

氏名・（本籍）	お ^{がわ} ^{きょう} ^こ 小 川 京 子
学位の種類	博 士（理 学）
学位記番号	理 第 1 0 1 2 号
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
最終学歴	昭和53年3月 日本女子大学家政学部卒業
学位論文題目	ホウレンソウ培養細胞の硝酸還元に関する変異株の単離とその解析
論文審査委員	（主査） 教 授 駒 嶺 穆 教 授 四 釜 慶 治 助 教 授 福 田 裕 穂

論 文 目 次

略語一覧表

序論

文献

第1章 ホウレンソウ培養細胞の硝酸還元に関する変異株の単離

緒言

材料及び方法

結果

考察

文献

図表

第2章 硝酸還元に関する変異株の生化学的解析

緒言

材料と方法

結果
考察
文献
図表
第3章 硝酸還元に関する変異株の分子生物学的解析
緒言
材料及び方法
結果
考察
文献
図表
結語
文献
要約
謝辞

論文内容要旨

硝酸塩は高等植物において利用される主要な窒素源である。土壌から吸収された硝酸イオンは硝酸還元酵素により亜硝酸イオンへ、亜硝酸還元酵素によりアンモニアへと還元される。この硝酸同化経路の酵素の発現は硝酸イオン、光、植物ホルモンなどにより影響を受け、複雑に調節されている。

硝酸同化経路の酵素の発現調節機構を解明するために、現在までに多くの研究が行われている。この経路に関与する酵素の中で硝酸還元酵素は経路の第一段階に働き、経路の反応速度を律速している重要な酵素である。しかし高等植物における硝酸還元酵素の発現調節の機構については、不明な点が多く残されている。硝酸還元酵素欠失変異株は、硝酸還元酵素の構造と発現調節機構を研究する上で有効なそして強力な道具であり、硝酸還元酵素欠失変異株を生化学的、分子生物学的に解析することにより、貴重な情報が得られると期待されている。

そこで、本論文ではハウレンソウの培養細胞を材料とし、硝酸還元酵素欠失変異株を選抜、単離し、その生化学的及び分子生物学的特徴について解析した。それらの結果から、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素の発現調節機構について検討を行った。

第1章 硝酸還元に関する変異株の単離

バクテリアやカビで多くの硝酸還元酵素欠失変異株が得られている。高等植物では1973年にシロイヌナズナで初めて単離され、現在では多くの硝酸還元酵素欠失変異株が、タバコ、オオムギ、エンドウ、イネ、ペチュニアなどから単離されている。硝酸還元酵素は、硝酸イオンを亜硝酸イオンに還元する酵素であるが、硝酸イオン(NO_3^-)のアナログである塩素酸イオン(ClO_3^-)をも同様に亜塩素酸イオンに還元する。生成した亜塩素酸イオンは、生体内で毒性を示す。従って硝酸還元酵素活性を有する細胞では塩素酸イオンから亜塩素酸イオンを生成し、そのため植物体は死滅する。一方硝酸還元酵素欠失変異株では塩素酸イオンの還元が起こらないため、塩素酸イオン存在下で生育することができる。また硝酸還元酵素の欠失した変異株は硝酸塩を窒素源として利用できないと考えられる。このような性質を利用して、硝酸還元酵素欠失変異株を選抜することが可能である。

そこでハウレンソウの培養細胞を材料とし、エチルメタンスルホン酸を用いて突然変異を誘発し、硝酸還元酵素欠失変異株の選抜を行った。その結果、塩素酸抵抗性を示す12F株とI-1株の2株が分離され、それらの変異株は硝酸イオンを含む培地では生育できなかった。また硝酸還元酵素活性が確認されないかあるいは非常に低いレベルであったことから、硝酸還元酵素欠失変異株であると考えられる。次に12F株とI-1株の生化学的特徴について調べた。

第2章 硝酸還元に関する変異株の生化学的解析

高等植物の硝酸還元酵素は、約110kDaのサブユニット2個から成るホモ二量体である。1つ

のサブユニットは補欠分子族としてFAD, ヘム, モリブデンコファクター(Mo-Co)をそれぞれ含む3つの機能性ドメイン (FADドメイン, ヘムドメイン, Mo-Coドメイン) から構成されている。硝酸還元酵素はNADH依存硝酸還元活性を有しており, FADドメイン単独で活性を有するNADH依存フェリシアニド還元活性, FADドメインとヘムドメインにより活性を有するNADH依存シトクロームc還元活性, ヘムドメインとMo-Coドメインにより活性を有する還元型フラビヌクレオチド(FMNH₂)依存硝酸還元活性, Mo-Coドメイン単独で活性を有する還元型ブロムフェノールブルー(BPB)依存硝酸還元活性などの部分活性がある。これらの部分活性を測定し, その結果から硝酸還元酵素の変異部分を推定することを試みた。さらに抗硝酸還元酵素ポリクロナール抗体を用いた酵素タンパク質量の測定も行った。その結果, FMNH₂及びBPB依存硝酸還元酵素活性量は, 12F株とI-1株ともに全く検出されなかった。また硝酸還元酵素タンパク質はNADH依存硝酸還元酵素活性と同様に2株とも確認されないかあるいは非常に低いレベルであった。

