

博士論文（要約）

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

遠藤 嘉一郎

東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻

生命環境科学系

略語

ATP	アデノシン三リン酸
BN	ブルーネイティブ
BQ	<i>p</i> -ベンゾキノン
CBB	クマシーブリリアントブルー
CDP-DG	シチジン 5'-二リン酸-ジアシルグリセロール
Chl	クロロフィル
Cm	クロラムフェニコール
Cm ^R	クロラムフェニコール耐性遺伝子カセット
Cyt	シトクロム
DCBQ	2,6-ジクロロベンゾキノン
DCMU	3-(3,4-ジクロロフェニル)-1,1-ジメチル尿素
DG	ジアシルグリセロール
DGDG	ジガラクトシルジアシルグリセロール
DM	<i>n</i> -ドデシル β -D-マルトシド
DMBQ	2,6-ジメチルベンゾキノン
Er	エリスロマイシン
Er ^R	エリスロマイシン耐性遺伝子カセット
Fecy	フェリシアン化カリウム
G3P	グリセロール 3-リン酸
GC	ガスクロマトグラフィー
GlcDG	モノグルコシルジアシルグリセロール
Km	カナマイシン
Km ^R	カナマイシン耐性遺伝子カセット
LPA	リゾホスファチジン酸
MGDG	モノガラクトシルジアシルグリセロール
NADP	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
PA	ホスファチジン酸
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PG	ホスファチジルグリセロール

PGP	ホスファチジルグリセロールリン酸
PSI	光化学系 I
PSII	光化学系 II
Tc	テトラサイクリン
Tc ^R	テトラサイクリン耐性遺伝子カセット
TLC	薄層クロマトグラフィー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SQDG	スルホキノボシルジアシルグリセロール
Str	ストレプトマイシン
Spe	スペクチノマイシン
Spe/Str ^R	スペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性遺伝子カセット
UDP	ウリジン二リン酸

共著者の意向により 3 章は除外

1 章

序論

1-1. 光合成とは

光合成とは光エネルギーを利用して大気中や海中に存在する二酸化炭素を炭素源として有機物を合成する反応である。その反応過程で水を分解して酸素を発生させる。それまで嫌気条件であった地球に酸素をもたらしたのが光合成である。光合成によって大気に放出された酸素は真核生物を陸上へと進出させた。シアノバクテリアの光合成は約 38 億年前から存在する、実に効率の良い光エネルギーから化学エネルギーへと変換するシステムであることから、光合成の仕組みを理解することは重要な課題である。しかし光合成の研究は、分子間のエネルギーの伝達やタンパク質構造などのミクロのレベルから、植物の植生というマクロのレベルの研究まで幅が広い。本研究では光化学系 II (PSII) に存在する PG 分子の機能解析という分子レベルの解析に挑戦した。

1-2. 光合成の初期反応

光合成の初期過程はシアノバクテリアや植物の葉緑体に存在するチラコイド膜上で起こり、アンテナタンパク質 (植物の場合は集光タンパク質複合体 (LHC)、シアノバクテリアの場合はフィコビリゾーム) によって吸収された光エネルギーは、光化学系 I (PSI) と PSII へと伝達される。PSII によって励起された電子はシトクロム *b₆f* (Cyt *b₆f*) 複合体、PSI へと伝わり、最終的に NADP⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) が還元されて NADPH が合成される。光合成の電子伝達反応において発生したプロトンを利用して ATP (アデノシン三リン酸) 合成酵素が ATP を合成する (Johnson 2016) (図 1)。

PSII がアンテナタンパク質から受け取った光エネルギーは PSII の反応中心へ

と伝わり、反応中心クロロフィルの P680 を励起する。それにより P680 が電荷分離を起こして生じた電子は、PSII 内のフィオフィチン *a*、プラストキノンである Q_A と Q_B に伝達される。2つの電子を受け取った Q_B はプロトン化され、プラストキノールへと変化し、Q_B 結合サイトから解離する。その後、Q_B 結合サイトにはプラストキノンプールから新たなプラストキノンが供給される (Renger and Renger 2008)。電子を受け取ったプラストキノンは Cyt *b₆f* 複合体へと電子を伝達する。Cyt *b₆f* 複合体は、二量体を形成しており、主に Cyt *f*、Cyt *b₆*、リステ型鉄イオウクラスタータンパク質、サブユニット IV で構成されている (Cramer et al. 2006)。PSII から遊離したプラストキノンはリステ型鉄イオウクラスタータンパク質 Cyt *f* を経由してプラストシアニンに 1 個の電子を渡す。プラストキノンのもう 1 つの電子は Cyt *b₆* のヘム *b_H*、ヘム *b_L* に伝わり、酸化型プラストキノンに渡されるというキノン回路を形成する (Dumas et al. 2016)。キノン回路では 1 電子が PSI に流れるときに 2 つの H⁺ をルーメン側に輸送できるため、ATP 合成にとって重要な経路になっている。

プラストシアニンの電子は PSI の反応中心クロロフィルである P700 に伝達される。PSI が電荷分離を起して生じた電子はフィロキノンに伝達され、3 種類の鉄イオンクラスタータンパク質である F_X、F_A、F_B に伝達される (Nelson and Yocum 2006)。PSI 複合体は約 12 個のサブユニットから構成されており、シアノバクテリアの PSI は通常三量体を形成している。PSI の反応中心タンパク質である PsaA と PsaB、フェレドキシンとの結合に関与している PsaC、PsaD と PsaE、また、三量体の形成に必要な PsaL、PsaI や PsaM などが存在している。PSI 複合体には色素分子やフィロキノンの他に脂質分子も存在しており、2001 年の *Thermosynechococcus*

elongatus の PSII の X 線結晶構造解析により、モノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG) が 1 分子、ホスファチジルグリセロール (PG) が 3 分子存在していることが明らかになった (Jordan et al. 2001)。最終的にはフェレドキシンが PSI から電子を受け取り、これを利用して NADP^+ を還元して NADPH を合成する。

1-3. 光化学系 II

PSII 複合体はタンパク質、クロロフィルや β -カロテンなどの色素分子、マンガナルシウムクラスター、脂質分子などから構成される超分子複合体である (図 2)。PSII 複合体は数多くのサブユニットから構成されており、反応中心タンパク質である D1 と D2 タンパク質、アンテナタンパク質である CP47 と CP43 が存在している。そして、ルーメン側には表在性タンパク質が存在し、シアノバクテリアは PsbO、PsbV と PsbU であるが、植物は PsbO、PsbP と PsbQ で構成されている。また、PsbE (α -サブユニット) と PsbF (β -サブユニット) から構成されるヘムタンパク質であるシトクロム b_{559} など、他にも約 12 の小サブユニットが PSII 複合体の内在性タンパク質として存在しており、多くの小サブユニットが高等植物とシアノバクテリアで共通している (Pagliano et al. 2013)。PsbO はマンガナルクラスターの結合の安定化に関わっており、PsbO は安定的で効率の良い酸素発生には必要不可欠とされている (Enami et al. 2008)。一方でシアノバクテリアの表在性タンパク質である PsbV は PsbO の反対側に存在していて、PsbU は PsbO と PsbV の間に位置している。PsbV は PsbO と直接結合していないが、PsbU を介して間接的に PsbO と相互作用している。

PSII コアに伝えられるエネルギーは、PSII 複合体に結合する集光性タンパク質複合体によって集められる。集光性タンパク質複合体は生物種間で異なっており、シアノバクテリアの場合はフィコビリソーム、高等植物では LHCII である。フィコビリソームはコアタンパク質であるアロフィコシアニン、ロッドリンカータンパク質のフィコシアニンとフィコエリスリンで構成される (MacColl 1998)。フィコビリソームはチラコイド膜表面を移動でき、主に集めた光エネルギーを主に PSII に渡すが、PSI にもエネルギーを渡すことができる。

PSII 複合体のマンガククラスターは4つのマンガン原子から構成されており、 H_2O から電子を引き抜き、D1 タンパク質に存在するチロシン Z (TryZ) に渡す。この電子を利用して電荷分離によって生じた $P680^+$ は再還元される。酸素発生の場所であるマンガククラスターでは2分子の H_2O が分解し、1分子の O_2 が発生するために4つの電子を引き抜く必要があり、この反応はマンガククラスターのマンガンの価数を変化させることで実現される (Vinyard et al. 2013)。マンガククラスターの状態は $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4$ の状態へと変化してまた S_0 に戻るというサイクルを繰り返す (図 1)。一回の閃光によりサイクルの反応の1ステップが進行する。暗所では S_0 と S_1 の状態が安定であり、 S_2 と S_3 は逆反応で S_1 に戻ることがあることから、暗所ではほとんどのマンガククラスターが S_1 の状態にある。その後、反応が進行し S_4 から S_0 に戻る段階で酸素分子が発生する。プロトンは S_0 から S_1 の際に1個、 S_2 から S_3 で1個、 S_3 から S_0 で2個、チラコイド膜のルーメン側に放出され、生じたプロトンはチラコイド膜のプロトン濃度勾配の形成に寄与する。

1-4. シアノバクテリアの脂質

植物の葉緑体やシアノバクテリアのチラコイド膜は糖脂質である 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) とリン脂質である PG で構成されている (Block et al. 1983, Dorne et al. 1990, Somerville et al. 2000)。チラコイド膜は全脂質量の 60~80%程度をガラクト脂質である、MDGD と DGDG で占められており、残りは SQDG と PG で占められている。また極性頭部に負電荷を有している SQDG と PG は酸性脂質に分類され、ガラクト脂質である MGDG と DGDG では担えない特殊な機能を持つことが示唆されている。シアノバクテリアにおける脂質合成ではまず初めにグリセロアルデヒド 3-リン酸 (G3P) の *sn*-1 位に G3P アシルトランスフェラーゼの働きにより、アシルリン酸 (Acyl-P) から 18:0 (コロンの前の数字は炭素数、後の数字は二重結合の数を示す) もしくは 16:0 が転移し、リゾホスファチジン酸 (LPA) が生成する (図 3)。次に LPA の *sn*-2 位に LPA アシルトランスフェラーゼの働きにより 16:0 がアシル-アシルキャリア-プロテイン (Acyl-ACP) から転移し、ホスファチジン酸 (PA) が合成される (Weier et al. 2005)。リン脂質である PG の合成では、まず PA からシチジン 5'-二リン酸-ジアシルグリセロール (CDP-DG) 合成酵素の働きにより (CDP-DG) が合成される。この CDP-DG は PGP 合成酵素により PGP (PG リン酸) に変化し、さらに PGP ホスファターゼにより最終的に PG が合成される (Mizusawa and Wada 2012)。一方、糖脂質の合成では、PA が PA ホスファターゼによりジアシルグリセロール (DG) に変換される。SQDG は、SQDG 合成酵素の働きでウリジン二リン酸 (UDP) -スルホキノボースから DG にスルホキノボースが転移することで合成される。この

UDP-スルホキノボースは、UDP-グルコースから UDP-スルホキノボース合成酵素によって合成される (Shimojima 2011)。ガラクト脂質である MGDG と DGDG は、まず DG に UDP-グルコースからグルコースが転移されることにより、モノグルコシルジアシルグリセロールが (GlcDG) が合成される。その後、エピメラーゼによって GlcDG のグルコースがガラクトースに異性化して MGDG が合成される (Awai et al. 2014)。その後、DGDG 合成酵素の働きによりもう 1 分子のガラクトースが UDP ガラクトースから転移して MDGD から DGDG が合成される (Sakurai et al. 2007, Awai et al. 2007)。

1-5. 光合成における糖脂質の機能

糖脂質である MDGD、DGDG、SQDG はそれぞれ光合成において重要な役割を担っている。ガラクト脂質である MGDG と DGDG はチラコイド膜の全脂質量の 60~80%を占めていることから、チラコイド膜の形成に必要不可欠である。シアノバクテリアにおいて MGDG の合成を欠損させると、DGDG も欠損させることになるので、MGDG の欠損株は単離できていない。しかし GlcDG から MGDG を合成する MgdE の遺伝子をノックアウトした変異株 (*mgdE* 株) が *Synechocystis* sp. PCC 6803 から単離された (Awai et al. 2014)。この変異株は MGDG と DGDG を合成することができず、代わりに GlcDG が細胞中に 60%以上存在している。ガラクト脂質が欠損しているにも拘らず、変異株ではある程度高い光合成活性を有しており、細胞のチラコイド膜も正常に形成する。このことは、ガラクト脂質が光合成には必須ではなく、GlcDG によって機能が相補できることを示唆している。シロイヌナズナでは MGDG 合成酵素は 3 種類存在

し(MGD1, MGD2, MGD3)、葉における主要なMGDG合成酵素はMGD1である。MGD1の遺伝子発現が25%程度まで低下した*mgd1-1*変異体ではMGDGの含量が野生株の40%程度に減少しているが(Jarvis et al. 2000, Aronsson et al. 2008)、PAMで測定したPSII活性(Fv/Fm)は野生株とほぼ同じであった。しかし、*mgd1-1*のPSIIは光阻害を受けやすく、強光下で熱放散が抑制されていた。*mgd1-1*変異体ではチラコイド膜のルーメン側での酸性化が野生株に比べて低下しており、キサントフィルサイクルの活性が抑制された結果、熱放散も抑制したと考えられる。ガラクト脂質の合成が大幅に低下する*mgd1-2*変異体では、チラコイド膜の形成が阻害されているため(Kobayashi et al. 2007)、光合成の詳細な解析は行われていない。

Synechocystis sp. PCC 6803のDGDG合成酵素を欠損させた変異株(*dgdA*株)ではDGDGを全く合成できないものの、野生株と同様に生育できる(Sakurai et al. 2007, Awai et al. 2007)。桜井らはCP47に導入したヒスチジンタグを利用し、*dgdA*変異株からPSIIを精製した。精製した変異株のPSIIでは、表在性タンパク質であるPsbO、PsbV、PsbUが減少していた。ただし、PsbUは*in vivo*でも機能的に結合していなかったが、PsbOとPsbVに関してはPSIIを精製する段階でPSIIから解離しやすくなっていることが判明した。表在性タンパク質の結合が不安定になっていることから、*dgdA*変異株では高温や強光条件下での生育やPSIIの修復過程が阻害されることも明らかになった(Mizusawa et al. 2009a, Mizusawa et al. 2009b)。また変異株ではCP43が解離したPSII単量体が蓄積することも分かった(Sakata et al. 2013)。

シロイヌナズナにはDGDG合成酵素が2種類存在し(DGD1とDGD2)、それ

ぞれの合成酵素の欠損変異体の解析から、通常の条件下では DGD1 によって DGDG の合成が担われていることが明らかになった。DGDG の含量が野生株の 10%程度まで減少している *dgd1* 変異体では (Dörmann et al. 1995)、野生株と比べて PSII と PSI の比が大きく変化している。また *dgd1* と *dgd2* を掛け合わせた *dgd1dgd2* 二重変異体の表現型は *dgd1* の表現型と比べて顕著で、PSII では P680⁺ と Q_A⁻の電荷再結合に影響があることが報告されている (Reifarh et al. 1997, Steffen et al. 2005)。DGDG の欠損は PSI 複合体にも影響を与え、*dgd1* 変異体を使った解析では PSI 複合体のサブユニットである PsaD と PsaE が減少することが明らかになっている (Guo et al. 2005)。また Ivanov ら (2006) の研究では PSI の PsaA、PsaB、PsaL と PsaH の減少やアクセプター側における阻害が確認されている。

Synechocystis sp. PCC 6803 と *Synechococcus* sp. PCC 7942 において UDP-スルホキノボース合成酵素遺伝子 (*sqdB*) を破壊することで、SQDG 合成欠損株が作製されている (Güler et al. 1996, Aoki et al. 2004)。これらの変異株には大きな違いがある。*Synechocystis* の *sqdB* 変異株は、SQDG を添加していない培地では生育できないのに対し、*Synechococcus* の *sqdB* 変異株は、培地への SQDG 添加の有無に拘らず生育できる。*Synechocystis* の *sqdB* 変異株では、3-(3, 4-ジクロロフェニル)-1, 1-ジメチル尿素 (DCMU) への感受性が野生株に比べて高く、PSII 活性が大きく低下することから、SQDG が PSII の電子伝達反応に関与していることが示唆されている。一方、シアノバクテリアの SQDG 含量は種によって大きく異なり、また、培地に含まれるリンや硫黄の濃度によっても含量が大きく変動することが知られている (van Mooy et al. 2006)。これらの知見は、シアノバ

クテリアの種によって生育や光合成に対する SQDG の要求性が異なることを示している。

SQDG が欠損したクラミドモナスの変異株 (*hf-2*) では、 Q_B 結合サイトの構造が変化することにより、PSII 活性が野生株の 30~40%程度まで減少することが報告されている (Sato et al. 1995, Minoda et al. 2002)。また、同変異株の解析から、SQDG は表在性タンパク質やマンガングラスタの安定化にも寄与していることが示唆されている (Minoda et al. 2003, Sato et al. 2003)。

SQDG 合成酵素の遺伝子である *SQD2* を欠損したシロイヌナズナの変異体 (*sqd2*) は、完全に SQDG 合成活性が欠損している (Yu et al. 2002)。この *sqd2* 変異体は、通常の培養条件下では野生株と同様に生育し、PSII 活性 (Fv/Fm) にも変化が見られない。しかし、この *sqd2* 変異体と PG 合成のノックダウン変異体 (*pgp1-1*) との二重変異体 (*sqd2pgp1-1*) では、PSII 内の Q_A^- の再酸化が起こりにくくなることや、DCMU に対する感受性が高まることが報告されており (Yu and Benning 2003)、SQDG は通常条件下では PSII に必要ないが、PG が欠損したときには必要であることが明らかになっている。

1-6. 光合成における PG の機能

シアノバクテリアでは PG 合成欠損株としてシチジン 5'-二リン酸-ジアシルグリセロール (CDP-DG) 合成酵素とホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP) 合成酵素遺伝子を欠損させた変異株、*cdsA* と *pgsA* が単離されている (Sato et al. 2000, Hagio et al. 2000) (図 3)。これらの変異株は培地に PG を添加しないと全く生育できない。培地に十分な量の PG を添加しておくことにより、変異株は野

