

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 加藤 浩

本論文「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)」は3章からなっている。第1章では、水分解系の表在性タンパク質チトクロムc550の遺伝子 $psbV$ をクローニングし、その近傍に見いだした新規チトクロムcの遺伝子 $psbV2$ と合わせて、それらの機能を解析した。第2章では、これまで報告されていなかった $psbX$ 破壊株を作出し、酸素発生活性を保持した光化学系2複合体を単離解析し、電子受容側の $Q_B$ 部位に顕著な影響が出ていることを示した。第3章では、光化学系2反応中心複合体に結合しているタンパク質の遺伝子 $psbI$ をクローニング・破壊株を作出し、酸素発生活性を保持した光化学系2複合体を単離することによって、 $psbI$ がコードするタンパク質が光化学系2複合体の二量体化に関わっていることを示した。これらの研究に先立って、これまでできなかった好熱性シアノバクテリア*Synechococcus elongatus*の形質転換法を確立した。このように、新しい光化学系遺伝子の発見、光化学系タンパク質の新しい機能の発見を通して、好熱性シアノバクテリアの光合成系の研究を分子生物学への拡張を実証したことは、これまでの光合成の研究に大きな貢献をするとともに、不安定なタンパク質複合体の研究の先駆けとして、また今後の遺伝子機能の解析への大きな波及効果が期待される。

第1章では、破壊株の作製と他生物への導入を目的として、水分解系の表在性タンパク質チトクロムc550の遺伝子 $psbV$ をクローニングし、その近傍に新規チトクロムcの遺伝子 $psbV2$ を見いだした。この $psbV$ 破壊株を作出し、その増殖特性を調べて、すでに報告されている常温性シアノバクテリアの $psbV$ 破壊株と基本的に同じであることを確かめた。なお、好熱菌ではあっても、 $psbV$ 破壊株から酸素発生活性を保持した光化学系2複合体を単離することはできなかった。一方、 $psbV2$ の機能を確認するために、 $psbV$ を破壊した常温性シアノバクテリアに導入発現した。光合成による細胞増殖は $psbV$ の破壊によって大きく抑制されたが、好熱性*S. elongatus*の $psbV$ と同様に $psbV2$ の導入によっても回復した。 $psbV$ は、光合成増殖における $Ca^{2+}$ や $Cl^-$ イオンの要求性を緩和することが知られているが、 $psbV$ 破壊株に*S. elongatus*の $psbV$ を導入した場合は緩和されたが、 $psbV2$ では回復しなかった。このことは、 $psbV2$ が光化学系2の酸素発生系において $psbV$ と似た働きをしているが、未知の機能を持っていることを示唆している。

第2章では、近縁種で報告されていた塩基配列に基づいて、*S. elongatus*から $psbX$

をクローニングし、破壊株を初めて作出し、光合成増殖に必須ではないことを示した。しかし、その増殖は野生株よりもやや遅く、とくに低CO<sub>2</sub>条件で遅くなっていた。*psbX*遺伝子の破壊の影響を調べたところ、光化学系2の蓄積や細胞の酸素発生活性にはほとんど影響は見られなかった。そこで、活性のあるチラコイド膜や系2複合体を単離して、電子受容側への遺伝子破壊の影響を調べた。低濃度の2,6-dichlorobenzoquinoneや2,6-dimethylbenzoquinoneにおける酸素発生活性は野生株とほぼ同じだが、高濃度では著しく活性が低かった。一般に、プラストキノン類似のキノン化合物は光化学系2のQ<sub>B</sub>部位とプラストキノンプールの両方から電子を受けとるが、高濃度側ではQ<sub>B</sub>部位からの授受が主要となることが知られている。したがって、光化学系2のQ<sub>B</sub>部位での電子伝達が、野生株と比べて*psbX*破壊株では低下していることが示唆される。なお、精製した系2複合体のタンパク質組成は4.1kDaのバンドだけが消失しており、他のタンパク質組成には違いが見られず、光化学系2複合体の形成に*psbX*は必須ではないと推論された。

第3章では、すでに報告されていた近縁種のアミノ酸配列に基づいて、*S. elongatus*の*psbI*遺伝子をクローニングし、その破壊株を作製した。これまでの研究で、*psbI*がコードするPSII-Iタンパク質は光化学系2複合体の反応中心に結合しているが、これまでに作製された*psbI*破壊株の解析は細胞レベルにとどまり、その機能は不明であった。第3章では、好熱菌の破壊株から活性を保持した系2複合体を単離することができ、その酸素発生活性が野生株に近いこと、タンパク質組成においても5kDaバンド(PSII-Iタンパク質)の消失以外には影響が見られないことが示された。一方、イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにおける光化学系2複合体の溶出の特徴は、野生株と異なっていた。つまり、野生株では約550kDaの二量体と約300kDaの単量体として回収されたのに対し、*psbI*破壊株では後者の単量体だけが回収された。植物やシアノバクテリアの光化学系2複合体は本来二量体として存在していることが知られているので、*psbI*がコードするPSII-Iタンパク質が複合体の二量体化もしくは二量体の安定化に関わっていることが示唆された。これまで光化学系2複合体の二量体構造の生理的意義として、光集光の効率化やストレスに対する耐性などが提案されてきたが、はっきりしていなかった。今後、*psbI*破壊株の性質を詳しく解析することによって、二量体構造の生理的意義が解明されることが期待される。

これらの研究成果をまとめると、好熱性シアノバクテリア*Synechococcus elongatus*はこれまでに研究されてきた光合成生物と系統的に離れているが、その安定な光化学系2複合体は分子生物学的手法と生化学的手法を組み合わせて研究できることを実証しており、今後の幅広いタンパク質の構造機能研究への波及効果が期待される。

なお、本論文の第1章は、沈建仁、伊藤須和子、池内昌彦との共同研究、第2章と第3章は池内昌彦との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究の立案、遂行を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(学術)の学位を授与できると認める。