次に硝酸同化経路上, 硝酸還元酵素の次に位置する酵素である亜硝酸還元酵素の活性及び酵素タンパク質量の測定を行った。その結果, 亜硝酸還元酵素の活性は, 硝酸イオンの添加によって12F株では活性の変動は野生株と同じ傾向になり, 最大活性量が野生株の約35%を示した。一方I-1株の亜硝酸還元酵素活性は硝酸イオンによって誘導されなかった。また亜硝酸還元酵素タンパク質量の変動は12F株とI-1株ともに亜硝酸還元酵素の活性変動と一致していた。

本章で行った硝酸還元酵素の生化学的分析では, 12F株とI-1株の間で硝酸還元酵素についての差異は認められなかった。しかし亜硝酸還元酵素の生化学的分析結果から, 12F株とI-1株は異なるタイプの変異株であることが確認された。しかしながら12F株とI-1株の変異部分を明確にすることができなかった。これらの変異株の変異機構を推定するためには, 硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素のmRNA量を推定する必要がある。そこで, 第3章ではハウレンソウ硝酸還元酵素cDNAのクローニングを行い, 硝酸還元酵素mRNAの解析を試み, また恵与されたハウレンソウ亜硝酸還元酵素cDNAを用いて, その亜硝酸還元酵素mRNAの解析も行った。

第3章 硝酸還元に関する変異株の分子生物学的解析

硝酸還元酵素mRNA量の解析のためには, プロープとして使用できるハウレンソウ硝酸還元酵素cDNAが必要である。そこでハウレンソウcDNAライブラリーを作製し, スタンフォード大学Davis博士より恵与された西洋カボチャ硝酸還元酵素cDNAクローンを使用しスクリーニングを行った。得られたクローンに対してさらにイムノスクリーニングを行い, 硝酸還元酵素cDNAの単離を行った。その結果, 約2.3kbpの硝酸還元酵素cDNAクローン(pSPNR117)を単離した。このcDNAをプローブとして硝酸還元酵素mRNA量をノザンハイブリダイゼーションにより解析した。その結果, 12F株では硝酸還元酵素mRNAは多量に検出された。一方I-1株では硝酸還元酵素mRNAが検出されないかあるいは非常に低いレベルであった。

またゲルフ大学Rothstein博士より恵与されたハウレンソウ亜硝酸還元酵素cDNA(pCB400)

をプローブとして、亜硝酸還元酵素 mRNA 量の解析を同様に行った。その結果、12F 株の亜硝酸還元酵素 mRNA 量は亜硝酸還元酵素活性及びタンパク質量の変動に伴っていた。しかしながら I - 1 株で亜硝酸還元酵素 mRNA は検出されないかあるいは非常に低いレベルであった。

硝酸還元に関する変異株の生化学的及び分子生物学的解析を行った結果から、12F 株と I - 1 株の変異機構と硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素の発現調節について考察をした。表に示すように、12F 株には硝酸還元酵素の活性、及びタンパク質は検出されないが、硝酸還元酵素 mRNA は検出された。また亜硝酸還元酵素の活性、タンパク質量、mRNA 量は硝酸イオンの添加によって培養日数と共に増大した。これらの結果から、12F 株では亜硝酸還元酵素遺伝子に変異はなく、硝酸還元酵素 mRNA からタンパク質への翻訳レベルでの障害が生じていると考えられる。従って 12F 株では硝酸還元酵素の構造遺伝子上に変異がある構造遺伝子変異株であると推定できる。一方、I - 1 株では、硝酸還元酵素の活性、酵素タンパク質、mRNA はともに確認されないかあるいは非常に低いレベルであった。このことは硝酸還元酵素の構造遺伝子に変異があるのではなく、構造遺伝子上流にあると考えられる調節領域に変異があると推定できる。また亜硝酸還元酵素の活性、酵素タンパク質、mRNA は硝酸還元酵素の場合と同様に確認されないかあるいは非常に低いレベルであった。従って亜硝酸還元酵素も構造遺伝子上流の調節領域に変異があると推定できる。このような I - 1 株の分析結果を説明するためには、硝酸還元酵素遺伝子と亜硝酸還元酵素遺伝子の両方の硝酸イオンのシグナルに応答する調節領域に 2 カ所変異が起きたことになる。しかしある特定の 2 カ所に同時に変異が起きる確率は非常に低い値になる。そこで硝酸還元酵素遺伝子と亜硝酸還元酵素遺伝子の調節領域 2 カ所に同時に変異が起きることを全面的に否定することはできないが、本論文で得られた結果は 1 カ所の変異が起きていることを強く示唆し、硝酸還元酵素遺伝子と亜硝酸還元酵素遺伝子は、硝酸イオンのシグナルに対して同じ調節制御を受けていると考えられる。このことは硝酸イオン添加の際の硝酸還元酵素及び亜硝酸還元酵素の両方の発現を調節する遺伝子の存在を示唆しており、I - 1 株は調節遺伝子変異株であると推察される。