生株と同程度の増殖を示す。これらの変異株を用いた PG の機能解析では PG を添加した培地で培養した細胞を PG 無添加の培地に移して増殖させ、そのときに細胞あたりの PG 含量の低下に伴って起こる、光合成活性の変化が調べられている。特に、PG 含量が低下すると、その影響はおもに PSII で見られ、 Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されることで光合成活性が低下することが判明した (Gombos et al. 2002)。また PG は PSII の二量体化や PSII 複合体への表在性タンパク質の結合にも重要であることが明らかになった。PG を添加していない培地で *pgsA* 変異株を長期間培養することにより PSI の活性も徐々に減少する (Domonkos et al. 2004)。シアノバクテリアの PSI 三量体には単量体当り 3 分子の PG が存在していることが X 線結晶構造解析から明らかになっている (Jordan et al. 2001)。そのうち、1 分子の PG がコアタンパク質付近に存在し、残りの 2 分子は単量体同士の界面に局在している。PsaL の近傍に 1 分子の PG が存在していることから、PG が減少すると PsaL が PSI から解離し、単量体 PSI が蓄積した (Domonkos et al. 2004)。しかし PG を培地に再添加して培養することで、PsaL が PSI 複合体に再結合して三量体 PSI が形成される (Domonkos et al. 2004)。

シロイヌナズナでは PGP 合成酵素をコードしている *PGP1* 遺伝子に点変異をもつ *pgp1-1* 変異体 (Xu et al. 2002) と T-DNA が挿入された *pgp1-2* 変異体が分離されている (Hagio et al. 2002, Babiychuk et al. 2003)。*pgp1-1* は野生株に比べて 70%、*pgp1-2* は 20% 程度の PG を含んでいる。*pgp1-1* では葉の表現型が黄緑色にはなるが、光合成活性自体はそれほど変化しない。一方、*pgp1-2* は厳しい表現型を示し、葉緑体の発達が大きく阻害され、光合成活性の著しい低下が起こり、培地にショ糖が含まれていないと生育できない。この *pgp1-2* 変異

体をリン欠乏培地で生育させることにより、PGの量が減少し、代わりにその他の糖脂質の割合が増加することが明らかになった (Kobayashi et al. 2014)。また、リン欠乏培地で *pgp1-2* 変異体を生育させると、リンが培地に含まれている時よりもクロロフィルの合成や葉緑体形成は促進されるが、PSIIの機能は低下した。このことは、糖脂質はPSIIにおけるPGの機能を相補できないことを示唆している。

1-7. PSIIにおけるPGの機能

Synechocystis sp. PCC 6803 の *pgsA* 株では、パルス光を用いたクロロフィル蛍光測定から、変異株がPG欠乏状態になると Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されることが明らかになっている (Itoh et al. 2012)。また、PGを添加していない培地で3日間培養した *pgsA* 株は、BQ (*p*-ベンゾキノン) を添加することで Q_A から Q_B への電子伝達が大きく阻害される。これは Q_B 近傍に存在するPG分子がPG欠乏状態で解離しやすいためであると考えられている。さらに、熱発光測定により、 S_2 と Q_B の電荷再結合を表すBバンドのピーク温度がPG欠乏状態では低温側にシフトしていた。また、PGを培地に再添加するとBバンドのピーク温度は元の位置に戻ることが分かった。PG欠乏時のBバンドのピーク的位置は、Qバンド (S_2 と Q_A の電荷再結合を表す) のピーク温度に近づいていた。PG欠乏状態の *pgsA* 株ではBQのような人工電子受容体を添加すると、酸素発生活性が大きく減少した (Hagio et al. 2000; Itoh et al. 2012)。これらの結果から、*pgsA* 株では Q_B 結合サイトの近傍に存在するPG分子が、PG欠乏状態では欠損することで、 Q_B 周辺の構造とその機能が影響を受けたと考えられる。

pgsA 株から PSII 複合体を精製し、その PSII を解析した結果、PSII から PG 分子が欠損することで、PSII のドナー側に影響があることが明らかになった (Sakurai et al. 2007)。*pgsA* 株の PSII ではマンガンカルシウムクラスターの安定化に寄与する表在性タンパク質 (PsbO、PsbV と PsbU) が PG の欠乏により解離していた。これらの表在性タンパク質は、PG 欠乏状態では *in vivo* でも PSII に機能的に結合しておらず、その結果、マンガンカルシウムクラスターが不安定となり、酸素発生活性が約 50%にまで減少するものと考えられている。さらに、PG 欠乏状態の *pgsA* 変異株では単量体 PSII が蓄積していることから、PG は PSII の二量体化にも重要であることが分かった (Sakurai et al. 2003)。しかし、PSII の単量体化は表在性タンパク質の欠損変異株でも観察され、特に $\Delta psbO$ 変異株では単量体 PSII がかなり蓄積する。このことから PSII の単量体化は PG 分子の解離が直接関与しているわけではなく、PG 分子が表在性タンパク質の結合の維持に必要であり、表在性タンパク質が PSII から解離することで PSII の単量体化が起こるものと考えられている (Sakurai et al. 2007)。

1-8. 本研究の目的

先行研究における *pgsA* 変異株を用いた解析から、PG は PSII の構造維持や電子伝達反応に必要不可欠であることが明らかになっている (Gombos et al. 2002, Sakurai et al. 2007)。桜井らは、PG 欠乏状態の *pgsA* 変異株の細胞から PSII 複合体を精製して、PSII に存在する PG 分子数を分析した (Sakurai et al. 2007)。*pgsA* 変異株の PSII には半分の PG 分子が残っていたため、具体的に PSII 内のどの PG 分子が欠損し、PSII の機能に影響を及ぼすかを判別できなかった。その後、2011

年の 1.9 Å の分解能における X 線結晶構造解析から高精度な PSII の構造が明らかになり、単量体 PSII あたり 5 分子の PG の存在が確認された (Umena et al. 2011)。X 線結晶構造解析の結果から、PG 分子に存在する酸素原子と近傍のアミノ酸残基の水素原子との水素結合が推定できる。そこで、5 分子の PG 分子とそれぞれ相互作用する PSII のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換し、その PSII を解析することで、各 PG 分子の PSII における機能を明らかにできると考えられる。本研究では Q_A 近傍に存在する 2 分子の PG (PG664 と PG694) と Q_B 近傍に存在する PG 分子 (PG772) について、それぞれの PG と相互作用するタンパク質のアミノ酸残基を改変した変異株を作製し、その変異株の PSII を解析することで各 PG 分子の機能を明らかにした。

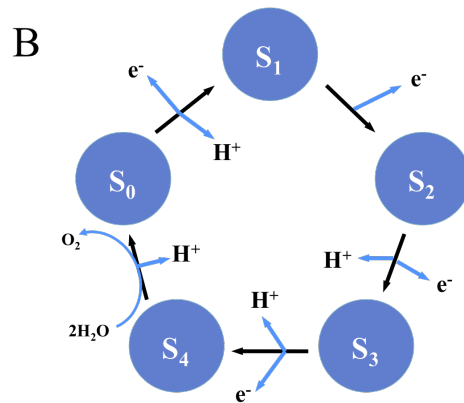
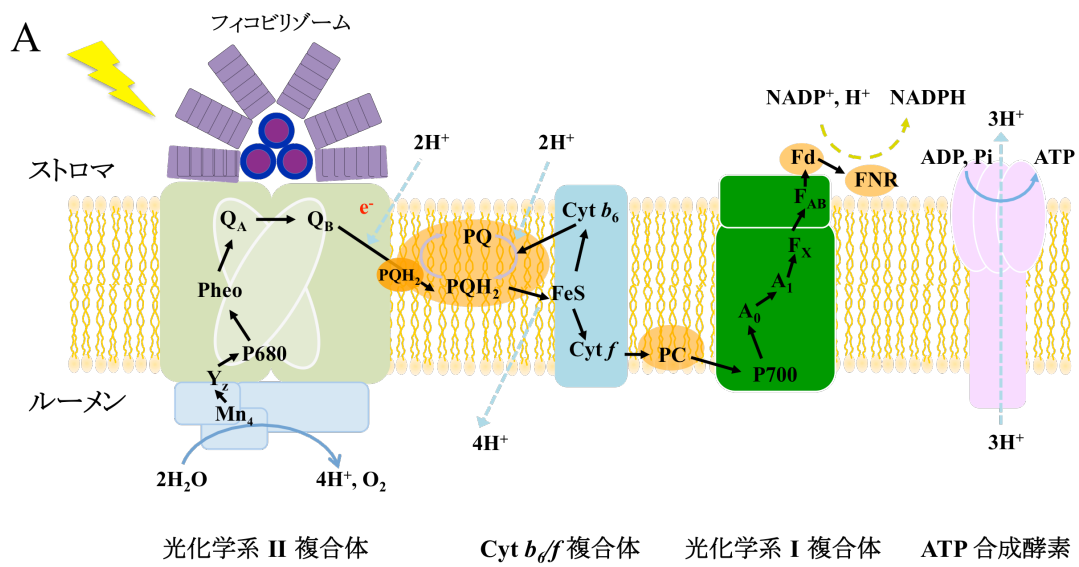


図1 光合成における電子伝達

(A) チラコイド膜上で起こる光合成の電子伝達と ATP 合成。(B) 光が照射されたときに起こるマンガンクラスターの状態変化。

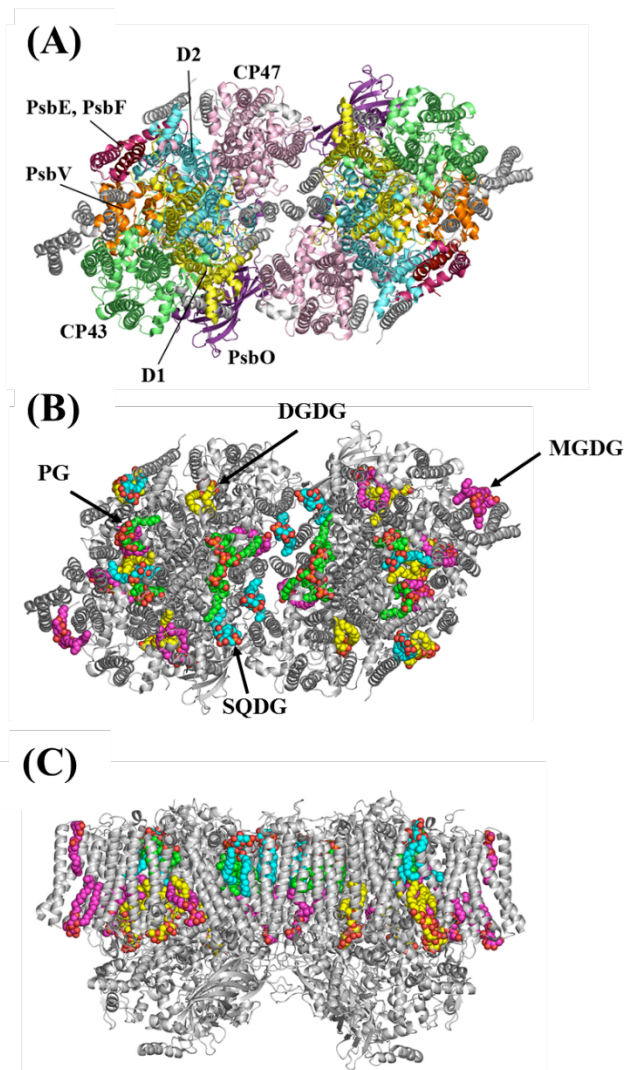


図 2 X 線結晶構造解析によって明らかになった *T. vulcanus* の PSII の構造 (Umena et al. 2011)

(A, B) 複合体を上から見たときの構造 (A) タンパク質サブユニットのみが表示されている (B) タンパク質サブユニットに加え、脂質分子も表示されている。MGDG、DGDG、SQDG、PG の炭素原子をそれぞれ紫色、黄色、水色、緑色で示している。また、酸素原子とリン原子を赤色と橙色で示す。(C) 横から見たときの構造。

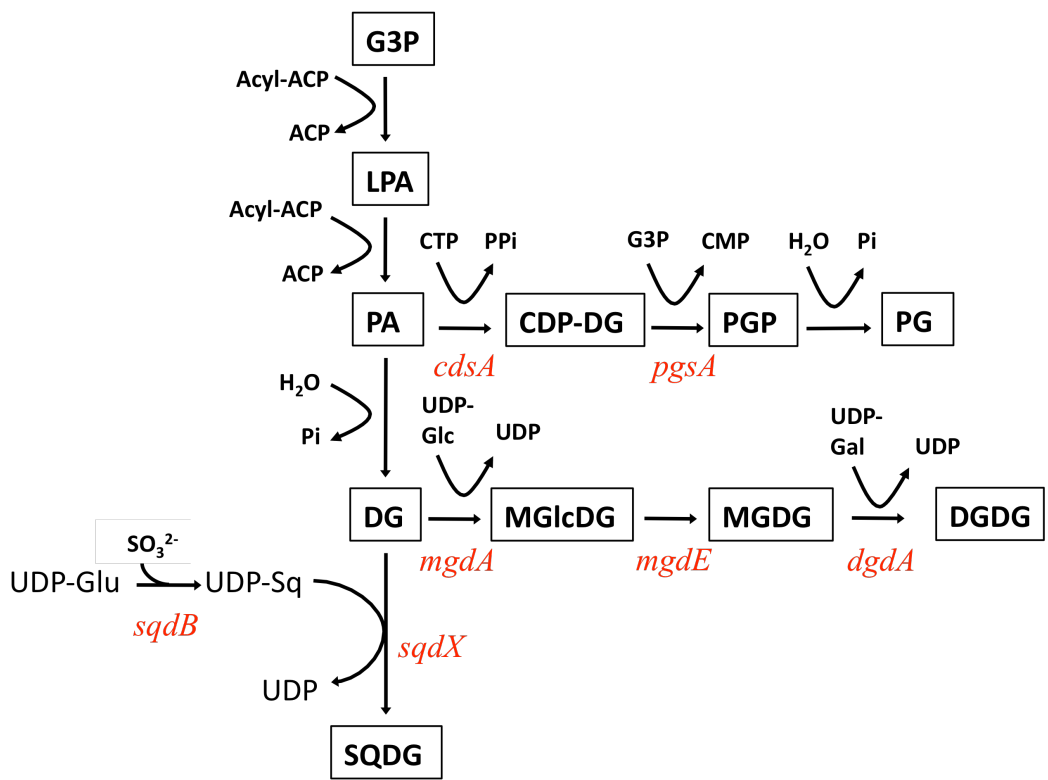


図3 シアノバクテリアにおける脂質の合成経路

2 章

PSII に結合している PG664 と PG694 の機能

2-1. 序論

1章で記述したように *Thermosynechococcus vulcanus* の PSII の X 線結晶構造解析により PSII には単量体あたり 20 個の脂質分子 (6 分子の MGDG, 5 分子の DGDG, 4 分子の SQDG, 5 分子の PG) が結合していると推定された。PG については、モノマー・モノマー界面、Q_A 結合サイトの近傍に 3 分子 (PG664, PG694, PG702)、Q_B 結合サイトの近傍に 1 分子 (PG772)、CP43 と D1/D2 ヘテロダイマーの間に 1 分子 (PG714) が存在している (図 4)。これらの PG 分子の極性頭部は全てストロマ側に向いている。

PG は PSII 複合体の構造の維持、表在性タンパク質の結合や Q_B 結合サイトの機能の維持に重要であると考えられていることを 1 章において説明した。また、野生株では単量体 PSII あたり 6 分子ある PG が、PG 欠乏状態の *pgsA* 変異株の PSII では 3 分子に減少していた (Sakurai et al. 2007)。しかし、どの PG 分子が PSII から欠損し、各 PG 分子がどの機能に影響を及ぼしたかということは、*pgsA* 変異株を用いた解析では明らかにできなかった。そこで本研究では、X 線結晶構造解析で確認されている PG 分子がそれぞれどのような役割を持って、PSII の機能に寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。本章では PSII の 2 つの PG 分子 (PG664 と PG694) と相互作用している D1 タンパク質のアミノ酸残基 (Ser-232、Asn-234) を改変した変異株を作製した。作製した変異株の PSII の変化を調べることで各 PG 分子の機能解析を行った。

2-2. 材料・方法

本研究では *Synechocystis* sp. PCC 6803 のグルコース耐性株をもとに変異株を作製し、実験を行った。野生株と変異株の細胞は 30°C、20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続光を照射して培養した。培養は 4 mM HEPES (pH 7.5) を含む BG11 培地 (Allen et al. 1968) で行い、寒天培地には 0.3% (w/v) チオ硫酸ナトリウム、1.5% (w/v) Bacto agar を添加した。変異株を培養する際には、各抗生物質、エリスロマイシン (Em)、クロラムフェニコール (Cm)、スペクチノマイシン (Spe)、ストレプトマイシン (Str)、カナマイシン (Km) の終濃度が 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 、テトラサイクリン (Tc) の場合には 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ になるように培地に添加した。液体培養では 50 mL の BG11 を入れた試験管に 1% CO₂ を含む空気を通気して培養した。PSII 精製のための大量培養は 2 L の培養容器でスターラーを攪拌させながら培養した。

部位特異的変異株の作製

光化学系 II 複合体のアミノ酸残基を改変した変異株を作製するため、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の *psbA2* 遺伝子をクローニングしたプラスミドを作製した。*psbA2* をクローニングした pNA219 プラスミドには、*psbA2* 遺伝子の下流にカナマイシン耐性遺伝子カセット (Km^R) が導入されている (Mizusawa et al. 2004)。部位特異的変異の導入は QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を使用した。

部位特異的変異株を作製するために、作製したプラスミドを用いて、*psbA1*、*psbA2* と *psbA3* に薬剤耐性遺伝子カセットを導入した [$\Delta psbA1$: Cm^R (クロラム

フェニコール耐性遺伝子カセット) , $\Delta psbA2$: Spe^R / Str^R (スペクチノマイシン/ ストレプトマイシン耐性遺伝子カセット) , $\Delta psbA3$: Tc^R (テトラサイクリン耐性遺伝子カセット)], *Synechocystis* の D1 タンパク質欠損株 (B-His N Δ AA) へ形質転換した (Mizusawa et al. 2004)。また、この形質転換に用いた D1 破壊株にはヒスチジンタグを付加した CP47 タンパク質をコードする遺伝子を導入し、遺伝子下流にはエリスロマイシン薬剤耐性遺伝子カセット (Er^R) が導入してある。形質転換後、それぞれの形質転換体は Er , Cm , Km , Tc を添加した培地で選別した。部位特異的変異を導入するために使用したプライマーは、以下の通りである。 S232A: 5'-CCGAAGTTGAAGCCCAGAACTACGGTTACAAATTC-3' と 5'-GAATTTGTAACCGTAGTTCTGGGCTTCAACTTCGG-3' 、 N234D: 5'-CCGAAGTTGAATCCCAGGACTACGGTTACAAATTC-3' と 5'-GAATTTGTAACCGTAGTCCTGGGATTCAACTTCGG3' 、 S232AN234D: 5'-CCGAAGTTGAAGCCCAGGACTACGGTTACAAATTC-3' と 5'-GAATTTGTAACCGTAGTCCTGGGCTTCAACTTCGG-3'。

