

## 論文の内容の要旨

論文題目 Molecular studies of photosystem II complexes from the thermophilic cyanobacterium

*Thermosynechococcus elongatus* BP-1

(好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の

光化学系 II 複合体の分子生物学的研究)

氏名 岩井 (小黒) 雅子

### <序論>

高等植物やシアノバクテリアが行なう酸素発生型光合成は重要なエネルギー変換機構である。この機構はチラコイド膜に存在する光化学系 I 複合体および系 II 複合体とよばれる 2 つの大きな蛋白質複合体が光駆動することにより行われる。このうち、系 II 複合体では、光エネルギーを利用して水を分解し電子を取り出し、酸素を生じる。系 II 複合体は 20 以上のサブユニットからなり、その 3 次元構造は好熱性シアノバクテリアを材料として近年に報告された。しかし、その解像度 (3.7~3.8Å) は微細構造を議論するには不十分で、小サブユニットや重要な残基の位置を特定できていない。このような系 II 複合体の複雑な構造と水分解反応の機構を解明するには、単離した系 II 複合体を用いた解析と、変異株を用いた解析の両方が必要である。本研究では系 II 複合体のメカニズムを解明することを目指し、生化学的機能解析と分子生物学的研究の両方を行える好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を実験材料としてもちい、遺伝子操作の改善と遺伝子破壊株による系 II 複合体の解析を行った。

### 1 章 : *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 の遺伝子操作の改善

当研究室の先行研究によって *T. elongatus* の遺伝子操作は最初に報告された 1996 年に比べ容易になったが、まだ遺伝子操作技術には不十分な点も多かった。そこで私は形質転換法を再検討し、

(1) 自然形質転換法により遺伝子を破壊できることを発見した。この方法はこれまでのエレクト

ロポレーション法に比べ、形質転換効率は高くないが非常に簡単である。(2)ゲノム情報をもとに見いだしたI型制限酵素遺伝子 (*t112230*) を破壊することによって形質転換効率を上昇させることに成功した。この破壊株を親株とすることで、これまで野生株では形質転換体を得られなかった遺伝子 (*ndhE*, *ndhL*, *cdsA*) についても形質転換体を得られるようになった。(3) *T. elongatus*における形質転換の際にこれまでにわかっている double recombination だけでなく、single recombination も起こっていることを見いだした。(4) 機能的に重要なアミノ酸残基の改変や外来遺伝子の大量発現系の構築を目指して、従属栄養増殖が可能な *T. elongatus* の作製を試みた。*T. elongatus* のゲノムには糖輸送体の遺伝子が存在しないので従属栄養増殖可能な他のシアノバクテリアのグルコース輸送体の遺伝子に内在性の数種類のプロモーターをつないで導入し、グルコース輸送体の遺伝子がゲノムに組み込まれていることを確認した。しかし、その発現は確認できなかった。今後さらに導入すべきプロモーターや糖輸送体の検討が必要である。こうした遺伝子操作技術の改善により、実験生物としての *T. elongatus* の有用性はこれまで以上に大きくなった。

## 2章：系II複合体小サブユニットの遺伝子破壊株の解析

系II複合体小サブユニット蛋白質 PSII-T, PSII-Hの機能を解明するために、1章で述べた遺伝子操作技術を用いて、PSII-T, PSII-H蛋白質をコードする *psbT*, *psbH* 遺伝子の破壊株を作製し、その生化学的解析を行った。

### (1) *psbT* 遺伝子破壊株の解析

PSII-T蛋白質は植物やシアノバクテリアの光化学系II複合体に結合している膜貫通タンパク質であり、近年、緑藻において強光での光阻害からの系II複合体の回復に必要であると報告されている。しかし、シアノバクテリアではそのような報告はなく、系II内での存在場所は特定されていない。そこで私はPSII-T蛋白質をコードする *psbT* 遺伝子の破壊株を好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* を用いて作製した。*psbT* 遺伝子破壊株は光独立栄養条件下での生育速度、クロロフィルの低温蛍光スペクトルから推定した系II複合体の蓄積量、細胞、チラコイド膜、陰イオン交換カラム分画前の系II複合体の酸素発生活性、いずれも、野生株との間に差は見られなかった。SDS-PAGE解析ではPSII-T蛋白質に対応する4.7kDaのバンドが破壊株でのみなくなっていた。陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いた解析では系II複合体の二量体が大きく減少し、単量体が増加した。これらのことから、PSII-T蛋白質は系II複合体の活性には関与せず、系II複合体の二量体化に関わると考えられる。系II複合体の二量体は植物とシアノバクテリアで共通の特徴であるが、その生理的役割は議論が多い。系II複合体が、野生株では二量体、*psbT*破壊株では単量体であるにもかかわらず、細胞、チラコイド膜、系II複合体の酸素発生活性には違いがほとんどないという私の結果は二量体化が活性に直接関わっていないことを示している。今後、PSII-Tや二量体化の役割を明らかにするためには詳しい生理学的な解析が必要であると考えられる。

