

主論文の要約

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

氏名 坂本 貴之

光合成は無機物質から有機化合物を合成する反応であり、地球上の生態系の物質的な基盤を支える過程である。光合成生物の生存にとって CO₂ と窒素源である硝酸イオンやアンモニアの同化のバランスを制御することは重要であり、様々な環境条件や栄養条件に応じて、物質輸送系や代謝系の遺伝子発現と活性制御を通して光合成機能の最適化が行われている。P_{II} タンパク質は真正細菌とアーキアを含めた原核生物に普遍的に存在し、窒素と炭素のバランスを検出して窒素同化系を制御している。P_{II} は真正細菌であるラン藻類だけでなく、真核藻類、および高等植物に至るまですべての光合成生物に存在しており、光合成における窒素、炭素同化バランスを決定する重要な因子であるが、その重要性ゆえに変異株を用いた解析が困難であり、ラン藻からはその遺伝子 (*glnB*) の純粋な欠損株が得られていない。その一因として P_{II} が相互作用する調節タンパク質の一つである PipX が、P_{II} 欠損により脱制御状態になって強い毒性を発揮することが推測されているが、PipX が毒性を示す機構は不明である。さらに PipX が欠損していても、P_{II} 欠損に起因する他の障害があり、これらが解析を一層困難にしている。本学位論文は P_{II} の欠損による不具合が酸化ストレスに起因することを明らかにし、それを緩和した条件下で P_{II} の単独変異株の作製法を開発して、PipX のもつ細胞毒性の本質を解析したもので、以下の3つの内容から構成されている。

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 の毒性による生育阻害を受ける。窒素制限条件下では PipX は NtcA と結合するためにその毒性が低下するが、アンモニアが存在する窒素充足条件下では NtcA から解離して特に強い生育阻害を引き起こす。P_{II} と PipX の二重欠損株 (PD4) ではアンモニアの毒性は緩和されるが、それでも依然としてアンモニアに対する感受性が見られることから、PipX とは無関係に P_{II} の欠損によって引き起こされるアンモニア感受性が推定された。そこで、アンモニア培地での生育が改善した PD4 の疑似復帰変異株を単離し、その変異遺伝子を解析して、9種類の遺伝子の変異を見つけた。これらの変異を改めて PD4 に導入してアンモニア耐性を付与するか否

かを確認し、さらに欠損株の性質と比較した結果、細胞内外のイオン輸送に関わる輸送体 2 種、推定プロテアーゼ、機能未知の 2 種のタンパク質の変異が PD4 にアンモニア耐性を付与することが確認された。これらのことから P_{II} が細胞内イオン環境の恒常性の維持に関与している可能性が示された。

2. P_{II} 欠損株のアンモニア感受性における ROS の関与の解明

2-1. P_{II} 欠損と PSII のアンモニア感受性の関係

P_{II} の欠損が光合成機能に及ぼす影響を調べるため、親株である NA3、PipX 欠損株 PX2、および PipX/ P_{II} 二重欠損株 PD4 の光化学系 II (PSII) の活性を比較した。硝酸イオンを窒素源とした場合には、これらの株の PSII 活性の間に差は見られなかった。培養液に 15 mM のアンモニアを添加すると、2 時間後には 3 株全てで 30~40% 程度の PSII 活性の低下が見られたが、その後 NA3 株と PX2 株の PSII 活性はほとんど変化しなかったのに対し、PD4 株の PSII 活性は継続して減少し、アンモニア添加後 4 時間では他の株と比べて有意に低下していた。これらの結果から、P_{II} の欠損により PSII 活性のアンモニアに対する感受性が増大することが明らかになった。

2-2. アンモニアによる活性酸素 (ROS) 発生の誘導と P_{II} 欠損の関係の解析

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、この過程には活性酸素(ROS)が関与することが知られている。そこでスーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) およびヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) 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 ROS の一種である一重項酸素 (1O_2) はヒスチジンと不可逆的に反応して消去されることを利用し、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。結果、NA3 ではアンモニア添加時にも有意な ROS が検出されなかったのに対し、PD4 ではアンモニア添加によって ROS の生成が誘導された。この結果から、P_{II} 欠損株ではアンモニア存在下で ROS が蓄積して酸化傷害を起こし、生育が阻害されている可能性が示された。