光合成活性の測定

細胞の光合成活性 (酸素発生活性) の測定には、対数増殖期 ($OD_{730} = 0.6 \sim 1.0$) の細胞を使用した。細胞を遠心 ($2,300 \times g$) によって回収し、沈殿した細胞を BG-11 培地に $10 \mu g \text{ Chl mL}^{-1}$ になるように懸濁した。その細胞懸濁液を弱光下でロータリーシェイカー (NR-3 TAITEC) を使用して 1 時間インキュベートした (120 rpm)。その後、クロロフィル濃度を $5 \mu g \text{ Chl mL}^{-1}$ に希釈し、クラーク型酸素電極 (Hansatech) を用いて測定した。細胞の PSII 活性を測定する場合、各

種キノン[BQ, DCBQ (2, 6-ジクロロベンゾキノン), DMBQ (2,6-ジメチルベンゾキノン)]と 2 mM のフェリシアンカリウム (Fecy) を測定直前に添加した。また単離した PSII 複合体の場合は 4 mM フェリシアン化カリウム (Fecy) を添加して活性測定を行った。

クロロフィル蛍光減衰の測定には酸素発生活性と同じ様に細胞のクロロフィル濃度を $5 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ に調整後、10 分間暗所でインキュベートし、Double Modulation Fluorometer (Photon Systems Instrument) で測定した。Q_A から Q_B への電子伝達を阻害する DCMU を使用する場合、測定の 2 分前にサンプルに終濃度 $10 \mu\text{M}$ の DCMU を添加した。また、得られた測定データを Vass らによる関数にフィッティングさせることにより Fast、Middle と Slow phase の値を算出した (Vass et al. 1999)。

熱発光測定

熱発光の測定は Ohad et al. (1990) の方法をもとに行った。対数増殖期の細胞を遠心により回収し、 $7 \mu\text{g Chl}$ に相当する細胞を熱発光測定に使用した。DCMU を添加する場合、濃縮前の培養液に終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、遠心後の細胞懸濁液にも終濃度 $10 \mu\text{M}$ の DCMU を加えた。試料は 20 分間暗所でインキュベートを行い、PSII のプラストキノンを酸化状態にした後、閃光を一回照射して測定を開始した。

チラコイド膜と PSII 複合体の精製

チラコイド膜と PSII 複合体の精製は、Kashino et al. (2002)の方法を改良した。

8 L の培養液から細胞を回収し、緩衝液 A [50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 25% (w/v) グリセロール]で細胞を 1 回洗浄した。その後、洗浄した細胞を、EDTA を含まないプロテアーゼインヒビター (ナカライテスク) を加えた緩衝液 A に再懸濁した。細胞懸濁液と等量のガラスビーズ (直径 0.1 mm) を容器に入れ、10 秒破碎、3 分停止、20 サイクルのタイムプログラムで細胞を破碎した (BEAD-BEATER, Model 1107900, BIOSPEC PRODUCT)。その後、破碎液を遠心 (2100×g, 8 分) し、未破碎細胞とガラスビーズを取り除いた後、上清を超遠心分離 (109,000×g, 30 分) することでチラコイド膜画分を回収した。チラコイド膜画分は 1 mg Chl mL⁻¹ 以上になるように緩衝液 A に懸濁して保存した。

PSII 複合体を精製するときは、Kashino et al. (2002) のプロトコルに従い実験を行った。チラコイド膜を可溶化するときは、チラコイド膜を 1 mg Chl mL⁻¹ になるように緩衝液 A で懸濁し、終濃度 1%になるように 20% n-ドデシル β-D-マルトシド (DM) を添加した。可溶化はスターラーでゆっくり攪拌しながら、4°C で 20 分間行った。その後、遠心 (26,000×g, 20 分) により不溶画分を除いた上清を Ni-アフィニティカラム (Ni-NTA column; Qiagen) に供与し、PSII 複合体をカラムに吸着させた。カラム体積と等量の緩衝液 B [50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 25% (w/v) グリセロール, 0.04% (w/v) DM, 5 mM ヒスチジン]、その後、カラム体積の 9 倍量の緩衝液 C [50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 25 % (w/v) グリセロール, 0.04% (w/v) DM]で洗浄した。カラムの 4 倍量の緩衝液 D [50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 25 % (w/v) グリセロール, 0.04% (w/v) DM, 100 mM ヒスチジン]で PSII 複

合体を溶出し、アミコン・ウルトラ (10 kDa, Merck) を用いて濃縮した。PSII の単量体と二量体の分離は、5-30% (w/v) グリセロール密度勾配遠心で行った。Gradient Master (model 107ip; Biocomp) でグリセロール密度勾配を作製し、 $180,000 \times g$ 、 4°C 、16 時間で遠心した。

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Kashino et al. (2002) の方法に従い、18-24% のポリアクリルアミド、6 M 尿素のゲルを作製し、1 レーンに $5 \mu\text{g}$ Chl に相当する PSII を使用した。泳動後のゲルは CBB (クマシーブリリアントブルー) R250 で染色した。

脂質分析

精製した PSII 複合体から Bligh and Dyer (1959) の方法に従い、脂質を抽出した。 $75 \mu\text{g}$ Chl に相当する PSII 複合体から抽出した脂質を、薄層クロマトグラフィーで各脂質クラスに分離した。得られた各脂質クラスは Wada and Murata (1989) の方法に従い、ガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。

色素分析

クロロフィル濃度は Arnon et al. (1974) の方法で測定した。PSII 複合体に存在するフィオフィチンは Kobayashi et al. (1990) の方法に従って分析し、PSII には単量体あたり 2 分子のフェオフィチンが存在するとして PSII 単量体あたりのクロロフィルや各脂質分子数を算出した。

2-3. 結果

部位特異的変異導入株の作製

PSII 複合体の X 線結晶構造解析 (1.9 Å の分解能) により、PSII 複合体中に存在する 5 分子の PG (PG664, PG694, PG702, PG714, PG772) の詳細な局在が明らかになった (Umena et al. 2011)。3 つの PG 分子 (PG664, PG694, PG702) は Q_A 結合部位の近傍に存在している。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近接しており、両者は水素結合していると考えられる。Ser-232 のアミノ酸残基の酸素原子は PG664 の O2 原子と 3.6 Å、PG694 の O5 原子と 2.6 Å の位置にある。また Asn-234 の酸素原子は PG664 の O1 原子と 2.8 Å、PG694 の O4 原子と 2.9 Å の位置にある (図 5B)。これらのアミノ酸残基と PG 分子の相互作用を変化させるため *psbA2* 遺伝子に部位特異的変異を導入し、3 つの変異株、S232A、N234D、S232AN234D を作製した。部位特異的変異株の作製のため、D1 タンパク質欠損株 (B-His N Δ AA) をホスト株として使用した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 の D1 タンパク質は *psbA1* (*slr1181*)、*psbA2* (*slr1311*)、*psbA3* (*sll1867*) という 3 つの遺伝子にコードされている。B-His N Δ AA 株ではこれらの遺伝子をそれぞれ、Cm^R、Spe/Str^R、Tet^R の薬剤耐性遺伝子カセットで置換することで破壊してある。これらの *psbA* 遺伝子は環境条件で遺伝子発現が変化することが知られており、*Synechocystis* では通常、または強光下で *psbA2* 遺伝子の発現がもっとも高いことが明らかになっている (Mohamed and Jansson 1989)。Ser-232 と Asn-234 のアミノ酸残基は 3 つの PsbA タンパク質で保存されており、また、他のシアノバクテ

リアや高等植物の間でも保存されている (図 6)。そのため *psbA2* 遺伝子に変異を導入して、D1 タンパク質欠損株に導入することにした。

部位特異的変異株の選抜のため、*psbA2* 遺伝子の下流にある *speA* 遺伝子領域に Km^R 耐性遺伝子を挿入した。 Km を含む BG11 培地で変異株の選抜を行った後、PCR により遺伝子型を確認した。図 7 に示すように、B-His $N\Delta AA$ 株では Spe/Str^R 耐性遺伝子を含む、約 3.0 kbp のバンドが検出された。一方、部位特異的変異株は 3.2 kbp の位置にバンドが検出された。2.6 kbp 付近に存在するバンドは非特異的なバンドであると考えられる。さらに、変異株で塩基置換が起こっていることを DNA の塩基配列を決定することで確認した。これらの結果により得られた変異株では、*psbA2* 遺伝子が部位特異的変異を導入した変異型の *psbA2* 遺伝子と完全に置換されていることが明らかとなった。

部位特異的変異株の増殖と光合成活性

コントロール株である pNA2 株 (B-His $N\Delta AA$ 株に野生型の *psbA2* を導入した株)、部位特異的変異株の S232A, N234D, S232AN234D 株の増殖曲線を図 8 に示す。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、やや低い増殖速度を示した。表 1 に示したように、呼吸で消費される酸素を差し引いた酸素発生活性である純光合成活性 (Net 活性) を測定した結果、コントロール株の活性は $230 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ である一方、S232A、N234D、S232AN234D 変異株ではコントロール株の 85%程度まで活性が減少していた。また、人工電子受容体である BQ は主に Q_B から電子を受け取ると考えられている (Sato et al. 1955, Kashino et al. 1996)。BQ を添加して PSII 活性 (水

から BQ) を測定したとき、コントロール株の活性は $280 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ となり、Net 活性よりも上昇していた。しかし、S232A、N234D、S232AN234D 変異株では PSII 活性がコントロール株の 25%ほどに大幅に減少していた。PG が欠乏した *pgsA* 株では、BQ を添加すると PSII が阻害され、活性が大きく減少することが明らかになっている (Hagio et al. 2000)。以上の結果から、変異株における増殖速度と光合成活性の低下は、 Q_B 結合サイトの変化により引き起こされたものと考えられる。また、図 9 に示すように、S232AN234D 株では Net 活性を測定するときに、弱い測定光を照射した場合はコントロール株と同程度の活性が得られる。しかし、 $900 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ の測定光で活性値は飽和し、その活性値はコントロール株と比べ低下していた。本研究の培養条件では、コントロール株と変異株はほぼ等しい光合成活性が存在しているが、増殖速度に多少違いが見られた。

また、他の電子受容体である DCBQ と DMBQ を添加したときの細胞の PSII 活性を測定した (図 10)。コントロール株では DCBQ を添加した場合は PSII 活性が若干減少してしまうものの、BQ と DMBQ では添加する電子受容体の濃度の増加に伴って、PSII 活性が高くなった。変異株では BQ と DMBQ を電子受容体とした場合、PSII 活性はコントロール株と比べて大きく低下するが、一方で DCBQ の場合のみ 徐々に活性が増加した。 Q_A から Q_B への電子伝達を阻害する DCMU を電子受容体と同時に添加した場合は、コントロール株と全ての変異株で活性はほぼゼロになり、これらの電子受容体は Q_B から電子を受け取っていることがわかった。以上のことから、変異株では Q_A 結合サイトではなく、 Q_B 結合サイトに大きな影響が生じていると考えられる。

Q_A から Q_B への電子伝達速度

コントロール株と変異株における Q_A から Q_B への電子伝達速度を調べるため、パルス光を利用したクロロフィル蛍光の減衰を測定した (図 11)。コントロール株の細胞において、飽和光を照射すると、Q_A が完全に還元状態になることからクロロフィル蛍光は大きく上昇した。その後、電子が Q_B に伝わることにより Q_A が酸化され、クロロフィル蛍光も減衰した。変異株ではクロロフィル蛍光の減衰がコントロール株と比べ遅くなっており、還元された Q_A の再酸化が遅くなっている。つまり Q_A から Q_B への電子伝達が遅くなっていることが明らかとなった。また、S232AN234D 変異株では S232A と N234D よりクロロフィル蛍光の減衰が遅いことから、Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されていることが明らかになった (表 2)。DCMU を添加して Q_A から Q_B への電子伝達を完全に阻害したときの、クロロフィル蛍光の減衰は、主に Q_A⁻ と S₂ 状態のマンガングラスタールとの電荷再結合に起因する。図 11 で示したように、コントロール株と変異株の DCMU を添加したときのクロロフィル蛍光の減衰曲線は、ほぼ同じ形であったが、0.1 秒すぎから変異株の減衰が若干遅くなっているため、Q_A⁻ と S₂ の電荷再結合の速度に多少の違いがあることが示唆された。

熱発光スペクトル

図 12 に示すように、DCMU の非存在下と存在下で熱発光の測定を行った。DCMU を添加しないとき、熱発光測定では B バンドと呼ばれる Q_B⁻ と S₂ の電荷再結合に由来するピークが観察される。コントロール株ではこの B バンドのピ

ークは 34°C であったが、変異株では 30°C へと低温側にシフトした。DCMU を添加したときは、 Q_A^- と S_2 の電荷再結合に由来する Q バンドを測定することができる。この Q バンドのピーク温度はコントロール株と変異株で 11°C 程度であり、両者に違いが見られなかった。Q バンドのピーク温度は変化せず、B バンドのピークのみが変異株で低温側にシフトしたことから、変異株ではコントロール株と比べて Q_B の酸化還元電位が低下していることが示唆される。

PSII 複合体のタンパク質組成とアセンブリー状態

部位特異的変異を導入した PSII 複合体における影響を調べるため、コントロール株と S232AN234D 変異株から PSII 複合体を精製した。PSII 複合体の一部である CP47 に導入した 6×ヒスチジンタグを利用して、Ni-アフィニティーカラムで PSII の単離を行った。変異株間で細胞の増殖速度や光合成活性に大きな違いがないことから、PSII 複合体の解析には S232AN234D 変異株のみを使用した。コントロール株と S232AN234D 変異株から精製したチラコイド膜を 1%の DM で可溶化した。可溶化したチラコイド膜から Ni-アフィニティーカラムを使用して PSII 複合体を精製し、さらに、グリセロール密度勾配遠心で単量体 PSII と二量体 PSII に分離した。コントロール株と S232AN234D 株では単量体と二量体の比がおおよそ 1:3 であり両者の間に違いがないことから、PSII の二量体化は変異株でも影響を受けていないことが示唆された。図 13 に示すように精製した PSII の SDS の結果から、二量体 PSII では CP47、CP43、D1、D2、PsbE などのサブユニットはコントロール株と変異株で同等量存在していた。しかし、変異株では PsbQ の量がわずかに減少していることが分かった。一方で、単量体 PSII で

は CP47、CP43、D2、D1、PsbQ や Psb27 の量に関して、コントロール株と変異株では違いがなかった。しかし、変異株の単量体 PSII では表在性タンパク質である PsbV と PsbU が大きく減少していた。これらの表在性タンパク質は密度勾配遠心で分離する前の PSII でも大きく減少しており、表在性タンパク質の解離は密度勾配遠心が原因ではないと考えられる (図 14)。また、変異株の単量体 PSII では PsbO がコントロール株と比べ若干だが減少していた。対照的に、変異株の単量体 PSII では Psb28 がコントロール株と比べて蓄積していることが明らかとなった。

これらの精製した PSII 複合体の酸素発生活性を測定したところ、単量体と二量体が混ざっている状態の PSII では、コントロール株の酸素発生活性が $1,960 \pm 90 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であるが、S232AN234D 変異株の活性は $1,430 \pm 150 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($n > 3$) と、変異株の活性はコントロール株の 25%ほど低下していることが明らかになった。このことは、変異株の PSII では表在性タンパク質が解離していることが、酸素発生活性の低下を引き起こしている可能性を示唆している。

PSII 複合体に結合している脂質

表 3 に示すように精製した PSII 複合体の脂質クラスを TLC (薄層クロマトグラフィ) で分離し、脂質の量を GC で定量した。単量体と二量体を含む混合 PSII では全脂質に対する PG の割合はコントロール株で 22.3%であったが、変異株では 19.6%に減少していた。また密度勾配遠心で分離した二量体 PSII では、コントロール株の PG の割合は 27.6%であるのに対して、変異株では 25.3%と減

少していた。PG が減少したのに対し、その分 MGDG が増加していた。DGDG と SQDG に関してはコントロール株と変異株の間では違いが見られなかった。さらに、表 4 に示すように各脂質の脂肪酸組成はコントロール株と変異株の間で違いは確認できなかった。

また、単量体あたりの PSII に存在するフェオフィチンの分子数を基にした、PSII 単量体あたりの各脂質の分子数を算出した (表 5)。S232AN234D 変異株における PSII の PG 分子数はコントロール株と比べ少なくなっており、その分 MGDG の分子数が増えていた。これらの結果から、変異株の PSII 複合体では PG664 か PG694 のどちらかの PG が MGDG に置き換わっていると考えられた。

2-4. 考察

PSII の機能に PG とその近傍のアミノ酸残基の相互作用がどのように関与しているか調べるため、D1 タンパク質の Ser-232 と Asn-234 を改変した変異株を作製した。これらのアミノ酸残基はシアノバクテリアだけでなく、高等植物にも保存されていることが分かっている (図 6)。また *T. vulcanus* の二量体 PSII の X 線結晶構造解析における脂質分子数 (Umena et al. 2011) と *Synechocystis* の PSII 二量体の脂質分析 (Sakurai et al. 2006) の結果がよく一致している。本研究において、アミノ酸残基を改変した変異株を解析した結果、S232A、N234D、S232AN234D 変異株は光独立栄養的に生育できるものの、光合成活性や Q_A から Q_B への電子伝達速度が低下していた (図 11、表 2)。これらの結果は、PG 分子 (PG664 と PG694) と近傍のアミノ酸残基との相互作用の改変が、細胞の増殖

には大きく影響しないが、 Q_A から Q_B の電子伝達に影響することを示している。

当研究室の先行研究により、PG を添加しない培地で生育させた PG 合成欠損株 (*pgsA*) は、酸素発生活性が低下し、また、PSII 活性は BQ を添加することで完全に阻害されることが明らかになっている (Hagio et al. 2000)。また、*pgsA* 株は PG 欠乏条件下で Q_A から Q_B の電子伝達速度が大きく阻害され、特に Q_A から Q_B の電子伝達を示す Fast phase の速度が低下していることがパルス光を利用したクロロフィル蛍光測定の結果から分かっている (Gombos et al. 2002)。また、この PG 欠乏条件では *pgsA* の PSII 複合体内の PG の含量は約半分に減少していた (Sakurai et al. 2007)。これらの結果から、*pgsA* 株において、PSII の Q_B 結合部位の構造の変化は、PSII 複合体内の約半分の PG が欠損したことにより引き起こされたと考えられる。本研究で作製した変異株では Q_A から Q_B への電子伝達や BQ を添加したときの PSII 活性が阻害された。そのため、これらの変異株では PG 分子とアミノ酸残基の相互作用を改変したために、PSII から PG 分子が解離し、 Q_B 結合サイト周辺の構造変化が引き起こされたと考えられる。