現在までに高等植物において硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素を制御する調節遺伝子の存在は知られていない。今後、I - 1 株の遺伝子レベルの詳細な研究により、硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素を制御する調節遺伝子の実態が解明されるものと期待される。

	12F		I-1	
	NR	NiR	NR	NiR
Activity	×	○	△	△
Protein	×	○	△	△
mRNA	○	○	△	△

表：12F株とI-1株の生化学的及び分子生物学的分析結果

○：検出される

×：検出されない

△：確認されないかあるいは非常に低いレベルである。

論文審査の結果の要旨

土壌から吸収された硝酸イオンは、硝酸同化経路によりアンモニアへと還元される。高等植物においてこの経路に関与する酵素の発現調節機構については、不明な点が多く残されている。硝酸還元に関する変異株を利用し、解析することにより貴重な情報が得られると期待される。そこで本論文では、ホウレンソウの培養細胞から硝酸還元酵素欠失変異株を単離し、その生化学的及び分子生物学的特徴について解析を行った。それらの結果から、硝酸還元酵素（NR）と亜硝酸還元酵素（NiR）の発現調節機構について検討を行った。

ホウレンソウの培養細胞は、エチルメタンスルホン酸で突然変異を誘発した後、塩素酸抵抗性による硝酸還元酵素欠失変異株の選抜を行った。その結果、塩素酸抵抗性を示す12F株とI-1株が分離され、それらの変異株は硝酸イオンを含む培地では生育できなかった。またNR活性が、12F株では検出されず、I-1株では極めて低いレベルであったことから、硝酸還元酵素欠失変異株であると考えられた。得られた変異株のNRとNiRについて、活性、酵素量とmRNA量の測定を行った。12F株では、NRの活性と酵素量は検出されないにもかかわらず、培地中への硝酸イオンの添加によりNRmRNA量は、野生株のNRmRNA量よりも多量に検出された。またNiRの活性と酵素量及びmRNA量は、硝酸イオンの添加によって培養日数と共に増大した。従って特にNiRに変異はないと考えられ、NRmRNAからタンパク質への翻訳レベルで障害が起きていると考えられる。12F株はNRの構造遺伝子上に変異の生じた構造遺伝子変異株であると推定される。一方、I-1株はNR及びNiRともに活性、酵素量及びmRNA量は、極めて低いレベルであった。この極めて低いレベルmRNA量は、各々の構造遺伝子からmRNAへの転写の段階で変異の影響が出ているためであると考えられる。このI-1株の分析結果から、硝酸イオンのシグナルを伝達するカスケードがあり、NR及びNiR遺伝子とは独立した遺伝子がNR及びNiR両方の発現を調節するというモデルを考えた。つまりI-1株は硝酸イオンのシグナルを伝達するカスケードに関与するタンパク質をコードしている遺伝子のどれか1つに変異が生じているためにNR及びNiR遺伝子が転写を開始できないことになる。このことは硝酸イオン添加の際のNR及びNiRの両方の発現を調節する遺伝子の存在を示唆しており、I-1株は調節遺伝子変異株であると推察される。

現在までに高等植物においてNRとNiRを制御する調節遺伝子の存在は知られていないことから、今後調節遺伝子変異株であるI-1株の遺伝子レベルの詳細な研究によりNRとNiRを調節制御する遺伝子の実態が解明されるものと期待される。上述の知見は、植物生理学における重要な知見であり、かつ本人が自立して研究活動を行うに十分な高度の研究能力と学識を有することを示すものである。よって、小川京子の論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。