

論文の内容の要旨

論文題目 Biochemical characterization of Photosystem II complexes from the genetically engineered thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*

(遺伝子改変した好熱性シアノバクテリア

Synechococcus elongatus の光化学系 2 複合体の生化学的解析)

氏名 加藤 浩

はじめに

シアノバクテリアや植物の光合成機能は生物にとって酸素供給源、栄養源として必須である。その中でも光化学系 2 複合体 (モデルを図 1 に示した) は光エネルギーを利用して水から電子を取り出し、酸素を供給する他に類のないユニークな酵素であり、その構造と機能を解明することは光合成研究において重要な課題である。光化学系 2 複合体は 20 種類以上のサブユニットタンパク質から構築されている。これまで、常温性シアノバクテリアおよび緑藻の光化学系 2 遺伝子破壊株を用いて解析されているにもかかわらず、光化学系 2 複合体が不安定で生化学的な解析が困難なため、その構造と機能はよくわかっていない。この問題を解決するため、熱安定性が高く、おもに生化学的解析によく使われてきた好熱性シアノバクテリアを用いた。好熱性シアノバクテリアには、機能解析に欠かせない遺伝子導入法が未発達であるが、生化学的に解析できる利点がある。そこで、本研究では至適生育温度が 55~57℃の好熱性シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* を用いて、遺伝子工学的アプローチで光化学系 2 複合体の構造と機能の解明を目指した。

結果と考察

1. 遺伝子のクローニングと遺伝子破壊株の作出

まず、既知のアミノ酸配列や塩基配列に基づき、*S. elongatus* より新たに光化学系 2 遺

伝子 (*psbI*, *psbK*, *psbU*, *psbV*, *psbX*) をクローニングし、その塩基配列を決定した。これらの遺伝子内に薬剤耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、*S. elongatus* にエレクトロポレーション法で導入した。従来のスクリーニング法を改善するため、寒天中に埋め込んでスクリーニングするトップアガー法を開発した。この方法は形質転換体を短期間で確実に単離できるだけでなく、独立したクローンが得られる利点もあり、将来の部位特異的変異の導入も可能になった。この方法で得られた形質転換株の遺伝子破壊をサザン分析で確認し、これらの遺伝子破壊株を解析した。

2. *psbV* の解析

psbV 遺伝子はチトクロム *c*-550 という光化学系 2 複合体の水分解系に結合する 17kDa の表在性タンパク質 (図 1) をコードしており、シアノバクテリア、下等真核藻類に存在する。クローニングした遺伝子から推定されたタンパク質は他のシアノバクテリアよりも灰色藻や紅藻のチトクロム *c*-550 と相同性が高かった。これは、好熱性シアノバクテリアが葉緑体の祖先と近縁である可能性を示しているのかもしれない。

psbV 遺伝子の下流には、チトクロム *c*-550 と相同性を示す新規 *c* 型チトクロム様タンパク質をコードする *psbV2* 遺伝子とチトクロム *c*-553 をコードする *petJ* 遺伝子が存在していた (図 2)。この並びは *psbV2* が *psbV* と *petJ* の重複と組み換えによって生じた可能性を示唆する。また、16S rRNA の系統樹で、最初に分岐したとされる *Gloeobacter violaceus* にも *psbV2* と相同性のある遺伝子が存在していたことがごく最近わかった。このことは、シアノバクテリアの祖先型が *psbV2* を持っていて、その後の進化の過程で多くのシアノバクテリアで失われた可能性を示唆している。

psbV 破壊株は光合成増殖で Cl⁻ 要求性を示した。これは、マンガククラスターでの反応の安定化に Cl⁻ が必要であるという知見を支持している。また、低濃度の CO₂ で培養したところ増殖阻害が見られた。

破壊株から単離したチラコイド膜の系 2 活性である酸素発生活性を測定したところ、野生株の約 30% まで活性が低下した。これは、チトクロム *c*-550 を欠損したことによって酸素発生の触媒部位であるマンガククラスターが不安定になったためと推測される。

次に、本研究で発見された *psbV2* の機能を調べるために、常温性のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の *psbV* 破壊株に *psbV2* 遺伝子を導入した。この株は光独立栄養条件では *psbV* 破壊株よりも増殖が速まったが、この破壊株の表現型 (光独立栄養増殖に Ca²⁺、Cl⁻ を要求) を抑圧できなかった。一方、*S. elongatus* の *psbV* を導入した場合では増殖を促進するとともにいずれのイオン要求性を抑圧した。この結果はシアノバクテリア間でチトクロム *c*-550 の機能に差がないことを示しており、また、*psbV2* がコードすると予想されるチトクロム *c*-550 様新規タンパク質は光化学系 2 複合体に関与して