先行研究において、D1 タンパク質の S232 と N234 を含んでいる D-E ヘリックス領域を欠損させた変異株を用いた研究が数多く報告されており、この領域は D1 タンパク質の修復とキノンの結合に重要であることが示唆されている (Kless et al. 1994, Nixon et al. 1995, Mulo et al 1997)。それらの変異株では、この Q_B 結合サイトが多少変化するものの、D1 タンパク質のターンオーバーや光独立栄養的な増殖は阻害されないことが分かっている。 Q_A 結合サイトではなく Q_B 結合サイトが変化するという結果は、本研究での解析結果と矛盾しない結果である。このことは、D-E ヘリックスを欠損させた変異株では PG 分子と相互作用

している S232 と N234 が欠損したことにより、Q_B 結合サイトが変化したと考えられる。

Q_A と Q_B の機能の変化を明らかにするために行った熱発光スペクトルの測定結果から、変異株の B バンドのピーク位置はコントロール株と比べ、低温側にシフトしていることがわかった (図 12)。一方、Q バンドのピーク温度は全ての株で違いがなかった。このことは、変異株では Q_B の酸化還元電位がコントロール株に比べて低下している、もしくは S₂ の酸化還元電位が高くなっていることを示している。しかし、Q_A と S₂ の電荷再結合に由来する Q バンドのピーク温度はコントロール株と変異株でほとんど差がなかったため、S₂ の酸化還元電位が変異株で高くなっているとは考えにくい。変異株では Q_A と S₂ の酸化還元電位がともに同程度、上昇または低下している可能性を考える必要があるが、DCMU を添加した場合のクロロフィル蛍光測定から、変異株では Q_A と S₂ の電荷再結合の速度に大きな差が見られなかった。これらの結果は変異株では Q_B の酸化還元電位が低下していることを示し、Q_A と S₂ の酸化還元電位には大きな変化がないことを示唆している。変異株では Q_B の酸化還元電位が低下したことで 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 の電子伝達速度が遅くなったものと考えられる。

先行研究から (Gombos et al. 2002)、PG 欠乏状態の *pgsA* 株の細胞の熱発光測定から、B バンドのピーク温度が PG 欠乏前の細胞と比べて低温側にシフトしていることが明らかになっている。PG 欠乏前の細胞の B バンドのピーク温度は 30°C であるのに対し、PG 欠乏状態で 9 日間培養した細胞のピーク温度は 16°C まで低下した。PG 欠乏状態の *pgsA* の細胞で B バンドのみがシフトすることは、

PSII で欠損した PG が Q_A ではなく Q_B の機能に影響を与えていることを示唆している。これらの熱発光測定の結果は本研究で作製した変異株でも見られるが、*pgsA* 株のほうが部位特異的変異株よりも PSII の機能により障害が見られた。この理由として、本研究の部位特異的変異株では PG664 と PG694 のどちらか 1 分子が欠損して MGDG に置き換わっていたのに対し、PG 欠乏状態で培養した *pgsA* 株では PSII 内の半分の PG が欠損していたことが挙げられる (Sakurai et al. 2007)。しかし、*pgsA* 株においてどの PG 分子が PSII から解離しているのかは特定できない。さらに、PG は PSII 複合体だけでなく、PSI 複合体にも存在しており (Kubota et al. 2010, Jordan et al. 2001)、また、リポタンパク質の脂質修飾にも必要である (Mizusawa and Wada 2012)。それゆえ、PG 欠乏状態で培養した *pgsA* 変異株では PSII だけでなく、様々な変化が起こり間接的に PSII に影響を及ぼしている可能性もある。

脂質分析の結果から、S232AN23D 変異株の PSII では PG664 または PG694 のどちらかの PG 分子が欠損していることが明らかになった (表 4)。これらの PG 分子は Q_A 結合サイト周辺に位置しており、これらの PG 分子が欠損すると Q_A の機能に影響することが考えられる。さらに、これらの PG 分子は P_{sb}T、P_{sb}L や P_{sb}M の近傍に存在しており、モノマー・モノマー界面の D2 の α ヘリックスに囲まれている。そのため、これらの PG 分子が欠損することで、これらの小サブユニットが解離し、PSII の単量体化が引き起こされることが考えられる。しかし、本研究の変異株では Q_B の機能に変化はあるものの、 Q_A の機能や PSII の二量体化には影響がなかった。伊藤ら (Itoh et al. 2012) の先行研究によれば、PG 分子は Q_B 結合サイトの近くにあるため、*pgsA* 変異株で見られる Q_A から Q_B へ

の電子伝達の阻害は PG772 の欠損により引き起こされると考えられている。PG772 は PSII に弱く結合していると予想されており、PG 欠乏状態では PSII から比較的簡単に解離すると仮定している。Q_B 結合サイト近傍に存在する PG772 が解離することで Q_B の機能に対する BQ の感受性が変化したり、Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されると考えられていた。しかし、本研究の結果から Q_A 近傍に存在する PG664 や PG694 とタンパク質との相互作用を変化させることで、Q_B の酸化還元電位が変化することがわかった。この結果は、Q_A 近傍の PG 分子が欠損することで、Q_B 結合サイト周辺の構造が変化し、Q_B の酸化還元電位が変化したことを意味している。S232 と N234 のアミノ酸残基の改変は D2 タンパク質に存在する Q_A 結合サイトには影響を及ぼさず、同じ D1 タンパク質に存在する Q_B に影響を及ぼした。また、皆川らの先行研究により、D1 タンパク質のアミノ酸残基 (N234D, F260S) を改変した変異株 (NDFS mutant) の熱発光測定では、B バンドのピーク温度のみ低温側にシフトした (Minagawa et al. 1999)。この結果は、本研究の Q_A 結合サイトの構造変化が Q_B の機能の変化を引き起こすという結果と一致している。しかし、Phe-260 は D1 タンパク質の D-E ループにある Q_B 結合サイトの周辺に位置しているため、Q_B 結合サイト周辺の構造に直接影響している可能性もある。

PSII を構成するタンパク質の分析から、S232AN234D 変異株では表在性タンパク質である PsbV と PsbU の量が、単量体 PSII において低下していることが明らかとなったが、二量体 PSII のタンパク質組成はコントロール株と比べ、大きな変化はなかった (図 13)。逆に、表在性タンパク質が減少したのに反して、変異株の単量体 PSII では Psb28 が増加していた。Psb28 欠損株の増殖速度は野生株

に比べて、強光と高温下で遅くなることから、Psb28 は PSII の修復や維持に重要であるということが示唆されている (Sakata et al. 2013)。表在性タンパク質の減少と Psb28 の蓄積は PG 欠乏状態で培養した *pgsA* 株でも観察されている (Sakurai et al. 2007)。これらのことから、PG は PsbV や PsbU 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。しかし、X 線結晶構造解析による PSII の構造では、すべての PG の極性頭部はストロマ側に向いており、表在性タンパク質と直接相互作用している PG はない。それ故、PG 分子がどのように表在性タンパク質と PSII の結合に関与しているかはよく分からない。本研究の変異株では PG664 または PG694 のどちらかが欠損することで D1 タンパク質の構造変化を引き起こし、D1 と表在性タンパク質との結合に影響を及ぼすかもしれない。

表 1 コントロール株と部位特異的変異株の細胞の酸素発生活性

	Strain			
	pNA2	S232A	N234D	S232AN234D
	<i>μmol O₂ mg Chl⁻¹ h⁻¹</i>			
<i>Net (H₂O → CO₂)</i>	230 ± 10	200 ± 20	200 ± 20	190 ± 20
<i>PSII (H₂O → BQ)</i>	280 ± 10	80 ± 10	70 ± 10	60 ± 10

活性は各細胞のクロロフィル濃度を 5 μg Chl mL⁻¹ に調節して、900 μmol photons m⁻² s⁻¹ の測定光を照射して測定した。データは平均値と標準偏差である。

表 2 クロロフィル蛍光の減衰曲線から求めた各フェーズの時定数と構成比率

Strain	Fast phase		Middle phase		Slow phase	
	$t_{1/2}$ (μ s)	amp (%)	$t_{1/2}$ (ms)	amp (%)	$t_{1/2}$ (s)	amp (%)
<i>No addition^a</i>						
pNA2	241 \pm 34	98.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4	15.1 \pm 3.6	0.2 \pm 0.09
S232A	264 \pm 51	98.1 \pm 1.2	2.9 \pm 0.6	1.4 \pm 0.8	6.3 \pm 3.8	0.5 \pm 0.36
N234D	255 \pm 50	98.2 \pm 1.2	2.9 \pm 0.7	1.3 \pm 0.8	4.4 \pm 2.4	0.5 \pm 0.40
S232AN234D	284 \pm 57	96.8 \pm 2.0	3.3 \pm 0.7	2.1 \pm 1.2	2.4 \pm 1.1	1.1 \pm 0.80
<i>DCMU^b</i>						
pNA2	-	-	6.2 \pm 5.9	4.2 \pm 1.2	0.4 \pm 0.06	95.8 \pm 1.2
S232A	-	-	5.3 \pm 5.1	4.6 \pm 1.2	0.5 \pm 0.06	95.4 \pm 1.2
N234D	-	-	12.7 \pm 8.7	5.8 \pm 1.1	0.5 \pm 0.05	94.2 \pm 1.1
S232AN234D	-	-	21.7 \pm 16.0	7.1 \pm 2.2	0.6 \pm 0.02	92.9 \pm 2.2

クロロフィル蛍光の減衰曲線から 3 つの成分 (Fast phase, middle phase, slow phase) の時定数 ($t_{1/2}$) と構成比率 (amplitude) を求めた。データは平均値と標準偏差である。

表 3 PSII 複合体に結合している脂質の組成

Strain	Sample	Total	Lipid class			
			MGDG	DGDG	SQDG	PG
		<i>(nmol/ μgChl)</i>			<i>(mol%)</i>	
pNA2	Mixture	0.932 ± 0.02	32.9 ± 1.4	17.3 ± 1.4	27.5 ± 0.5	22.3 ± 0.8
	Dimer	0.626 ± 0.01	28.8 ± 2.0	17.9 ± 1.6	25.7 ± 0.6	27.6 ± 1.6
S232AN234D	Mixture	0.934 ± 0.06	35.6 ± 1.4	16.9 ± 0.7	27.9 ± 0.7	19.6 ± 2.0
	Dimer	0.594 ± 0.00	32.6 ± 2.2	17.0 ± 0.8	25.2 ± 1.3	25.3 ± 1.0

データは独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差である。

表 4 二量体 PSII に結合している脂質の脂肪酸組成

Fatty acid	pNA2				(mol%)	S232AN234D			
	MGDG	DGDG	SQDG	PG		MGDG	DGDG	SQDG	PG
14:0	2.1±0.6	nd	2.0±1.0	5.0±0.9		2.1±1.2	nd	1.4±0.1	5.4±1.1
16:0	52.8±0.9	53.6±0.4	64.3±2.1	54.0±1.0		51.5±3.6	52.6±1.2	65.8±0.8	55.1±1.4
16:1 (9)	6.8±1.1	9.2±0.1	11.7±2.1	5.8±1.3		8.1±2.8	11.8±1.0	11.9±0.8	6.5±1.2
18:0	3.6±1.2	4.0±0.3	3.3±1.1	5.7±2.7		3.4±1.8	6.1±0.8	3.1±0.4	6.3±1.1
18:1 (9)	6.6±0.9	6.1±0.5	9.0±2.8	11.6±2.0		7.6±0.5	6.0±0.2	9.4±0.5	10.6±0.2
18:1 (11)	0.2±0.2	0.1±0.1	1.1±1.7	0.1±0.2		0.1±0.2	0.3±0.6	nd	nd
18:2 (9, 12)	11.0±0.9	11.1±0.9	7.0±0.9	16.2±2.2		10.3±1.1	9.0±0.4	6.6±0.1	14.2±0.7
18:3 (6, 9, 12)	17.0±1.9	16.0±0.5	1.6±0.4	0.8±0.2		17.0±1.4	14.2±1.5	1.8±0.2	1.0±0.2
18:3 (9, 12, 15)	nd	nd	nd	0.9±0.6		nd	nd	nd	0.9±0.4

データは独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差である。

表 5 PSII 複合体に結合している脂質の分子数

Strain	Sample	Chlorophyll	Lipid				
			Total	MGDG	DGDG	SQDG	PG
<i>(numbers/ 2 Pheo)</i>							
pNA2	Mixture	46.8 ± 3.2	39.1 ± 0.8	12.9 ± 0.4	6.8 ± 0.7	10.7 ± 0.2	8.7 ± 0.3
	Dimer	44.6 ± 4.0	25.2 ± 1.5	7.3 ± 0.9	4.5 ± 0.6	6.5 ± 0.3	6.9 ± 0.0
S232AN234D	Mixture	47.8 ± 2.0	40.1 ± 2.8	14.3 ± 1.0	6.8 ± 0.2	11.2 ± 0.8	7.9 ± 1.0
	Dimer	47.0 ± 2.4	25.0 ± 0.3	8.1 ± 0.6	4.2 ± 0.2	6.3 ± 0.3	6.3 ± 0.2

PSII に含まれる 2 分子のフィオフィチンあたりのクロロフィル分子数と脂質分子数を示す。データは独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差である。

アミノ酸残基 (タンパク質) 結合距離, Å				アミノ酸残基 (タンパク質) 結合距離, Å			
PG 664	Arg 7 (CP47)	2.83	PG 772	Ser 11 (PsbE)	2.89		
	Tyr 141 (D2)	2.42		Tyr 262 (D1)	3.83		
	Ser 232 (D1)	3.35		Thr 5 (PsbE)	3.54		
	Asn 234 (D1)	2.77					
PG 694	Tyr 6 (CP47)	2.60	PG 714	Thr 231 (D2)	2.61		
	Ser 232 (D1)	2.64		Arg 140 (D1)	2.70		
	Asn 234 (D1)	2.92		Arg 447 (CP43)	3.74		
	Glu 11 (PsbL)	2.67		Ser 230 (D2)	2.94		
PG 702	Ser 262 (D2)	2.55					
	Asn 263 (D2)	3.00					
	Asn 13 (PsbL)	3.00					

図4 X線結晶構造解析で明らかになった PSII の構造から推定される PG 分子とタンパク質とのアミノ酸残基の相互作用

赤字で示すのは PG 分子のリン酸の酸素原子と水素結合していると推定されるアミノ酸残基、青字で示すのは PG 分子のグリセロール骨格の酸素原子と水素結合していると推定されるアミノ酸残基を示している。

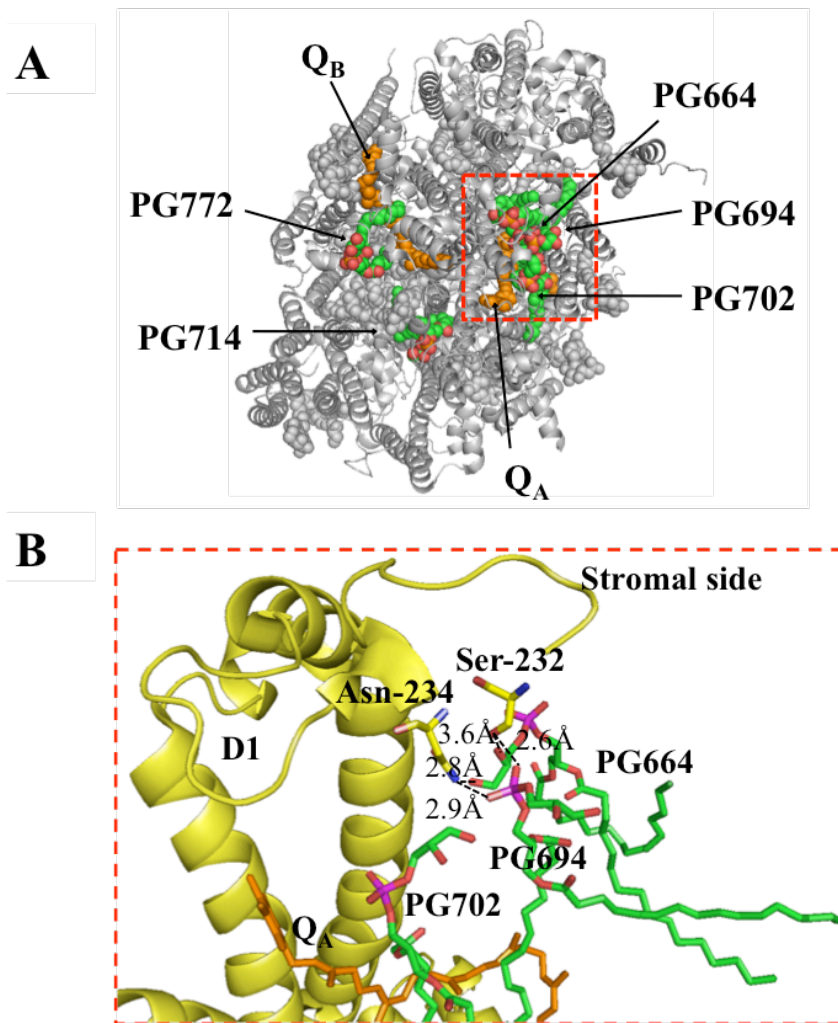


図5 PSIIに存在する5つのPG分子の局在

(A) 単量体あたり5つのPG分子、PG664、PG694、PG702、PG714とPG772が局在している。PG分子の炭素原子、酸素原子、リン原子をそれぞれ緑色、赤色、橙色で示す。また、プラストキノン分子を橙色で示す。(B) 3つのPG分子、PG664、PG694とPG702はQA結合サイトの近傍に局在している。D1タンパク質におけるアミノ酸の炭素原子、酸素原子、窒素原子をそれぞれ黄色、赤色、青色で示す。PG分子の炭素原子、酸素原子、リン原子をそれぞれ緑色、赤色、紫色で示す。また、プラストキノン分子を橙色で示す。

