可逆的に反応して消去されるため、ヒスチジンの有無によるラン藻培養液の酸素発生速度の差から一重項酸素の生成速度を測定した。これらの結果、PD4ではアンモニア添加によってROSの生成が誘導されることが明らかになった。さらに、抗酸化剤 α -トコフェロールを培地に加えることで、アンモニアによるPD4株の増殖阻害が解消されることを示し、アンモニア存在下でのPipX非依存的な生育阻害がROSによる酸化傷害を介するものであることを証明した。

3. P_{II}単独欠損株を利用したPipXの有害性の解析

P_{II}を欠損すると脱制御状態のPipXの毒性に加えて、ROSによるPSIIの障害が起こるため、P_{II}欠損株を単離しようとする通常は*pipX*に機能喪失変異を伴った二重変異株しか得られない。 α -トコフェロールによってROSによる酸化障害を緩和できることを踏まえ、第3章で申請者は α -トコフェロール存在下で野生株のP_{II}の遺伝子破壊を試み、初めてP_{II}単独欠損株(PD1X)の作出に成功した。PD1Xは寒天培地上で微小なコロニーとして作出されたが、液体培地での培養が困難であった。そこで、顕微鏡に取り付けたパルス変調(PAM)蛍光分光器を用いてクロロフィルの蛍光収率を測定することで、微小コロニーにおいて光合成活性を調べることを試みた。PD1Xでは、PSIIの電子受容体であるプラストキノンQ_Aの光照射による還元が極めて遅く、また、暗所では還元されたQ_Aの再酸化も遅いことを明らかにした。この形質はP_{II}とPipXの二重欠損株では観察されなかったことから、PipXが光合成電子伝達をQ_Aの上流側及び下流側において阻害することが判明した。

以上、本学位論文で坂本貴之は、ラン藻においてP_{II}が光照射下でROSの発生を防ぐ上で重要な役割を果たしていることを初めて報告し、抗酸化剤の存在下でPipXを保持したままP_{II}を欠損させることに成功し、得られたP_{II}単独欠損株を用いて脱抑制状態のPipXが光合成電子伝達反応を強く阻害することを明らかにした。本研究はラン藻の光合成活性の維持におけるP_{II}とPipXの関係を初めて解明したものである。よって、当審査委員会は本論文が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認め合格と判定した。