### (2) *psbH* 遺伝子破壊株の解析

PSII-H 蛋白質は植物やシアノバクテリアの光化学系 II 複合体に結合している 6.5 kDa の膜貫通蛋白質で、植物では N 末端がリン酸化される。これまでに他の生物での破壊株の解析から PSII-H は系 II 複合体での  $Q_AQ_B$  間の電子伝達、系 II 複合体の分子集合や安定性に関わるといわれている。私は好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* を用い、*psbH* 遺伝子破壊株を作製した。*psbH* 遺伝子破壊株は光独立栄養条件下で野生株よりも増殖が顕著に遅くなった。細胞、チラコイドの状態での 2,6-DCBQ を受容体とする系 II 複合体の酸素発生活性は、野生株の半分であった。そこでチラコイド膜からの系 II 複合体の回収方法を改善し、陰イオン交換カラムを用いて系 II 複合体を分画したところ、酸素発生活性を保持した系 II 複合体の単離に成功した。野生株では活性のある系 II 複合体が主に二量体として回収された。これに対し、破壊株では二量体がほとんど消失し、野生株では小さかった 2 つのピークが大幅に増加していた。1 つは表在性蛋白質 (33kDa, *cytC550*, 12kDa) を失い、酸素発生活性をもたない単量体の系 II 複合体であり、他方は表在性蛋白質も活性も保持した単量体の系 II 複合体であった。また破壊株の系 II 複合体では単量体、二量体にかかわらず、PSII-X 蛋白質が消失していた。PSII-X 蛋白質は系 II 複合体の二量体化にはあまり関係ないが、酸素発生活性に影響を与えることが既に報告されている。以上の結果から、PSII-H 蛋白質は PSII-X 蛋白質の系 II 複合体への結合、表在性蛋白質の安定化に必要であること、これまで他の生物で報告されていた酸素発生活性への影響は、酸素発生活性をもたない単量体の系 II 複合体の増大と PSII-X 蛋白質の消失を含んでいることが示唆された。

### 3 章：D1 蛋白質の遺伝子破壊株の解析

D1 蛋白質は系 II 複合体の反応中心を構成しており、P680 や Mn クラスターを結合してもっとも重要な働きをしている。また、光阻害を受けると分解され、新しく合成された D1 蛋白質に置き換わることも知られている。これらの構造、機能に関与する候補アミノ酸残基は中温性の *Synechocystis* sp. PGC 6803 の部位特異的変異株によって細胞レベルで解析されてきた。私は、これらのことを蛋白質レベルで解析することを目指し、*T. elongatus* の D1 蛋白質への部位特異的変異株の作製のために、*T. elongatus* に 3 つある *psbA* 遺伝子のどれが変異株作製に適しているかを同定し、部位特異的変異の導入系を確立した。

D1 蛋白質をコードする *psbA1-3* 遺伝子のうち、実験当初は *psbA1* 遺伝子に変異を導入し、残る 2 つの遺伝子は薬剤耐性マーカーで破壊した。*T. elongatus* は絶対光独立栄養増殖なので、光合成による増殖が期待できる変異として、E333Q、D342E の作製を試みた。しかし、*psbA1* だけを残した株は作製できたが、これに上記の変異を導入した株は完全には分離できなかった (シアノバクテリアは複数コピーの DNA を持つため、必須遺伝子に変異を導入した場合、野生株の DNA が一部残ることが知られている)。そこで、*psbA1-3* 遺伝子のうちどれが変異株作製に適しているかを調べるために、*psbA1-3* 遺伝子のうち 1 つだけを残した破壊株の作製を試みた。*psbA1* だけを残した株では親株に比べ、光独立栄養条件下での生育が極端に悪く、特に強光下では生育できないこと、細胞での酸素発生活性は親株の半分になっていることがわかった。*psbA2* だけを残した株は完全には分離しなかったことから、*psbA2* は発現していないか、機能が失われていると考えられる。*psbA3* だけを残した株は、強光・弱光下での生育、細胞、チラコイド膜、系

II 複合体の酸素発生活性の比較、系 II 複合体の二量体の安定性において親株とほとんど差が認められなかった。以上の結果から、部位特異的変異株の導入には *psbA3* 遺伝子が適していることが明らかとなった。今後は *psbA3* 遺伝子を用いた部位特異的変異株の解析をする必要がある。

#### <まとめ>

他の生物よりも生化学的解析に適している光化学系 II 複合体を持つ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 を用い、系 II 複合体について解析した。1章では、*T. elongatus* の遺伝子操作の改善について述べた。これにより *T. elongatus* は実験材料として有用性を増した。従属栄養増殖可能な株は作製できなかったが、問題点を明らかにした。1章をふまえて、2章では系 II 複合体の小サブユニットの遺伝子破壊株、3章では系 II 複合体の反応中心 D1 蛋白質の遺伝子破壊株をそれぞれ作製して解析した。2章の PSII-T 蛋白質の解析では、PSII-T 蛋白質は、系 II 複合体の活性自体にはあまり影響しないことを示した。また長年議論されている系 II 複合体の二量体化に PSII-T 蛋白質が関わっていることを初めて示した。PSII-H 蛋白質の解析では、PSII-H 蛋白質が PSII-X 蛋白質の系 II 複合体への結合、表在性蛋白質の安定化に必要であることを示した。3章では当初 *psbA1* がコードする D1 蛋白質の部位特異変異株の解析を目指したが、目的の形質転換体を得られなかったため、変異導入法を再検討した。その結果 *psbA3* 遺伝子が変異導入に適していることを明らかにした。今後、この株を用いた部位特異的変異株の導入により、D1 蛋白質の機能の解明が期待される。