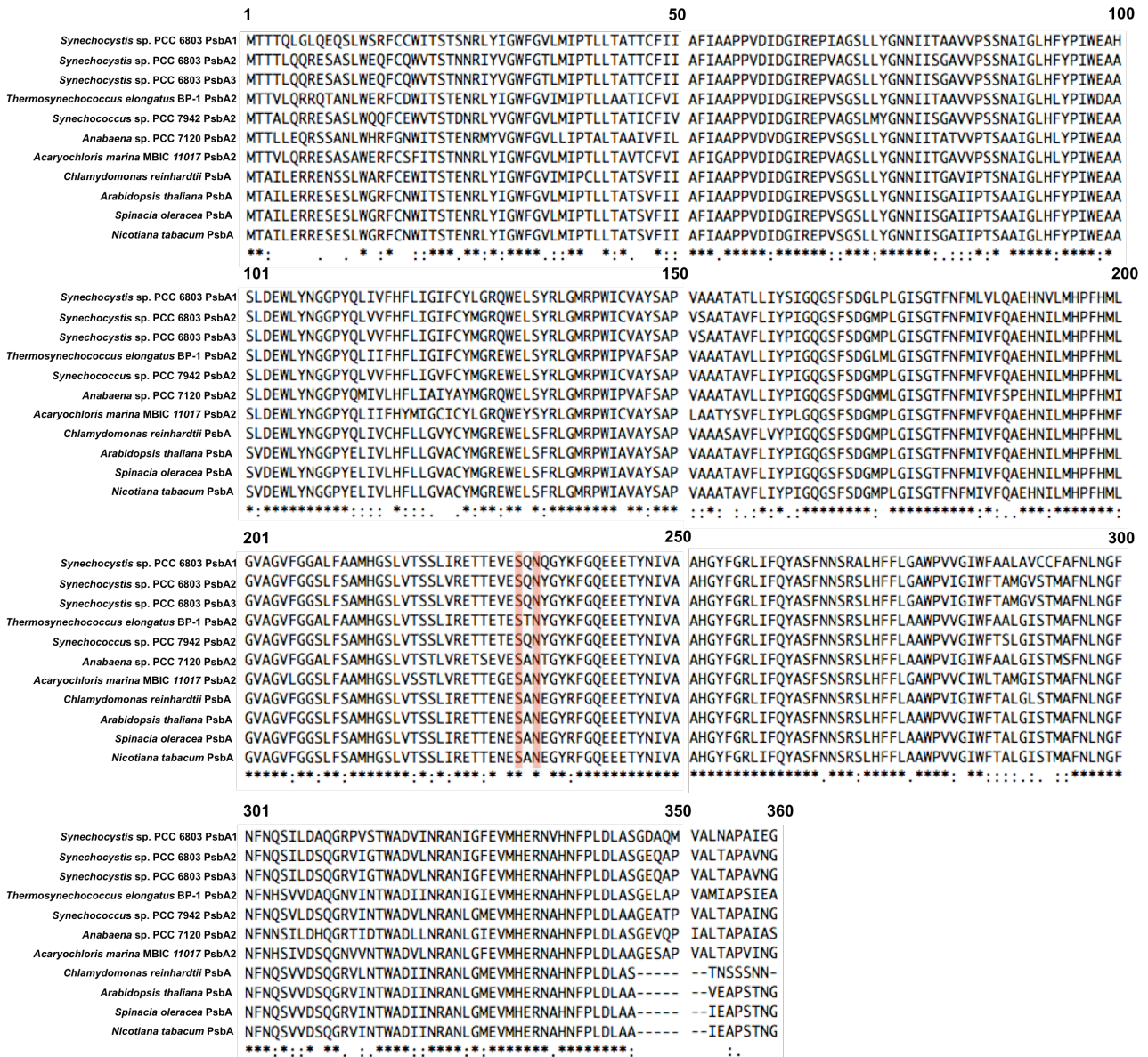


図6 異なる生物間における D1 タンパク質のアミノ酸配列のアライメント
Synechocystis における 3 つの D1 タンパク質 (PsbA1、PsbA2、PsbA3) と他のシアノバクテリア、緑藻、高等植物の D1 タンパク質のアミノ酸配列をアライメントした結果である。D1 タンパク質の Ser-232 と Asn-234 を赤で示す。

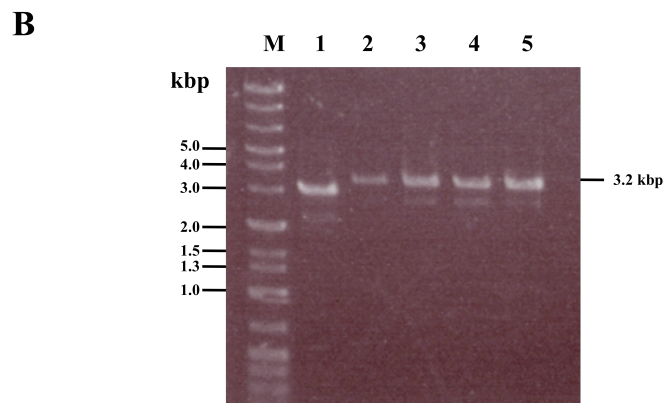
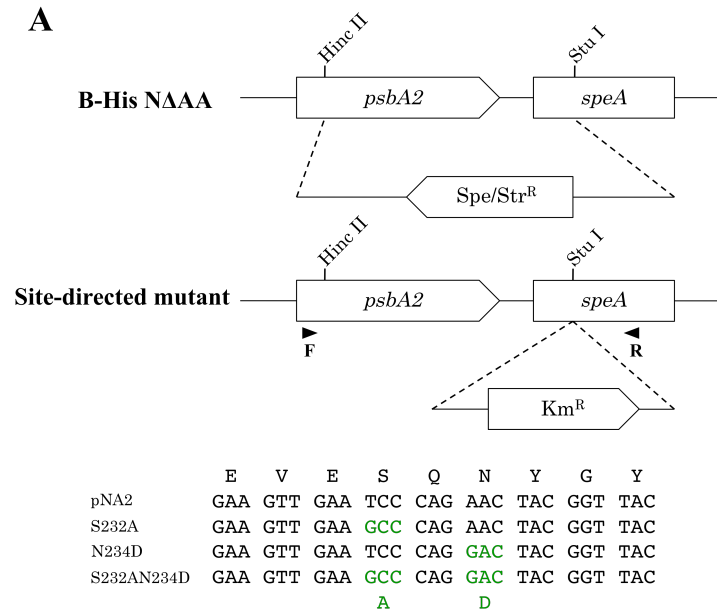


図7 *psbA2* 遺伝子の部位特異的変異株の作製

(A) D1 タンパク質欠損株 (B-His N Δ AA) では *psbA2* と *speA* 遺伝子の一部が Spe/Str^R カセットで置換されている。部位特異的変異を導入した *psbA2* 遺伝子を用いて宿主株である B-His N Δ AA 株を形質転換した。*speI* 遺伝子の *StuI* サイトに Km^R カセットを導入した。(B) 変異株において野生型の *psbA2* 遺伝子が部位特異的変異を導入した *psbA2* 遺伝子に完全に置き換わったかを PCR で確認した。左から B-His N Δ AA (レーン 1)、pNA2 (レーン 2)、S232A (レーン 3)、N234D (レーン 4)、S232AN234D (レーン 5) の PCR 産物を分析した結果を示している。

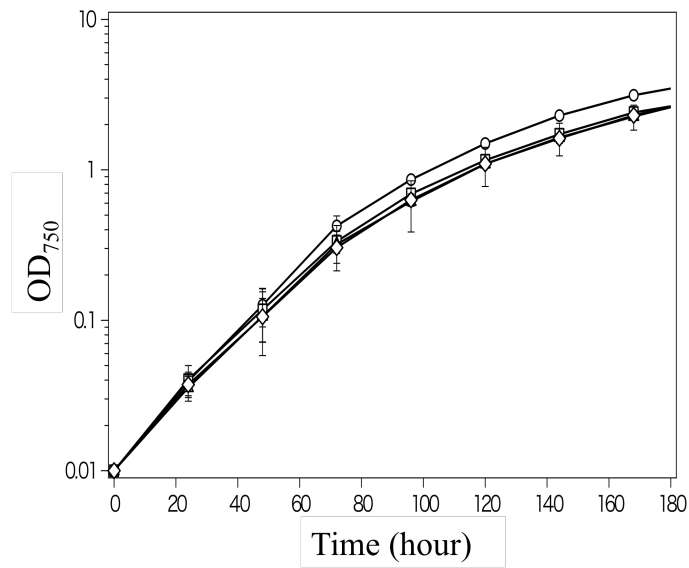


図8 液体培地中でのコントロール株と部位特異的変異株の増殖曲線
 各変異株の細胞の増殖を750 nmの濁度を測定することでモニターした。データはコントロール株を丸、S232A株を四角、N234D株を三角、S232AN234D株をダイヤモンドで示している。データは独立した3回の実験の平均値と標準偏差である。

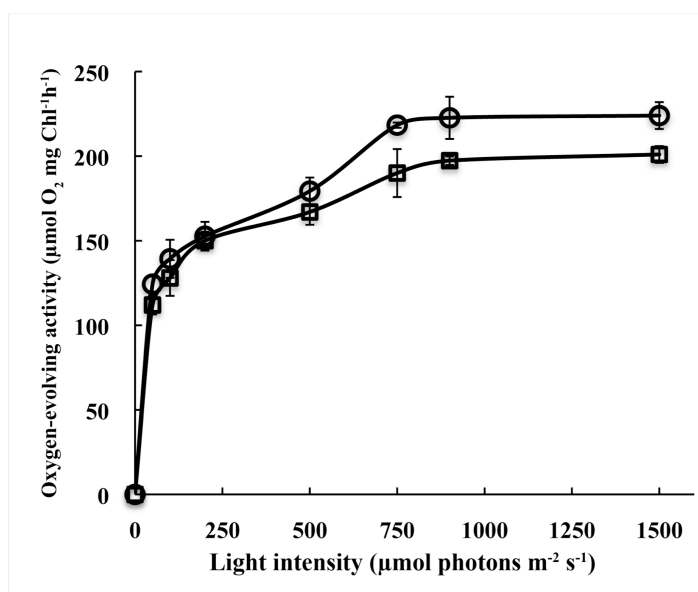


図9 細胞の酸素発生活性の光強度依存性

酸素発生活性を測定するときに照射する光の強度を変化させて活性を測定した。コントロール株のデータを丸、S232AN234D 変異株のデータを四角で示す。データは独立した3回の実験の平均値と標準偏差である。

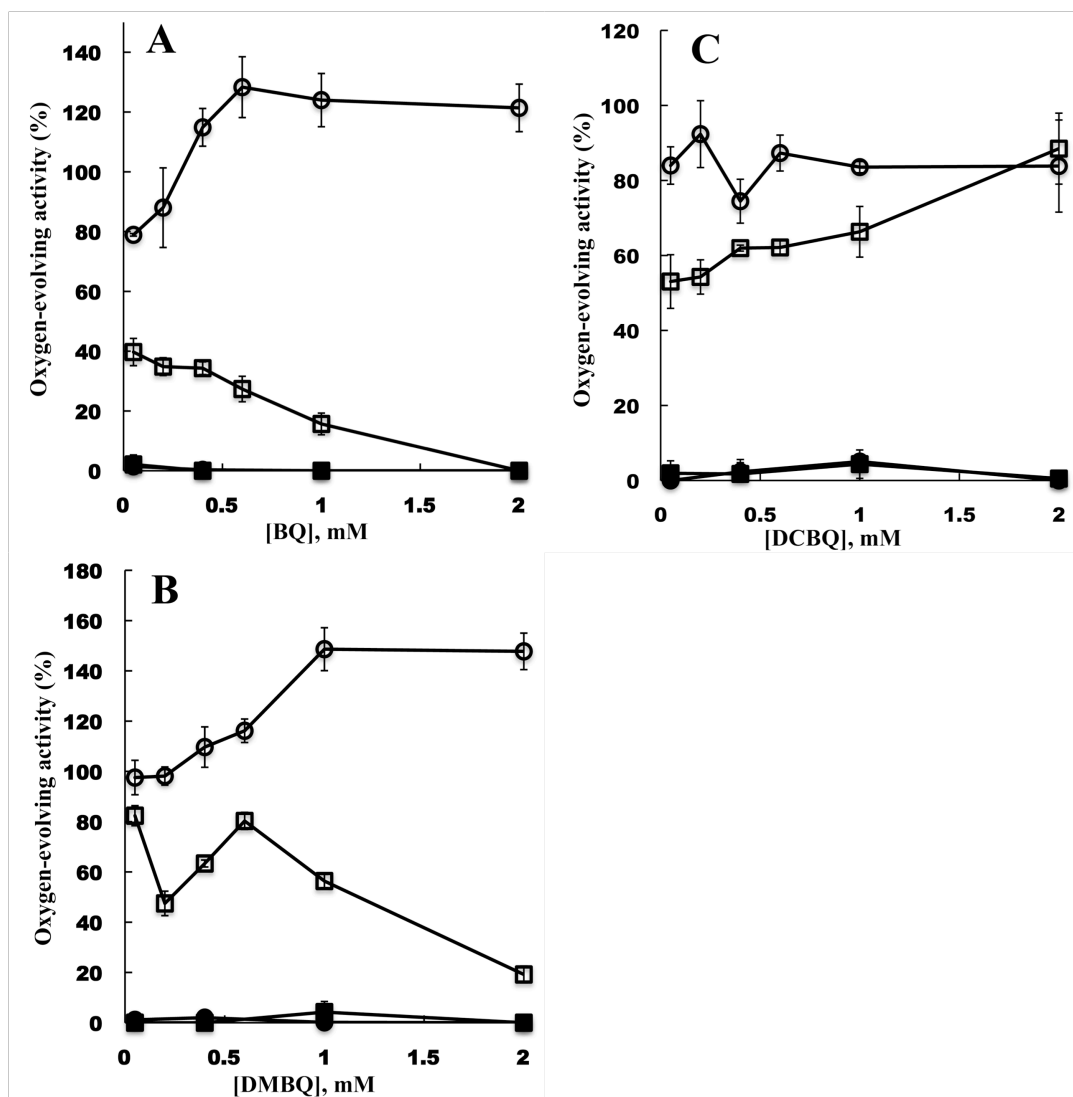


図10 異なるキノンを用いたときの細胞のPSII活性

PSIIの電子受容体であるキノン、BQ (A)、DMBQ (B)、DCBQ (C)を添加してPSII活性を測定した。DCMU存在下での活性は白記号、非存在下での活性は黒記号で表す。コントロール株のデータを丸、S232AN234D変異株のデータを四角で表す。データは独立した3回の実験の平均値と標準偏差である。

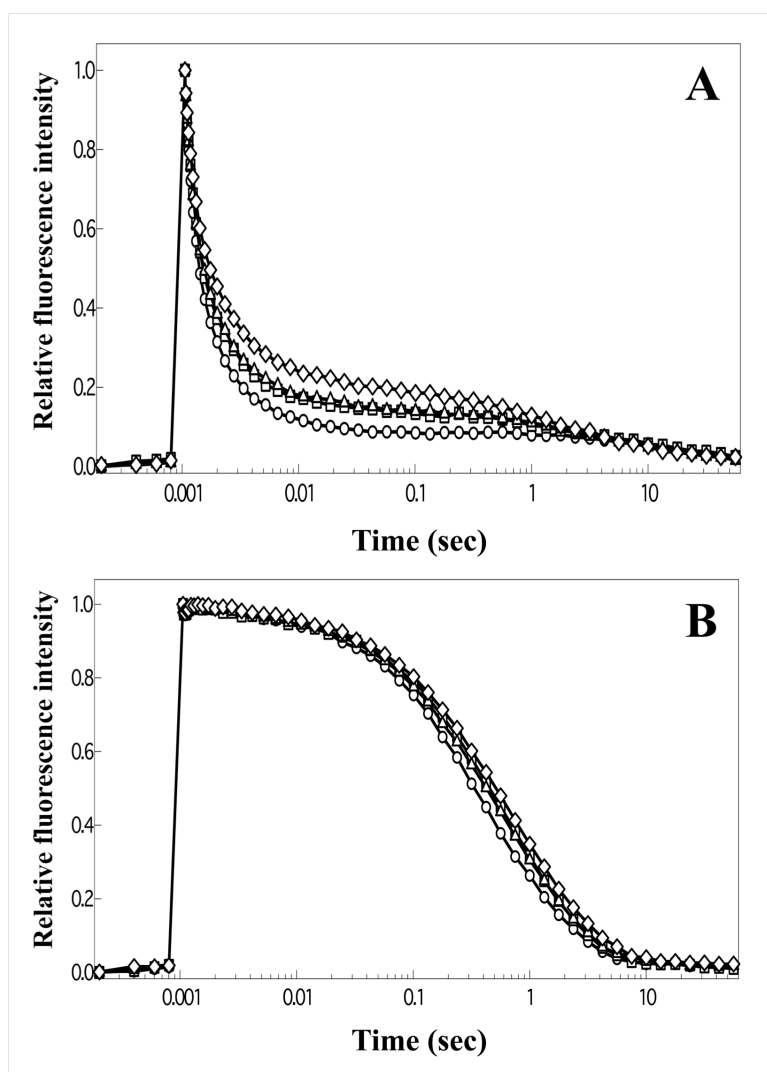


図 11 閃光の照射後に起こる PSII での電子伝達に伴うクロロフィル蛍光の変化
 10 μ M の DCMU の非存在下 (A) と存在下 (B) で細胞のクロロフィル蛍光の減衰を測定した。データはコントロール株を丸、S232A 株を四角、N234D 株を三角、S232AN234D 株をダイヤモンドで示している。データは独立した 3 回の実験の平均値と標準偏差である。