いる可能性が示唆された。今後 *psbV2* がどのような性質を持った *c* 型チトクロムなのかを確かめる必要がある。

3. *psbX* の解析

psbX 遺伝子は植物からシアノバクテリアに広く存在し、系 2 複合体に結合している 4.1kDa の膜貫通タンパク質 (図 1) をコードしており、高等植物からシアノバクテリアまで幅広く存在するが、これまで機能に関する知見はない。クローニングした遺伝子から推定される PsbX タンパク質には他のシアノバクテリアに存在しないプレ配列があった。これは好熱性シアノバクテリアの PsbX タンパク質にある電荷を持った N 末側をチラコイド膜内腔に輸送するためではないかと考えられる。

psbX 遺伝子破壊株からチラコイド膜を単離して、系 2 活性への人工キノンの濃度依存性を測定したところ、低濃度側では野生株と違いはなかったが、高濃度側では活性が低かった (図 3)。また、より詳細な解析をするために系 2 複合体を単離して同様の測定したところ、チラコイド膜よりも活性が高く、チラコイド膜に近い依存性を示した (図 3)。これは、系 2 複合体が濃縮されたこととチラコイド膜に近い状態で複合体が単離できていることを示している。この濃度依存性は光化学系 2 複合体におけるキノンの電子受容経路が 2 種類あるという佐藤らの仮説にもとづいてキノン濃度と活性の両逆数プロットをとり Q_B 部位への人工キノンの最大活性を求めたところ、野生株では $1230 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$ 、破壊株では $500 \mu\text{mol O}_2/\text{mg Chl/h}$ が得られた。この結果から系 2 の電子受容側の Q_B 部位の電子の授受に *psbX* 遺伝子産物が重要な働きをしていることを示唆している。なお、系 2 複合体のタンパク質組成に PsbX タンパク質以外の欠損は見られなかった (図 4)。

4. *psbI* の解析

psbI は植物からシアノバクテリアに広く存在し、光化学系 2 複合体の反応中心近傍に結合している 4.8kDa の膜貫通型タンパク質 (図 1) をコードしている。これまでの遺伝子破壊株の表現型から、光依存性の酸素発生活性の低下が起こることが知られている。遺伝子をクローニングした遺伝子から推定されるタンパク質は他の PsbI タンパク質と高い相同性を示した。遺伝子破壊株のチラコイド膜、系 2 複合体での系 2 活性を調べたところ、*psbI* 破壊株の系 2 は野生株の 60-80%の活性を示した。これは、PsbI タンパク質が活性に大きな影響を与えない可能性を示唆している。一般に系 2 複合体は二量体を形成していることが知られているが、*psbI* 破壊株の系 2 複合体は単量体がほとんどであった (図 5)。この系 2 複合体のタンパク質組成に PsbI タンパク質以外の欠損は見られなかった (図 6)。一方、*psbX* 破壊株から単離した系 2 複合体は野生株と比べて二量体形成に大きな違いは認められなかった。よって PsbI タンパク質は光化学系 2 複合体の二量体化に必要であると考えられた。光化学系 2 複合体の二量体化の生理的意義はわからないが、おそらく集光

効率を高めるためと考えられる。今後、この可能性を検討するため *psbI* 破壊株の酸素発生活性の光依存性測定、構造解析を行なう必要がある。

まとめ

本研究では、好熱性シアノバクテリアから光化学系 2 遺伝子をクローニングし、遺伝子破壊株を作出し、特に *psbX*、*psbI* 破壊株からは生化学的に解析できる光化学系 2 複合体を単離できることを初めて示した。*psbV* 破壊株では生化学的な解析はできなかったが、チトクロム *c*-550 様新規タンパク質が光化学系 2 複合体に関与する可能性を示した。機能解析では、機能未知の *PsbX* タンパク質が系 2 の Q_B 部位に関与する可能性を、反応中心に結合している *PsbI* タンパク質は複合体の二量体の構造安定化に関与することを示した。このような解析は従来の常温性シアノバクテリアを使った実験では困難である。本研究は好熱性シアノバクテリアでの遺伝子操作法を確立し、変異株の系 2 複合体を単離して解析できることを示しており、今後の構造解析に重要な知見を与えると期待される。

