

論文の内容の要旨

論文題目 シアノバクテリアを用いた光化学系 II 複合体におけるホスファチジルグリセロールの機能解析

氏名 遠藤嘉一郎

シアノバクテリアのチラコイド膜には、4種類の脂質 (MGDG, DGDG, SQDG, PG) が存在することがわかっている。ホスファチジルグリセロール (PG) は、チラコイド膜に存在する脂質分子の中で唯一のリン脂質であり、チラコイド膜の脂質二重層を形成するだけでなく、光合成装置にも組み込まれており、光合成において重要な機能を担っていると考えられている。近年、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* より精製された光化学系 II 複合体 (PSII) の結晶構造が 1.9 Å の分解能で明らかとなり、PSII には PG が 5 分子存在していることが見出された (Umena et al, 2011)。一方、当研究室の先行研究において、PG の合成が欠損した変異株 (*pgsA*) は PG を添加した培地では正常に増殖できるが、PG を添加していない培地では PG の含有量が低下して生育できないことが明らかとなった。また、この変異株を用いて、PSII における PG の機能が解析され、PG は光合成機能の維持に必要不可欠であり、PG が欠乏した *pgsA* 株では Q_B の酸化還元電位の低下や一部の表在性タンパク質が解離していることが明らかになった (Sakurai et al, 2007)。

PG 欠乏状態の *pgsA* 株の PSII 複合体では PG が 3 分子欠損しているため (通常は 6 分子存在)、PSII の機能が障害を受けたことが明らかになった。しかし、PSII における PG の重要性が明らかになったものの、PSII に存在する PG 1 分子ごとの役割はわからなかった。そこで、本研究では結晶構造の中で確認されている 5 つの PG 分子 (PG664, PG694, PG702, PG714, PG772) を対象に、各 PG 分子と水素結合していると予想されるタンパク質のアミノ酸残基を見つけ出し、それらのアミノ酸残基を改変した変異株を作製した。そして、作製した変異株の中で、PG664、PG694、PG772 と相互作用しているアミノ酸残基

を改変した変異株について性質を調べ、各 PG 分子が PSII で果たしている機能を解析した。さらに、それらの変異株の PSII における構造変化を X 線結晶構造解析で確認するための準備として、*Thermosynechococcus elongatus* BP-1 において PG 合成欠損株 (*pgsA* 株) を作製し、その変異株の解析を行った。

Q_A 近傍に存在する PG664 と PG694 の機能

D1 の Ser-232 と Asn-234 のアミノ酸残基は、PG664 と PG694 のリン酸やグリセロール骨格の酸素と水素結合していると考えられる。これらのアミノ酸残基を改変した S232A、N234D、S232AN234D 変異株は通常光下では光独立的に増殖できるが、コントロール株と比べてやや遅い増殖速度を示した。クロロフィル蛍光の減衰を利用して、作製した変異株の PSII における Q_A から Q_B への電子伝達速度を測定した結果、変異株では電子伝達速度が低下していることが明らかになった。この電子伝達速度の低下が、Q_A と Q_B のどちらに起因しているかを明らかにするために、熱発光スペクトルを測定した。3 つの変異株では S₂-Q_B⁻ の電荷再結合に由来する B バンドのピーク温度が、コントロール株に比べ低温側にシフトしていた。一方、S₂-Q_A⁻ 由来の Q バンドは、コントロール株と変異株とで違いがなかった。これらの結果から、Q_B の酸化還元電位が低下していることが示唆され、それによって Q_A と Q_B の酸化還元電位の差が小さくなり、Q_A から Q_B への電子伝達速度が遅くなったと考えられる。

本研究で作製した変異株では、PSII 複合体の一部である CP47 に 6×ヒスチジンタグを導入しているため、Ni-アフィニティーカラムにより PSII の単離を簡単に行える。精製した PSII ダイマーから全脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで各脂質クラスに分離した。分離したそれらの脂質をガスクロマトグラフィーで分析し、各脂質を定量することで PSII 複合体に存在する脂質分子数を調べた。S232AN234D 変異株ではコントロール株と比べ、PSII 単量体あたり約 1 分子の PG が減少していた。PG が減少した分、変異株では MGDG が増加していた。また、精製した PSII 複合体をグリセロール密度勾配遠心法により、モノマーとダイマーに分離した。SDS-PAGE により、モノマーとダイマーに含まれるタンパク質を解析した結果、変異株のモノマーでは表在性タンパク質である P_{sbV} と P_{sbU} が減少していた。一方で、変異株の PSII モノマーでは P_{sb28} のバンドが増加していた。表在性タンパク質の減少と P_{sb28} の蓄積は PG 欠乏状態で培養した *pgsA* 株でも観察されたことから、PG は P_{sbV} や P_{sbU} の表在性タンパク質の PSII 複合体への結合に必要であることが示唆された。