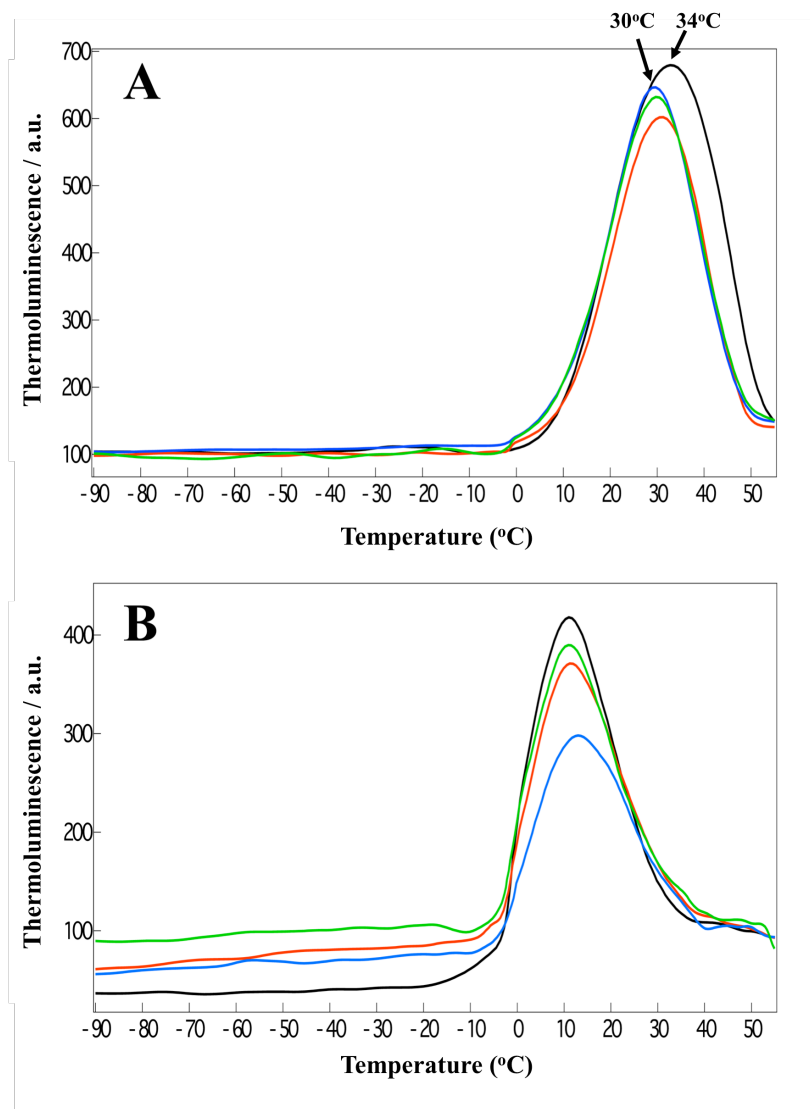


図 12 細胞の熱発光スペクトル

10 μM の DCMU の非存在下 (A) と存在下 (B) での熱発光スペクトルを示している。データはコントロール株を黒線、S232A 変異株を赤線、N234D 変異株を青線、S232AN234D 変異株を緑線で示している。暗所処理した細胞に 1 回の閃光を照射した後、液体窒素で瞬時に凍結して測定を開始した。

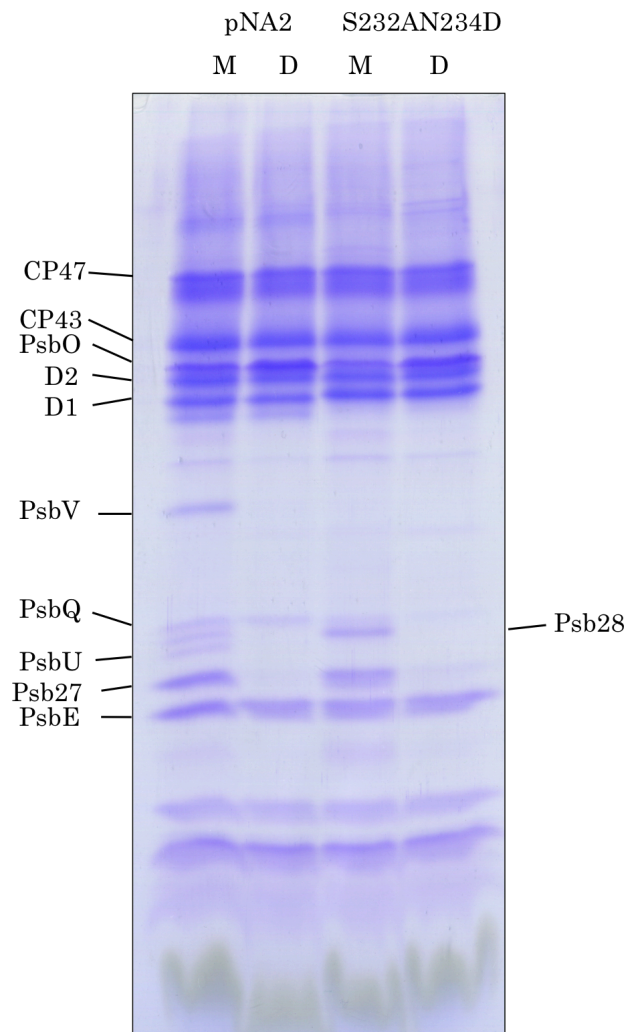


図13 グリセロール密度勾配遠心によって分離しての PSII 単量体 (M) と二量体 (D) に存在するタンパク質
 コントロール株と S232AN234D 変異株の単量体と二量体 PSII を SDS-PAGE で解析した。5 μ g Chl に相当する PSII を 1 レーンに使用した。

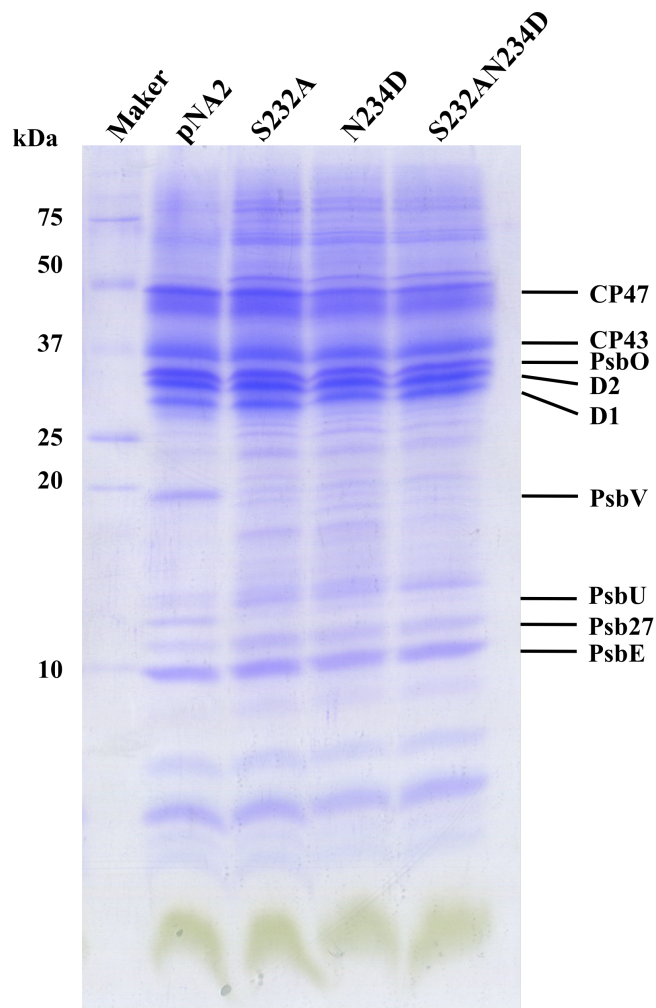


図 14 コントロール株と部位特異的変異株から精製した PSII 複合体に存在するタンパク質

コントロール株、S232A 株、N234D 株と S232AN234D 株から精製した PSII を SDS-PAGE で分析した。5 μ g Chl に相当する PSII を 1 レーンに使用した。

4 章

好熱性シアノバクテリアの PG 合成欠損株を用いた PG の機能解析

4-1. 序論

2 章と 3 章では PSII に結合している PG1 分子ごとの機能を PG と相互作用するアミノ酸残基を改変することで解析した。しかし、PG と相互作用するアミノ酸残基を変化させたときの PSII の変化から PG 分子の機能は明らかになってきたものの、そのときの PSII の詳細な構造変化までは分からなかった。PG 分子が欠損したときの PSII の構造変化を明らかにするためには X 線結晶構造解析による解析が必要である。先行研究において、PSII の X 線結晶構造解析は好熱性シアノバクテリアである *Thermosynechococcus vulcanus* と *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を用いて行われている (Guskov et al. 2009, Umena et al. 2011)。また *T. elongatus* BP-1 の D1 タンパク質に部位特異的変異を導入した変異株の生化学的解析が報告されている (Sugiura et al. 2008)。

T. vulcanus と *T. elongatus* は近縁種である。好熱性シアノバクテリアのタンパク質は熱耐性が高く、光化学系複合体のようなタンパク質複合体も高い安定性をもっている。この 2 種の好熱性シアノバクテリアではゲノムの全遺伝子配列がすでに決定されている。また *T. elongatus* においては自然形質転換法やエレクトロポレーションを使用した方法による、形質転換体の作製技術も確立されている。

そこで 4 章では 2、3 章で作製した *Synechocystis* の部位特異的変異株における PSII の構造変化を解析するためには、好熱性シアノバクテリアを用いる必要があると考え、*T. elongatus* を用いることにした。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。そのため、好熱性シアノバクテリアにおける PG の機能が *Synechocystis* と同じとは限らない。そこで、異なるシアノバクテリア間で PG の機能が保存されているかを、*T. elongatus* の PG 合成欠損株を作製して *Synechocystis* の変異株と比較することで解析した。

4-2. 材料・方法

培養方法

本研究で使用した *T. elongatus* BP-1 の野生株と変異株の細胞は 45°C、30 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の連続光を照射して培養した。培養には 4 mM HEPES (pH 7.5) を含む BG11 に 10 mM NaHCO_3 を添加した培地を使用した。寒天培地を用いる場合は 0.3% (w/v) チオ硫酸ナトリウム、1.5% (w/v) Bacto agar を培地に添加した。液体培養では 50 mL の培地を入れた試験管に空気を通気して行った。培地に PG を添加する場合は、終濃度 20 μM のジオレオイル PG (P9664, シグマアルドリッチ) を添加した。

PG 合成欠損株の作製

T. elongatus における *pgsA* 遺伝子 (*tll1275*) と 5'側の 1.0 kbp、3'側の 1.4 kbp の領域を PCR で増幅させた。プライマーは F (5'-TGCGCTCGAGCATGAATCAAATCC-3') と R (5'-CACACCGTCAGCCAGTTTGTC-3') を使用した。得られた約 2.9 kbp の PCR 産物を *XhoI* と *HindIII* で切断した後、pBluescript II SK⁻ベクターの同制限酵素サイトに挿入した。このプラスミドを *AccI* と *NheI*

で切断して *pgsA* 遺伝子の一部 (0.3 kbp) を除き、そこに Spe/ Str^R 耐性遺伝子カセットを挿入した。この作製したプラスミドを用いて、*T.elongatus* BP-1 の野生株を自然形質転換法で形質転換した (Iwai et al. 2004b)。形質転換体の選別は 5 µg mL⁻¹ Spe と 10 µg mL⁻¹ Str を含む BG11 寒天培地を用いて行った。2つのプライマー、F (5'-ACCGCATAGGGAGTCATTGC-3') と R (5'-TCTTGATATTCGCGATACGG-3') を使用して、変異株において目的の遺伝子が破壊されているかどうかを確認した。

光合成活性の測定

細胞の光合成活性 (酸素発生活性) の測定には、対数増殖期 (OD₇₃₀ = 0.6~1) の細胞を使用した。細胞を遠心 (2,300×g) によって回収し、沈殿した細胞を BG-11 培地に 5 µg Chl mL⁻¹ になるように懸濁した。その細胞懸濁液を弱光下でロータリーシェイカー (NR-3 TAITEC) を使用して震とう (120 rpm) しながらインキュベートした (45°C, 1 時間)。その後、電子受容体として終濃度 2 mM の DCBQ もしくは DMBQ を添加し、クラーク型酸素電極 (Hansatech) を用いて細胞の PSII 活性を測定した。*T. elongatus* BP-1 では Net 活性 (H₂O→CO₂) が測定できないことが先行研究で明らかになっている (Iwai et al. 2004a)。

脂質分析

TLC とガスクロマトグラフィーを用いた脂質分析は 2 章で記述した方法で行った。30 µg Chl に相当する細胞から脂質を抽出して脂質分析を行った。

チラコイド膜の精製と BN (ブルーネイティブ) -PAGE

T. elongatus BP-1 のチラコイド膜の精製は 2 章で記述した方法で行った。ただし、緩衝液 A の代わりに緩衝液 A2 [40 mM MES-NaOH (pH 6.5), 15 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 25% (w/v)グリセロール] を使用した (Sugiura and Inoue 1999)。BN-PAGE を用いた光化学系複合体のタンパク質組成の分析は、1 mg Chl mL⁻¹ に調節したチラコイド膜を終濃度 1% (w/v) の DM を加え、20 分間、氷上で可溶化した。その後、26,000×g、20 分間の遠心を行い、その上清に 5% (w/v) の CBB G-250 をサンプルの体積の 1/10 量加えた。4-16% (w/v) のビストリスポリアクリルアミドグラジエントゲル (Thermo Fisher) を使用し、アノード緩衝液 [50 mM Bis-Tris (pH 7.0)] とカソード緩衝液 [50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris (pH 7.0), 0.02% CBB G-250] を泳動槽に入れ、60 V 定電圧で 1 時間電気泳動した (Schägger and von Jagow 1991)。CBB を含まないカソード緩衝液 [50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris (pH 7.0)] に交換し、100 V 定電圧で 1 時間泳動した。その後、電圧を 150 V に切り替えてゲルの底部まで泳動した。

2 次元 SDS-PAGE をする場合は BN-PAGE 後のゲルを可溶化溶液 [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% (w/v) グリセロール, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール] で 30 分間、室温でゆっくり振とうさせた。可溶化処理したゲルを 7.5 M の尿素を含む 16-22% のポリアクリルアミドグラジエントゲルを用いて SDS-PAGE を行った。ゲルは銀染色法を用いて、タンパク質のバンドを検出した。

4-3. 結果と考察

T. elongatus BP-1 における *pgsA* 変異株の作製

T. elongatus BP-1 における PG の機能を調べるため、作製した *pgsA* 変異株を PG を添加した培地と添加していない培地で生育させた。*T. elongatus* BP-1 の *tll1275* 遺伝子と *Synechocystis* の *pgsA* 遺伝子 (*sll1522*) にコードされたタンパク質のアミノ酸配列は、64%のアミノ酸が一致することから、*tll1275* は *pgsA* 遺伝子であると推定された。PG 合成欠損株は *tll1275* 遺伝子に Spe/ Str^R 耐性遺伝子カセットを導入して遺伝子を破壊することで作製した (図 26)。形質転換株は薬剤を含む寒天培地で選別し、PCR を用いて全遺伝子が破壊されていることを確認した。破壊された遺伝子のセグリゲーションを確認するためのプライマーセットを用いた PCR では、野生株の場合、800 bp 付近にバンドが検出されるのに対し、*pgsA* 変異株では 1800 kbp 付近にのみバンドが検出されることから、変異株では *pgsA* 遺伝子が完全に破壊されていることが確認された (図 26)。作製した変異株を寒天培地上で生育させた結果、*pgsA* 株は PG を添加した培地では野生株と同様に増殖できることが明らかになった (図 27)。しかし、PG を添加していない培地では *pgsA* 株は全く増殖できなかった。また、*pgsA* 株を液体培地中で生育させたときも同様で、PG を添加している培地でのみ *pgsA* 株は野生株と同様に増殖できた。PG を添加していない培地では、最初は細胞内に残っている PG を利用して増殖することができるが、7 日間ほど培養することにより増殖は停止した。また、200 時間ほど PG を添加しない培地で培養した変異株の細胞を

再び、PG を添加していない培地で培養しても増殖することができなかった。このことから、*T. elongatus* においても *Synechocystis* と同じように生育に PG が必要不可欠であることが明らかになった。

脂質組成の変化

作製した *pgsA* 変異株を、PG を添加した培地で増殖させ、その後、PG を添加した培地としていない培地で 7 日間培養した細胞の脂質分析を行った (図 28)。それぞれの *pgsA* 変異株の細胞から脂質を抽出し、TLC で各脂質クラスに分離後、ガスクロマトグラフィーで脂質の定量を行った。PG を添加した培地で生育させた細胞は PG を取り込んでいる分、全脂質に対する PG の割合が 8.6% と PG 無添加の培地で培養した野生株 (3.5%) に比べ高くなっていた。しかし、7 日間 PG を添加していない培地で育てた細胞では PG は 1.5% であった。これは PG が添加されていない培地で培養すると、細胞内の PG 含量が低下するため、増殖できなくなることを示唆している。*Synechocystis* の *pgsA* 株では PG を添加していない培地で培養することで、増殖速度が低下し、細胞内の PG 含量も大幅に減少している。しかし、*T. elongatus* の *pgsA* 株では PG を添加した培地から添加していない培地に移しても、増殖はある程度維持されている。*T. elongatus* の細胞内の PG 含量は *Synechocystis* と比べると大幅に少ないため、生育に対する PG の重要性は *Synechocystis* の方が高いのかもしれない。

PG の光合成における役割

脂質分析のときと同じく、PG を添加した培地と添加していない培地で 7 日間

培養した細胞の PSII 活性を測定した (表 8)。PSII の電子受容体として、DCBQ と DMBQ を用いた。細胞の PSII 活性は DMBQ よりも DCBQ を用いたときの方が、活性が高かった。DCBQ の場合、PG を添加した培地で生育させた *pgsA* 変異株の PSII 活性は $220 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であり野生株と同じであった。一方、PG を添加していない培地で生育させた *pgsA* 変異株では、PSII 活性は $130 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ であった。このことから、細胞内の PG が欠乏した結果、光合成の機能に影響があったことが示唆された。しかし、*Synechocystis* の *pgsA* 変異株では細胞が PG 欠乏状態になったとき、PSII 活性を測定するために BQ などの電子受容体を与えると、PSII 活性が大きく阻害されることが分かっている (Hagio et al. 2000)。*T. elongatus* では PSII 活性が PG 欠乏状態でもある程度維持されていることから、*Synechocystis* と *T. elongatus* では PG が欠乏したときの PSII の構造変化に違いがある可能性がある。

また、PG を培地に添加したときとしていないときの *pgsA* 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 (図 29)。BN-PAGE で検出された複合体の同定は、BN-PAGE のゲルを SDS-PAGE で二次元展開して調べた。培地に PG を添加して培養した *pgsA* 株では、三量体 PSI と二量体 PSII のバンドが確認できた。PG を添加せずに培養した *pgsA* 株では三量体 PSI が減少し単量体 PSI が増加していた。また、二量体 PSII のバンドがほとんど検出されず、単量体 PSII が顕著に増加していた。*Synechocystis* を用いた先行研究において PG 欠乏状態に陥ってから短期間では、PSII の単量体化が主に引き起こされることが明らかになっている (Sakurai et al. 2003)。また、PG 欠乏状態になってから 14 日目以上で単量体 PSI が蓄積することが分かっている

(Domonkos et al. 2004)。したがって、本研究では *T. elongatus* BP-1 においても *Synechocystis* と同じ様に、PG は光化学系複合体の形成に大きな役割を担っていることが明らかになった。