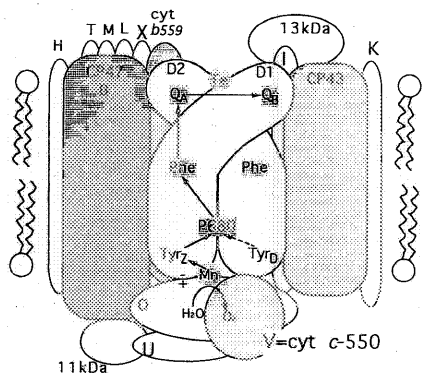


図1 シアノバクテリアの光化学系2モデル

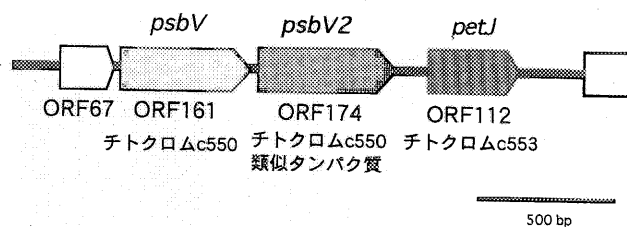


図2 *S. elongatus* の *psbV* 遺伝子とその周辺に存在するORF

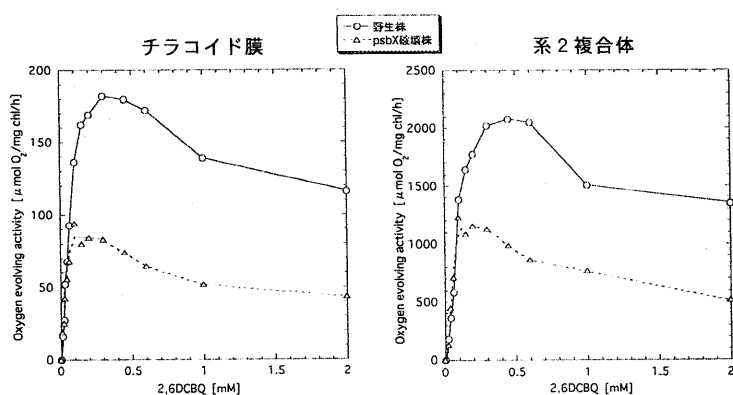


図3 野生株と *psbX* 破壊株のチラコイド膜と系2複合体の酸素発生活性のキノン濃度依存性

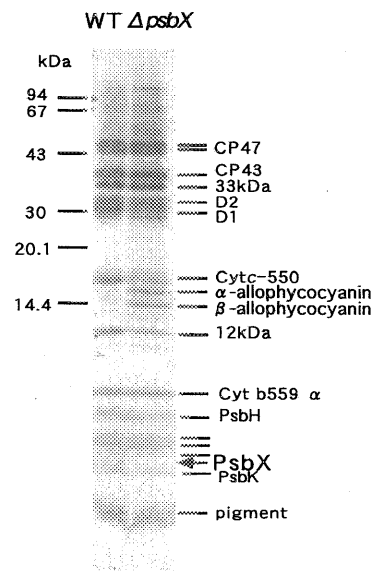


図4 陰イオンカラムで精製したPSIIのSDS-PAGE

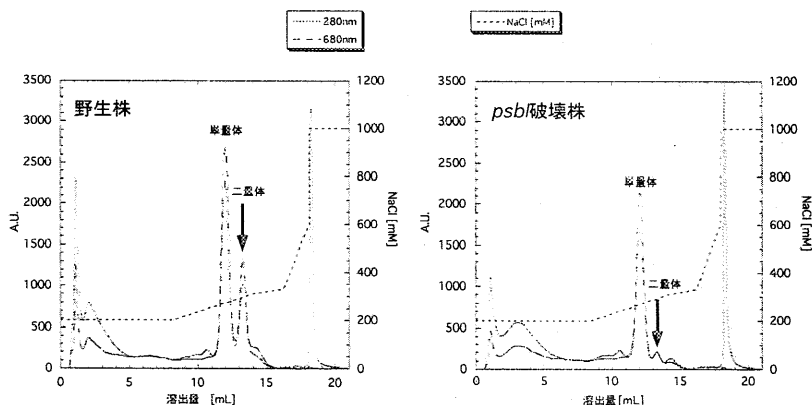


図5 陰イオンカラムクロマトグラフィーの溶出パターン

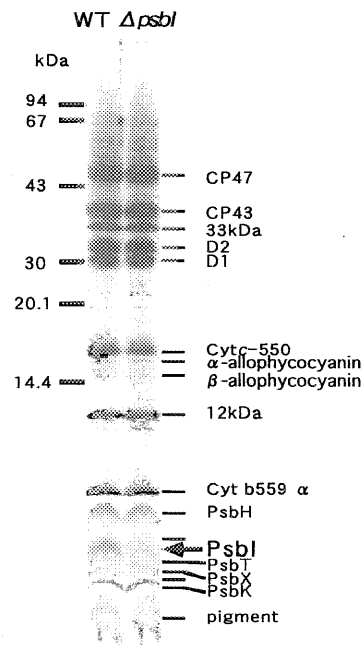


図6 陰イオンカラムで精製したPSIIのSDS-PAGE