2-3. アンモニアによる増殖阻害に対する抗酸化剤の影響の解析

α -トコフェロール (α -TP) は植物や多くのラン藻が合成する抗酸化剤で、フリーラジカルや 1O_2 の消去能力を有している。本研究で用いたすべての変異株の親株である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 は α -TP の生合成能力を欠いているので、外部から α -TP を培地に加えてその影響を調べたところ、アンモニアによる PD4 株の増殖阻害は α -TP によって解消された。以上のことからアンモニア存在下における PD4 株株

の生育阻害は、ROS による酸化傷害を介するものであることが証明された。

2-4. PD4 株が示す ROS に対する過敏性

メチルビオローゲン (MV) は、光化学系 I (PSI) から電子を受けてラジカル (MV \cdot) に還元され、生じた MV \cdot が酸素と反応して ROS を発生させる。硝酸またはアンモニア培地での NA3 株及び PD4 株の生育に対する低濃度 (2.5 μ M) の MV の影響を調べたところ、窒素源に関わらず NA3 株の生育は MV の影響を受けなかったが、PD4 株の生育は MV により阻害された。PD4 の生育に対する MV の阻害効果は、硝酸培地よりもアンモニア培地でより顕著であったが、これは MV とアンモニアの双方に起因して発生する ROS の相乗的な影響によるものと推定された。一方、硝酸培地で生育させた NA3 株と PD4 株に MV を与えた場合には、ROS レベルには有意差が認められなかったにもかかわらず、PD4 の生育にのみ有意な阻害効果が認められたことから、PD4 株は ROS に対して過敏であることが示された。この原因として ROS によって引き起こされる酸化傷害に対する防御システムの活性化に P_{II} が関与する可能性が示された。

3. P_{II} 単独欠損株の作製とそれを用いた PipX の有害性の解析

3-1. P_{II} 単独欠損株の作製法の開発

P_{II} を欠損すると遊離した PipX の毒性に加えて「P_{II} 欠損により引き起こされる PipX 非依存的な傷害」の 2 つが顕在化する。このため、P_{II} 欠損株を単離しようとする、通常は *pipX* にも変異の入った二重変異株しか得られない。窒素制限条件では PipX が転写調節因子 NtcA と結合することで毒性が弱まることに着目し、Chang らは硝酸イオン輸送体の欠損株 (NA3 株) を親株とし、野生型 *pipX* 遺伝子を保持した P_{II} 欠損株 (PD3 株) を、窒素制限条件下で作成することに成功しているが (Chang et al. 2013)、これまで野生株を遺伝的背景とした P_{II} の単独欠損株は得られていなかった。今回、 α -TP によって「P_{II} 欠損により引き起こされる PipX 非依存的な障害」を緩和できることが明らかになったので、窒素十分条件で生育させた野生株 (SPc 株) を親株とし、 α -TP 存在下での *glnB* 遺伝子の不活性化を試み、初めて P_{II} 単独欠損株 (PD1X) の作成に成功した。PD1X は寒天培地上では微小なコロニーを生成したが、液体培地での培養は困難であった。

3-1. クロロフィル蛍光分析による P_{II} 単独欠損株の光合成活性の解析

PD1X は液体培地で増殖しなかったため、顕微鏡に取り付けられたパルス変調 (PAM) 蛍光分光器を用い、寒天培地上の微細コロニーのクロロフィルの蛍光収率を測定することで、光合成活性を調べた。結果、PD1X では、PSII の電子受容体である Q_A の還元が極めて遅く、加えて還元された Q_A の再酸化も遅いことが判明した。この形質は

PipX の欠損株では観察されなかったことから、PipX が光合成電子伝達鎖を、Q_A の上流側においても下流側においても阻害することが判明した。

以上、本学位論文は、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明らかにした。続いて抗酸化剤である α -TP 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、さらに、得られた P_{II} 単独欠損株の顕微蛍光解析により、遊離の 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。自然界では、窒素の欠乏だけでなく、その過剰が光合成生物の生育を阻害する例が多く知られている。実験室で用いられるラン藻はアンモニアに耐性のものが多いが自然界にはアンモニア感受性のラン藻も多い。本研究は、アンモニアがラン藻に対してもつ毒性とそれに対する防御機構の一端を明らかとしたものである。