表 8 *T.elongatus* BP-1 の野生株と *pgsA* 変異株の光合成活性

Strain	Growth condition	Oxygen-evolving activity ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	
		DCBQ	DMBQ
WT	- PG	217 \pm 17	203 \pm 10
<i>pgsA</i>	+ PG	216 \pm 13	187 \pm 10
<i>pgsA</i>	- PG	132 \pm 7	111 \pm 8

対数増殖期の細胞を回収し、各細胞のクロロフィル濃度を $5 \mu\text{g Chl mL}^{-1}$ に調節して測定した。

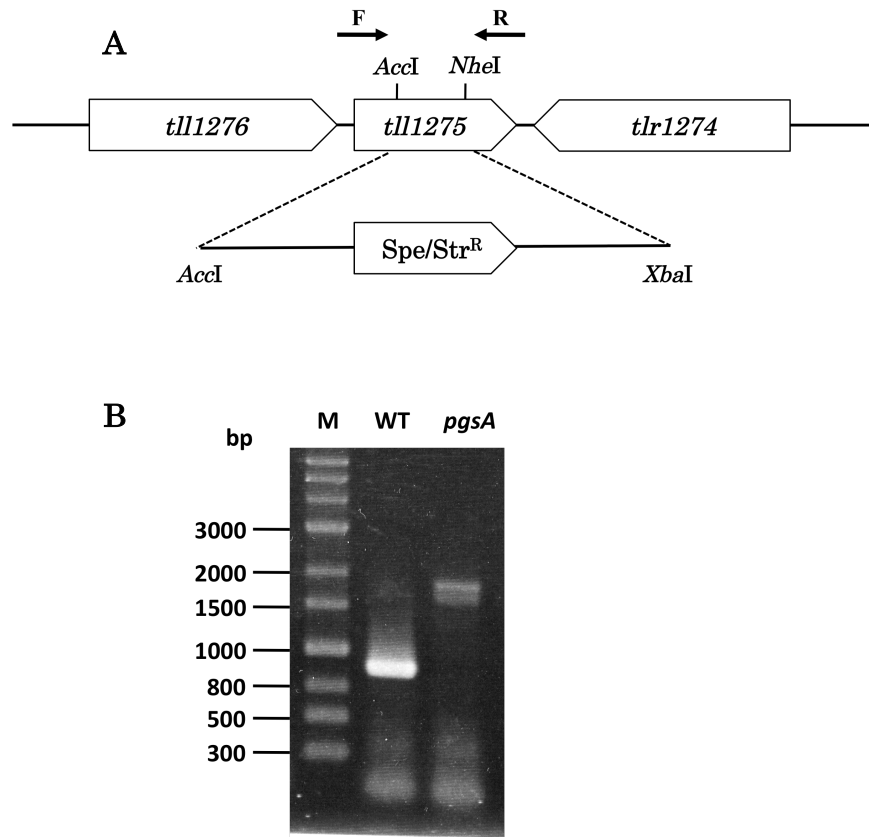


図 26 *T. elongatus* の PG 合成欠損株の作成

(A) *T. elongatus* BP-1 の *pgsA* 遺伝子 (*tll1275*) の一部を除き、そこに Spe/Str^R 薬剤耐性カセットを導入することで変異株を作製した。(B) 作製した変異株において、遺伝子が完全に破壊されていることを PCR で確認した。

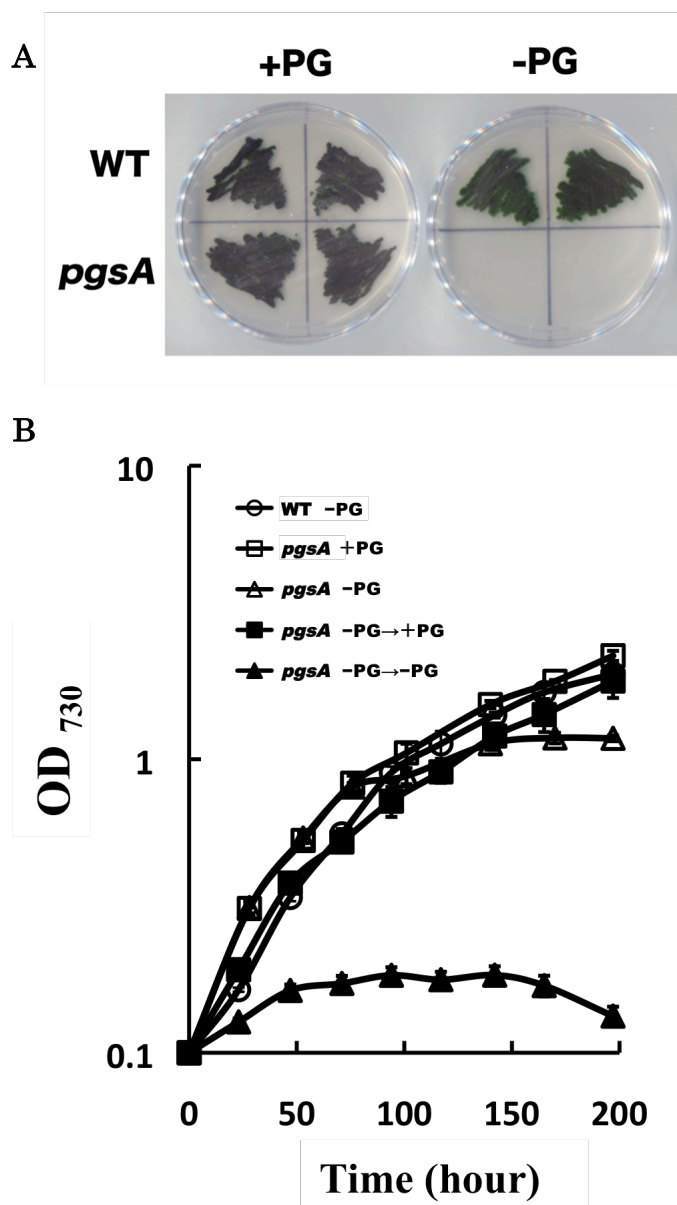


図 27 *T. elongates* BP-1 の野生株と PG 合成欠損株 (*pgsA* 変異株) の生育

(A) *T. elongatus* BP-1 の野生株と *pgsA* 変異株を、PG を添加した寒天培地 (+PG) と PG を添加していない寒天培地 (-PG) で生育した。(B) PG 有無の液体培地中での野生株と *pgsA* 変異株の増殖。野生株は PG 無添加の培地で増殖させた。変異株の場合は PG 添加培地で増殖させた細胞を PG 添加培地 (+PG) と無添加の培地 (-PG) で増殖された。PG 無添加培地で増殖させた細胞については、さらに PG 添加培地 (-PG → +PG) と無添加培地 (-PG → -PG) に移して培養した。

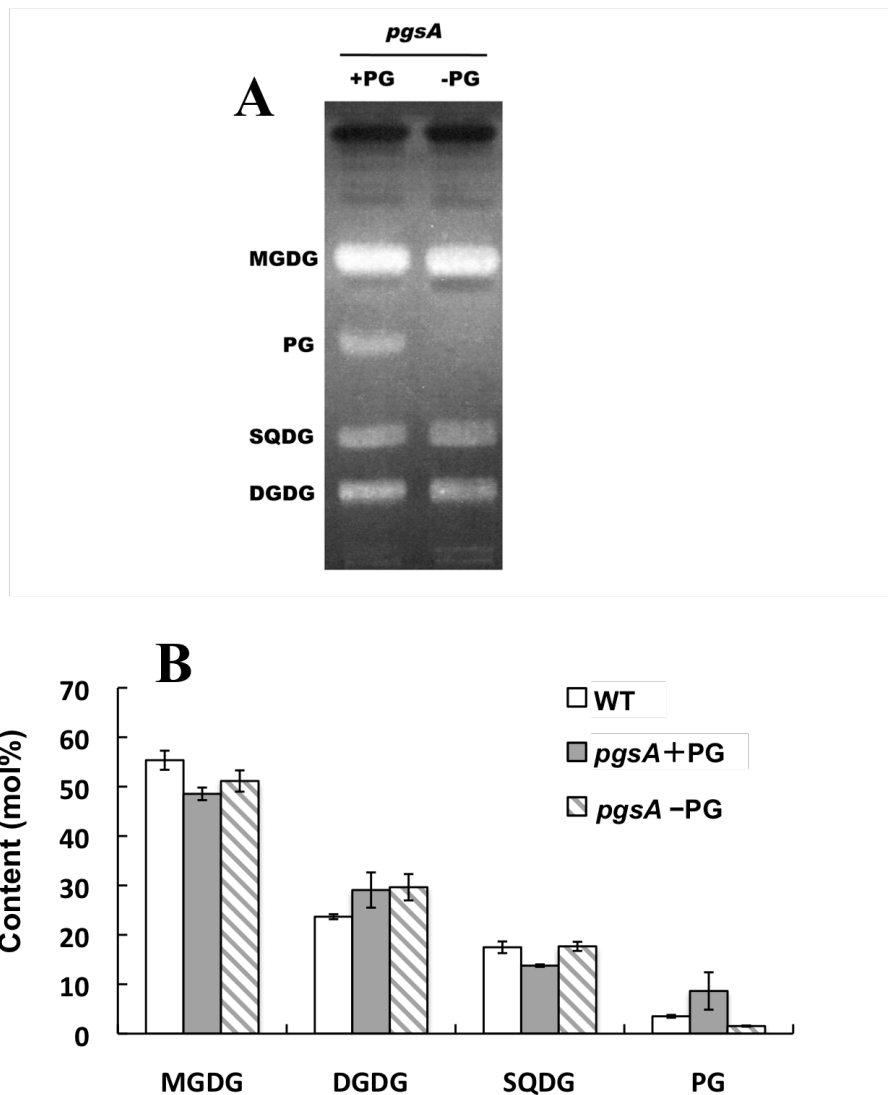


図 28 *T. elongatus* BP-1 の細胞の脂質分析

(A) PG を添加して培養した *pgsA* 変異株の細胞と PG 無添加培地で 7 日間培養した *pgsA* 変異株の細胞から脂質を抽出後、TLC を用いて各脂質クラスに分離した。(B) TLC で分離した各脂質クラスをガスクロマトグラフィーによって定量した *pgsA* 変異株の脂質組成。

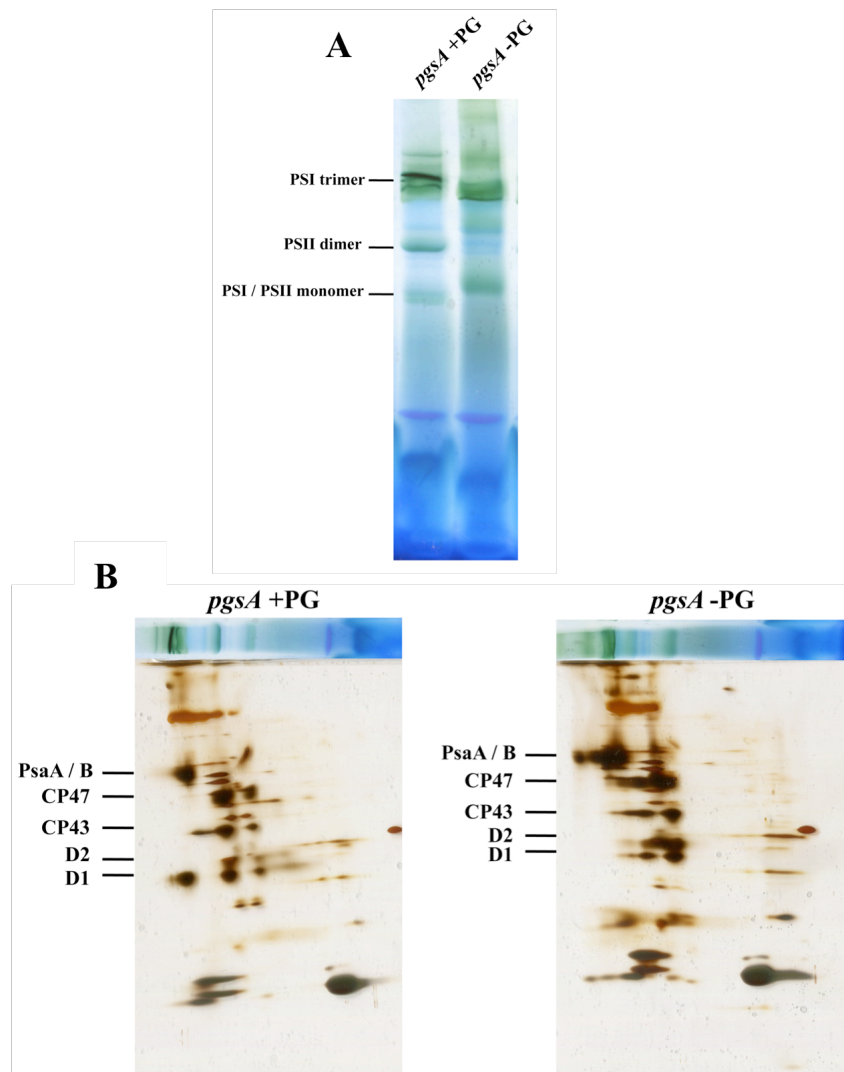


図 29 BN-PAGE と SDS-PAGE による光化学系タンパク質複合体の分析

(A) PG を添加して培養した *pgsA* 変異株と PG 無添加培地で 7 日間培養した *pgsA* 変異株の細胞からチラコイド膜を精製した。可溶化したチラコイド膜 (4 μg Chl に相当) を BN-PAGE で分析した。(B) BN-PAGE で分離した各タンパク質複合体のタンパク質組成を SDS-PAGE で分析した。

5. 総括

先行研究において PG は PSII の機能の維持に大変重要であることが明らかになっており、本研究では PSII に 5 分子存在する PG がそれぞれどのような役割を果たしているかを解明することを目的に実験を行った。2 章と 3 章では PG と相互作用するタンパク質のアミノ酸残基を改変させ、PSII 複合体と PG 分子の相互作用を変化させたときの影響を調べた。Q_A 側に存在する PG664 と PG694、Q_B 側に存在する PG772 と相互作用するタンパク質のアミノ酸残基を改変した変異株を作製した結果、*pgsA* 変異株を用いた先行研究の解析結果を支持する結果がいくつか得られた。また、脂質分析の結果から、実際に作製した変異株では PG と相互作用するアミノ酸残基の改変が PG と PSII 複合体の結合を不安定化させた可能性が考えられる。特に、今回解析を行った部位特異的変異株では、PSII 複合体と PG 分子の相互作用を変化させたことにより PsbV と PsbU が欠損していた。変異株では PG とアミノ酸残基との相互作用が変化することで、表在性タンパク質の結合が不安定化することが明らかになった。*pgsA* 変異株では PsbO も減少していることが明らかになっていることから (Sakurai et al. 2007)、PSII に存在するそれぞれの PG 分子が表在性タンパク質の結合に寄与しており、複数の PG 分子が欠損することで PsbO の結合が弱くなると予想できる。先行研究において *Synechocystis* の DGDG 合成欠損株から精製した PSII 複合体でも表在性タンパク質が欠損していることが明らかになっている (Sakurai et al. 2007)。しかし、PSII 内では PG はストロマ側、DGDG はルーメン側に位置しているため、PG はどちらかと言えば表在性タンパク質と距離が離れている。ただし、本研究

で注目した PG664 と PG694 は PsbU の上部に、また、PG772 は PsbV の上部に位置していることから、これらの PG 分子が表在性タンパク質と何らかの相互作用をしている可能性がある。*Synechocystis* の PsbU 欠損変異株から精製した PSII では PsbV がほぼ欠損することがわかっている (Inoue-Kashino et al. 2005)。*Synechocystis* において PsbV と PsbU の 2 つのタンパク質は互いに存在することで PSII 複合体に結合していることが示唆されている。本研究の部位特異的変異株でも、片方の表在性タンパク質が PSII から欠損したことで、もう一方の表在性タンパク質も欠損した可能性が考えられる。また、部位特異的変異株では Q_B の機能が変化することで PSII 活性の低下が起こることが明らかになった。2 章で作製した S232AN234D 変異株のような Q_A 側の PG (PG664, PG694) の相互作用に変化があった場合、Q_B の酸化還元電位が変化することで Q_A から Q_B への電子伝達が阻害されることがわかった。部位特異的変異株の熱発光スペクトルでは B バンドのピーク温度のみが低温側に移動していた。先行研究において、すべての表在性タンパク質を遊離させた PSII 画分を用いた熱発光測定の結果から、表在性タンパク質が PSII 複合体から遊離することで B バンドが低温側に、Q バンドが高温側に移動することが明らかになっている (Vass et al. 1987)。また、*Synechocystis* の PsbO 合成欠損株の細胞の熱発光測定においても、B バンドは低温側に、Q バンドは高温側に移動している (Vass et al. 1992)。このことから、PsbO はマンガククラスター側だけでなく、プラストキノンの電子伝達にも重要であることが示唆されている。しかし、PsbV 合成欠損株と PsbU 合成欠損株の細胞では、B バンドと Q バンドの両方が高温側に移動していた (Shen et al. 1997, Shen et al. 1998)。これらの変異株では S₂ の状態のみが変化したこと示唆している。

PsbV と PsbU は PsbO と違い、主にマンガククラスターの安定化のみに寄与していると考えられる。2 章と 3 章で作製した部位特異的変異株では *in vivo* で表在性タンパク質は結合しており、精製時に表在性タンパク質が外れた可能性が高いことから、Q_B の酸化還元電位は PG と PSII の結合が不安定になったため変化したと考えられる。*pgsA* 株では PG 分子の欠損が Q_A ではなく、Q_B のみに影響するという結果が得られており、それは本研究の実験結果と一致していた。3 章で Q_B 近傍の PG の相互作用を変化させた場合は、電子受容体を添加したときに PSII の活性が阻害されることから、BQ や DCBQ などの結合サイトの構造が変化したことは予想できたが、Q_B の機能に直接的な影響があるかは、はっきり分からなかった。