Q_B 近傍に存在する PG772 の機能

P_{sbE} に存在する Ser-11 は Q_B 近傍に存在する PG772 のリン酸基の酸素、また、Thr-5 は PG772 のグリセロール骨格の酸素と水素結合していると予想できる。作製した S11A、S11D、S11T、T5A、T5S、T5V 変異株は通常光下では光独立的に増殖できるが、Net の光

合成活性 (H_2O から CO_2) は若干減少していた。クロロフィル蛍光の減衰を利用して、作製した変異株の PSII における Q_A から Q_B への電子伝達速度を測定した結果、 Q_A から Q_B への電子伝達に大きな影響はなかった。これらの変異株は先ほどの Q_A 近傍の PG との相互作用を部位特異的の変異によって変化させた変異株とは異なり、PSII の電子伝達に直接寄与していなかった。しかし、人工の電子受容体 (BQ、DMBQ、DCBQ) を添加して PSII の光合成活性を測定すると、変異株の PSII 活性はコントロール株と比べ大幅に低下していた。PG772 と相互作用するアミノ酸残基の変異株では Q_B 結合サイト周辺の状態に影響を及ぼしていることが示唆された。さらに S11A、T5A 変異株では PSII 活性を測定する際、重炭酸イオンを添加することで変異株の PSII 活性は回復した。このことから、変異株では還元された BQ のプロトン化が起これず、新たな BQ と交換できず、還元された BQ が Q_B 結合サイトに結合したままの状態になってしまうため、PSII 活性が阻害されると考えられる。

コントロール株、S11A 変異株、T5A 変異株から PSII を精製し、PG の定量を行った。酵素アッセイ法を利用して PG を分解し、蛍光試薬である Amplex red の蛍光値を測定することで、PSII 複合体の定量を行った。しかし、コントロール株と変異株の PG 分子の量に有意差は見られなかった。変異株では PG 分子と PSII との相互作用が部位特異的の変異によって変化しているものの、PG が解離するには至っていないものと考えられる。また S11A、T5A 変異株では表在性タンパク質の PsbV と PsbU が大きく減少していることが PSII の SDS-PAGE の結果から明らかになった。PG664 と PG694 に関する変異株でも同様の結果が得られていることから、PG664、PG694 と PG772 はそれぞれ表在性タンパク質である PsbV と PsbU の結合の安定化に寄与していると考えられる。

好熱性シアノバクテリアの PG 合成欠損株の解析

T. elongatus BP-1 のような好熱性シアノバクテリアから精製した光化学系複合体は、安定性が高いことから、X 線結晶構造解析が可能である。しかしながら、好熱性シアノバクテリアでは脂質合成の欠損株など、脂質の研究を目的とした変異株は一切作製されていない。そこで、好熱性シアノバクテリアでも PG の機能が保存されているかを調べるために、*T. elongatus* から PG 合成欠損株を作製して解析した。PG 合成欠損株は *pgsA* と予想された *tll1275* 遺伝子に *SpeI* Str 耐性遺伝子カセットを導入することで作製した。作製した変異株は PG を添加した培地では野生株と同様に増殖できるが、PG を添加していない培地では全く増殖できなかった。変異株の細胞を PG が含まない培地に移して培養すると、7 日目で細胞内の PG がほぼ欠損していた。これらの結果から、*tll1275* 遺伝子が *T. elongatus* の *pgsA* 遺伝子に相当し、この株の増殖にも PG が必要不可欠であることが明らかとなった。また、PG 欠乏状態の変異株からチラコイド膜を精製し、BN-PAGE を用いて光合成のタンパク質複合体の状態を解析した。PG 欠乏状態の変異株では、PSII の単量体が蓄積していた。これらの現象は先行研究において、*Synechocystis* の *pgsA* 変異株でも確認されているため、好熱性シアノバクテリアでも PG の機能が保存されているものと考えられる。