

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 遠藤嘉一郎

地球上の殆ど全ての生物は、植物やシアノバクテリアなどが行う光合成に依存して生命活動を行っている。光合成の初期反応はシアノバクテリアの細胞や植物の葉緑体にあるチラコイド膜でおこり、太陽からの光エネルギーが生物の利用できる化学エネルギーへと変換される。このチラコイド膜は、おもに脂質とタンパク質から構成されており、脂質としては4種類のグリセロ脂質、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、ホスファチジルグリセロール (PG) が存在する。これらの脂質は、チラコイド膜の基本構造である脂質二重層を形成するだけでなく、光合成を担っているタンパク質複合体(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。X線結晶構造解析により、シアノバクテリアの光化学系I複合体の三量体には、単量体あたり3分子のPGと1分子のMGDGが結合しており、光化学系II複合体(PSII)の二量体には、6分子のMGDG、5分子のDGDG、4分子のSQDG、5分子のPGが結合していることが明らかとなっている。しかし、それらの複合体における各脂質分子の機能はまだよくわかっていない。本博士論文では、チラコイド膜に存在する唯一のリン脂質であり、PSIIの二量体に単量体あたり5分子結合しているPG分子に注目し、1分子ごとの機能解析が行われた。

PSIIにおけるPG分子の機能は、これまでの先行研究において、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて作製された、PGの合成が欠損した変異株である *pgsA* を使って解析が行われた。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* 株ではプラストキノンの Q_A から Q_B への電子伝達速度が低下することや Mn-Ca クラスターを安定化している表在性タンパク質がPSIIから解離することなどが明らかになっている。しかし、PSIIにおけるPGの重要性は明らかにされたものの、PSIIに存在するPG1分子ごとの機能までは明らかにされていない。

そこで、本博士論文ではPSIIの結晶構造において確認されている5つのPG分子 (PG664, PG694, PG702, PG714, PG772) について、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が作製された。そして、作製された変異株の性質を詳しく調べることで、PG1分子ごとの機能が解析された。

本論文の1章では、序論として、光合成の概要、脂質の合成経路、これまでの研究によって明らかにされた光合成における脂質の機能、本博士論文の目的がまとめられている。

本論文の2章では、 Q_A 近傍に存在するPG664とPG694の機能について、それらのPG分子内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D1タンパク質のSer-232とAsn-234のアミノ酸残基を改変したS232A、N234D、S232AN234D変異株を作製し、機能解析が行われた。これらの変異株は、通常光下では光独立栄養的に増殖できるが、コントロール株と比べてやや増殖が遅く、PSIIにおける Q_A から Q_B への電子伝達速度が低下していることが明らかにされた。熱発光スペクトルの測定結果から、変異株では Q_B の酸化還元電位が低下していることが明らかとなり、この知見により、 Q_A と Q_B の酸化還元電位の差が小さくなることで、 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た。また、変異株から精製したPSIIダイマーに存在する脂質分子数の解析から、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、PGが減少した分、MGDGが増加していることが明らかにされた。さらに、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単量体と二量体に分離し、タンパク質を分析したところ、変異株の単量体では表在性タンパク質であるPsbVとPsbUが減少しており、変異株の単量体ではPsb28のバンドが増加していた。これらの結果から、PGはPsbVやPsbUといった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。

本論文の3章では、 Q_B 近傍に存在するPG772の機能が解析された。PsbEの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されたので、各アミノ酸残基を改変した、S11A、S11D、S11T、T5A、T5S、T5Vが作製された。これらの改変株は通常光下では光独立栄養的に増殖できるが、Netの光合成活性(H_2O から CO_2)は若干減少し、 Q_A から Q_B への電子伝達には大きな影響はなかった。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することから、人工の電子受容体によってPSIIの活性が阻害されることが明らかとなった。これは、 Q_A 近傍に存在するPG664やPG694と相互作用するアミノ酸残基を改変した変異株でも見られた現象である。これらの変異株では、 Q_B 結合サイト周辺の状態が影響を受けていることが示唆された。また、コントロール株、S11A変異株、T5A変異株からNi-アフィニティーカラムによりPSIIを精製し、PGの定量が行われたが、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つ

た。変異株では PG 分子と PSII との相互作用が部位特異的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。さらに、S11A と 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が示唆された。

本論文の 4 章では、好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 から PG 合成欠損株が作製され、PG の機能解析が行われた。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り、PG 分子が欠損したときに起こる PSII の構造変化を解析するのに優れた材料である。しかし、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これまで一切作製されていない。そこで、本章では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が行われた。PG 合成欠損株は *pgsA* と予想された *tll1275* 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を導入して破壊することで作製された。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いことが明らかとなった。このことは、この株においても PG が増殖に必要不可欠であることを示している。また、PG 欠乏状態の変異株におけるタンパク質複合体の状態の解析から、PSII の二量体が大幅に現象し単量体が蓄積していることが明らかとなった。これらの結果は、*Synechocystis* と同様に、*T. elongatus* でも PG の機能が保存されていることを示している。将来的には、この株を使って *Synechocystis* sp. PCC 6803 と同様に部位特異的変異株を作製して X 線結晶構造解析をすることにより、PG 分子の欠損による PSII の構造変化を明らかにできるものと期待される。

以上のように、本博士論文の研究では、PSII に存在する PG 分子について、1 分子ごとの機能が解析され、PG 分子の重要性が明らかにされた。本博士論文によって得られた研究成果は、光合成・植物生理学の研究分野に貴重な知見を提供するものであり、高く評価することができる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。