X 線結晶構造解析の結果から、PG694 は PsbL の 11 番目のグルタミン酸のアミノ酸残基と相互作用している可能性がある (図 4)。 *Synechocystis* において、この PsbL のグルタミン酸周辺のアミノ酸残基を欠損させた変異株 [Δ (E13-N15) mutant] ではキノンなどの電子受容体を添加することで PSII 活性が大きく低下することが明らかになっている (Luo et al. 2014)。しかし、5'末端側を欠損させた Δ (N6-N8) と Δ (P11-V12) 変異株ではキノンの添加による PSII 活性の低下は起こらない。このことから PsbL の E13-N15 の領域が Q_B の機能維持に関わっている可能性が示唆されている。E13-N15 の領域は近傍の CP43 のアミノ酸と相互作用し、さらに、その CP43 のアミノ酸残基と D1 タンパク質の D-E ループのアミノ酸が相互作用しているため、Q_B に影響を及ぼしたと考えられている。また、 Δ (E13-N15) 変異株では二量体 PSII が減少して単量体 PSII が蓄積する。これらの結果は、*pgsA* 変異株と本研究の解析の結果と一致するところがあり、PsbL

の Glu11 が PG694 と相互作用している可能性は大いに考えられる。

本研究では PG664、PG694 と PG772 について相互作用するアミノ酸残基を改変した変異株を作製し、その PSII を解析することで各 PG 分子の機能を解析した。本研究では解析できなかった PG714 は D1/D2 ヘテロダイマーと CP43 の界面に存在していることから、PG714 は CP43 の結合の安定化に寄与していると考えられる。PG 欠乏状態で培養した *pgsA* 変異株では、PSII 複合体を精製したとき、Psb28 が蓄積することが明らかになっている (Sakurai et al. 2007)。Psb28 は CP43 を含まない単量体 PSII に多く蓄積していることが明らかになっていることから (Dobáková et al 2008)、*pgsA* 変異株でも CP43 を含まない単量体 PSII が蓄積している可能性が考えられる。PG714 に関する変異体を含めた、各 PG と相互作用するアミノ酸残基の改変株の PSII について BN-PAGE などを行うことで、CP43 を含まない単量体 PSII の存在を明らかにできる。2 章で作製した S232AN234D 変異株でも Psb28 が単量体 PSII に蓄積していたことから、CP43 を含まない単量体 PSII が存在している可能性も考えられる。また、PG702 は PG664 と PG694 の近傍に存在していることから PSII の二量体化に重要であると考えられる。これらの 3 分子の PG に加え、2 分子の SQDG も二量体を形成する際の界面に存在していることから、酸性脂質が単量体同士の結合に大きく関わっている可能性が高い。

2、3 章で行った解析のように、PG 分子の相互作用を実際に変化させ、その PSII 複合体を解析することで、結晶構造の結果からだけでは推測できない PG 分子の役割が解明できる可能性を見出した。しかし、PG 分子とタンパク質との相互作用の改変により、PSII 複合体の機能に様々な変化が起こることは確認でき

たが、PG 分子周辺のタンパク質の構造にどのような変化を及ぼしているかは分からない。そのため、X 線結晶構造解析などの手法を用いて、部位特異的変異株の PSII の構造変化を確かめる必要がある。4 章では *T. elongatus* を使用して PG 合成欠損株を作製した結果、好熱性シアノバクテリアにおいても PG の機能は *Synechocystis* と同じように保存されていた。*T. elongatus* で PG 分子と相互作用するアミノ酸残基を改変した変異株を作製することができれば、それらの変異株から PSII を精製し、X 線結晶構造解析を行うことで PSII の PG 分子周辺の構造変化を明らかにできると期待される。

6. 参考文献

Allen MM (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4: 1–4

Aoki M, Sato N, Meguro A, Tsuzuki, M (2004) Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 271: 685–693

Arnon DI, McSwain BD, Tsujimoto HY, Wada K (1974) Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae. I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll *a* and removal of phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 357: 231–245

Aronsson H, Schöttler MA, Kelly AA, Sundqvist C, Dörmann P, Karim S, Jarvis P (2008) Monogalactosyldiacylglycerol deficiency in *Arabidopsis* affects pigment composition in the prolamellar body and impairs thylakoid membrane energization and photoprotection in leaves. *Plant Physiol.* 148: 580–592

Awai K, Ohta H, Sato N (2014) Oxygenic photosynthesis without galactolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 13571–13575

Awai K, Watanabe H, Benning C, Nishida I (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for better photosynthetic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under phosphate limitation. *Plant Cell Physiol.* 48: 1517–1523

Babiychuk E, Müller F, Eubel H, Braun HP, Frentzen M, Kushnir S (2003) *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J.* 33: 899–909

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917

Block MA, Dorne AJ, Joyard J, Douce R (1983) Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. II. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 258: 13281–13286

Chiu YF, Lin WC, Wu CM, Chen YH, Hung CH, Ke SC, Chu HA (2009) Identification and characterization of a cytochrome *b₅₅₉* *Synechocystis* 6803 mutant spontaneously generated from DCMU-inhibited photoheterotrophical growth conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 1179–1188.

Chu HA, Chiu YF (2016) The roles of cytochrome *b₅₅₉* in assembly and photoprotection of photosystem II revealed by site-directed mutagenesis studies. *Front. Plant Sci.* 6:

- Cramer WA, Zhang H, Yan J, Kurisu G, Smith JL (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome *b₆f* complex. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 769–790
- Cser K, Vass I (2007) Radiative and non-radiative charge recombination pathways in Photosystem II studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 233–243
- Dobáková M, Sobotka R, Tichý M, Komenda J (2008) Psb28 protein is involved in the biogenesis of the photosystem II inner antenna CP47 (PsbB) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 149: 1076–1086
- Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovács L, Itoh K, Shen G, Ughy B, Bogos B, Sakurai I, Kis M, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z (2004) Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center. *Plant Physiol.* 134: 1471–1478
- Dörmann P, Hoffmann-Benning S, Balbo I, Benning C (1995) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell* 7: 1801–1810

Dorne AJ, Joyard J, Douce R (1990) Do thylakoids really contain phosphatidylcholine?

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 71–74

Dumas L, Chazaux M, Peltier G, Johnson X, Alric J (2016) Cytochrome *b₆f* function and localization, phosphorylation state of thylakoid membrane proteins and consequences on cyclic electron flow. *Photosynth. Res.* 129: 307–320

Enami I, Okumura A, Nagao R, Suzuki T, Iwai M, Shen JR (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species. *Photosynth. Res.* 98: 349–363

Gombos Z, Várkonyi Z, Hagio M, Iwaki M, Kovács L, Masamoto K, Itoh S, Wada H (2002) Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q_B in the photosystem II reaction center. *Biochemistry* 41: 3796–3802

Gombos Z, Wada H, Murata N (1991) Direct evaluation of effects of fatty-acid unsaturation on the thermal-properties of photosynthetic activities, as studied by mutation and transformation of *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 32: 205–211

Güler S, Seeliger A, Härtel H, Renger G, Benning C (1996) A null mutant of

- Synechococcus* sp. PCC7942 deficient in the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 271: 7501–7507
- Guo J, Zhang Z, Bi Y, Yang W, Xu Y, Zhang L (2005) Decreased stability of photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 579: 3619–3624
- Guskov A, Kern J, Gabdulkhakov A, Broser M, Zouni A, Saenger W (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 334–342
- Hagio M, Gombos Z, Várkonyi Z, Masamoto K, Sato N, Tsuzuki M, Wada H (2000) Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Physiol.* 124: 795–804
- Hagio M, Sakurai I, Sato S, Kato T, Tabata S, Wada H (2002) Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43: 1456–1464
- Hung CH, Huang JY, Chiu YF, Chu HA (2007) Site-directed mutagenesis on the heme axial-ligands of cytochrome *b₅₅₉* in photosystem II by using cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1767: 686–693

Inoue-Kashino N, Kashino Y, Satoh K, Terashima I, Pakrasi HB (2005) PsbU provides a stable architecture for the oxygen-evolving system in cyanobacterial photosystem II. *Biochemistry* 44: 12214–12228

Itoh S, Kozuki T, Nishida K, Fukushima Y, Yamakawa H, Domonkos I, Laczkó-Dobos H, Kis M, Ughy B, Gombos Z (2012) Two functional sites of phosphatidylglycerol for regulation of reaction of plastoquinone Q_B in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 287–297

Ivanov AG, Hendrickson L, Krol M, Selstam E, Oquist G, Hurry V, Huner NP (2006) Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations. *Plant Cell Physiol.* 47: 1146–1157

Iwai M, Katoh H, Katayama M, Ikeuchi M (2004a) Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Plant Cell Physiol.* 45: 171–175

Iwai M, Katoh H, Katayama M, Ikeuchi M (2004b) PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of photosystem II. *Plant Cell Physiol.* 45: 1809–1816

Jarvis P, Dörmann P, Peto CA, Lutes J, Benning C, Chory J (2000) Galactolipid

deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8175–8179

Johnson MP (2016) Photosynthesis. Essays Biochem. 60: 255–273

Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. Nature 411: 909–917

Kashino Y, Lauber WM, Carroll JA, Wang Q, Whitmarsh J, Satoh K, Pakrasi HB (2002) Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. Biochemistry 41: 8004–8012

Kashino Y, Yamashita M, Okamoto Y, Koike H, Satoh K (1996) Mechanisms of electron flow through the Q_B site in photosystem II. 3. Effects of the presence of membrane structure on the redox reactions at the Q_B site. Plant Cell Physiol. 37: 976–982

Kless H, Oren-Shamir M, Malkin S, McIntosh L, Edelman M (1994) The D-E region of the D1 protein is involved in multiple quinone and herbicide interactions in photosystem II. Biochemistry 33: 10501–10507

- Kobayashi K, Fujii S, Sato M, Toyooka K, Wada H (2014) Specific role of phosphatidylglycerol and functional overlaps with other thylakoid lipids in *Arabidopsis* chloroplast biogenesis. *Plant Cell Rep.* 34: 631–642
- Kobayashi K, Kondo M, Fukuda H, Nishimura M, Ohta H (2007) Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 17216–17221
- Kobayashi M, Maeda H, Watanabe T, Nakane H, Satoh K (1990) Chlorophyll *a* and β -carotene content in the D1/D2/cytochrome *b*-559 reaction center complex from spinach. *FEBS Lett.* 260: 138–140
- Kubota H, Sakurai I, Katayama K, Mizusawa N, Ohashi S, Kobayashi M, Zhang P, Aro EM, Wada H (2010) Purification and characterization of photosystem I complex from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by expressing histidine-tagged subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 98–105
- Luo H, Jackson SA, Fagerlund RD, Summerfield TC, Eaton-Rye JJ (2014) The importance of the hydrophilic region of PsbL for the plastoquinone electron acceptor complex of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1837: 1435–1446
- MacColl R (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124: 311–334.

- Minagawa J, Narusaka Y, Inoue Y, Satoh K (1999) Electron Transfer between Q_A and Q_B in photosystem II is thermodynamically perturbed in phototolerant mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 38: 770–775
- Minoda A, Sato N, Nozaki H, Okada K, Takahashi H, Sonoike K, Tsuzuki M (2002) Role of sulfoquinovosyl diacylglycerol for the maintenance of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 269: 2353–2358
- Minoda A, Sonoike K, Okada K, Sato N, Tsuzuki M (2003) Decrease in the efficiency of the electron donation to tyrosine Z of photosystem II in an SQDG-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *FEBS Lett.* 553: 109–112
- Mizusawa N, Kimura Y, Ishii A, Yamanari T, Nakazawa S, Teramoto H, Ono T (2004) Impact of replacement of D1 C-terminal alanine with glycine on structure and function of photosynthetic oxygen evolving complex. *J. Biol. Chem.* 279: 29622–29627
- Mizusawa N, Sakata S, Sakurai I, Sato N, Wada H (2009a) Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 191: 595–601

Mizusawa N, Sakurai I, Sato N, Wada H (2009b) Lack of digalactosyldiacylglycerol increases the sensitivity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light stress. *FEBS Lett.* 583: 718–722

Mizusawa N, Wada H (2012) The role of lipids in photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 194–208

Mohamed A, Jansson C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* 13: 693–700

Morita SY, Terada T (2015) Enzymatic measurement of phosphatidylglycerol and cardiolipin in cultured cells and mitochondria. *Sci. Rep.* 5: 11737

Mulo P, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E, Govindjee, Mäenpää P, Aro EM (1997) Mutagenesis of the D-E loop of photosystem II reaction centre protein D1. Function and assembly of photosystem II. *Plant Mol. Biol.* 33: 1059–1071

Nelson N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 521–565.

Nixon PJ, Komenda J, Barber J, Deak Z, Vass I, Diner BA (1995) Deletion of the

PEST-like region of photosystem two modifies the Q_B-binding pocket but not prevent rapid turnover of D1. *J. Biol. Chem.* 270: 14919–14927

Ohad I, Adir N, Koike H, Kyle DJ, Inoue Y (1990) Mechanism of photoinhibition *in vivo*. A reversible light-induced conformational change of reaction center II is related to an irreversible modification of the D1 protein. *J. Biol. Chem.* 265: 1972–1979

Pagliano C, Saracco G, Barber J (2013) Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth. Res.* 116: 167–188

Pakrasi HB, Diner BA, Williams J, Arntzen CJ (1989) Deletion mutagenesis of the cytochrome *b*₅₅₉ protein inactivates the reaction center of photosystem II. *Plant Cell* 1: 591–597

Reifarth F, Christen G, Seeliger AG, Dörmann P, Benning C, Renger G (1997) Modification of the water oxidizing complex in leaves of the *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochemistry* 36: 11769–11776

Renger G, Renger T (2008) Photosystem II: the machinery of photosynthetic water splitting. *Photosynth. Res.* 98: 53–80

Sakata S, Mizusawa N, Kubota-Kawai H, Sakurai I, Wada H (2013) Psb28 is involved in recovery of photosystem II at high temperature in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1827: 50–59

Sakurai I, Hagio M, Gombos Z, Tyystjärvi T, Paakkarinen V, Aro EM, Wada H (2003) Requirement of phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. *Plant Physiol.* 133: 1376–1384

Sakurai I, Mizusawa N, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H (2007) Effects of the lack of phosphatidylglycerol on the donor side of photosystem II. *Plant Physiol.* 144: 1336–1346

Sakurai I, Mizusawa N, Wada H, Sato N (2007) Digalactosyldiacylglycerol is required for stabilization of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Plant Physiol.* 145: 1361–1370

Sakurai I, Shen JR, Leng J, Ohashi S, Kobayashi M, Wada H (2006) Lipids in oxygen evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *J Biochem.* 140: 201–209

Sato N, Hagio M, Wada H, Tsuzuki M (2000) Requirement of phosphatidylglycerol for

photosynthetic function in thylakoid membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 10655–10660

Sato N, Aoki M, Maru Y, Sonoike K, Minoda A, Tsuzuki M (2003) Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in the structural integrity and heat-tolerance of photosystem II. *Planta* 217: 245–251

Sato N, Sonoike K, Tsuzuki M, Kawaguchi A (1995) Impaired photosystem II in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Eur. J. Biochem.* 234: 16–23

Satoh K, Oh-hashii M, Kashino Y, Koike H (1995) Mechanism of electron flow through the Q_B site in photosystem II. 1. Kinetics of the reduction of electron acceptors at the Q_B and plastoquinone sites in photosystem II particles from the cyanobacterium *Synechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol.* 36: 597–605

Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223–31

Shevela D, Eaton-Rye JJ, Shen JR, Govindjee (2012) Photosystem II and the unique role of bicarbonate: a historical perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 1134–1151

- Shen JR, Ikeuchi M, Inoue Y (1997) Analysis of the *psbU* gene encoding the 12-kDa extrinsic protein of photosystem II and studies on its role by deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 272: 17821–17826
- Shen JR, Qian M, Inoue Y, Burnap RL (1998) Functional characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 delta *psbU* and delta *psbV* mutants reveals important roles of cytochrome c-550 in cyanobacterial oxygen evolution. *Biochemistry* 37: 1551–1558
- Shimajima M (2011) Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Prog. Lipid Res.* 50: 234–239
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB (2000) Lipids. In BB Buchanan, W Gruissem, RL Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 456–527
- Steffen R, Kelly AA, Huyer J, Dörmann P, Renger G (2005) Investigations on the reaction pattern of photosystem II in leaves from *Arabidopsis thaliana* wild type plants and mutants with genetically modified lipid content. *Biochemistry* 44: 3134–3142

- Sugiura M, Boussac A, Noguchi T, Rappaport F (2008) Influence of histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P680, of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1777: 331–342
- Sugiura M, Inoue Y (1999) Highly purified thermo-stable oxygen-evolving photosystem II core complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus* having His-tagged CP43. *Plant Cell Physiol.* 40: 1219–1231
- Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N (2011) Crystal structure of oxygen evolving Photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473: 55–60
- Van Mooy BAS, Rocap G, Fredricks HF, Evans CT, Devol AH (2006) Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 8607–8612
- Vass I, Cool KM, Deák Z, Mayes SR, Barber J (1992) Thermoluminescence and flash-oxygen characterization of the IC2 deletion mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking the Photosystem II 33 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 195–201
- Vass I, Kirilovsky D, Etienne AL (1999) UV-B radiation-induced donor- and acceptor-side modifications of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 38: 12786–12794

- Vass I, Ono T, Inoue Y (1987) Stability and oscillation properties of thermoluminescent charge pairs in the O₂-evolving system depleted of Cl⁻ or the 33 kDa extrinsic protein. *Biochim. Biophys. Acta* 892: 224–235
- Vinyard DJ, Ananyev GM, Dismukes GC. (2013) Photosystem II: the reaction center of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 82: 577–606
- Wada H, Murata N (1989) *Synechocystis* PCC 6803 mutants defective in desaturation of fatty acids. *Plant Cell Physiol.* 30: 971–978
- Weier D, Müller C, Gaspers C, Frentzen M (2005) Characterisation of acyltransferases from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 1127–1134
- Xu C, Härtel H, Wada H, Hagio M, Yu B, Eakin C, Benning C (2002) The *pgp1* mutant locus of *Arabidopsis* encodes a phosphatidylglycerolphosphate synthase with impaired activity. *Plant Physiol.* 129: 594–604
- Yu B, Benning C (2003) Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36: 762–770

Yu B, Xu C, Benning C (2002) *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5732–5737

7. 謝辞

本研究の進行及び本論文の作成にあたり、終始ご指導と助言を戴きました、和田元教授に心より感謝申し上げます。

さらに、研究方針、実験操作等について助けてくださった小林康一助教、日頃、お世話になった和田研究室のメンバーに深く感謝します。

そして、本研究を進めるにあたって変異株の作製でご協力いただいた法政大学生命科学部水澤直樹教授、台湾アカデミアシニカの Chu 教授に感謝申し上げます。また、岡山大学大学院自然科学科の沈建仁教授、東京理科大学理学部榎達也教授、筑波大学大学院の小林正美准教授には、本研究の解析でお世話になりました。研究に関わってくださった多くの方々に感謝申し上げます。