

論文審査の結果の要旨

岩井(小黑)雅子

本論文「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)は、4章から成っている。第1章では、形質転換法の改良、第2章では、光化学系 II 低分子タンパク質 PSII-T と PSII-H 破壊株の解析、第3章では、光化学系 II の反応中心を構成する D1 タンパク質をコードする *psbA* 遺伝子の機能解析をした。

第1章では、形質転換法の改良を目指した。まず、トプアガー法を導入することにより、コロニー形成率を大きく改善し、形質転換体のクローンを独立に単離できるようにした。また、エレクトロポレーション法だけでなく、自然形質転換でもある頻度で形質転換できることを示した。導入する DNA 断片毎に形質転換効率が変動することから、内在の制限酵素の妨害を想定した。ゲノム情報から I 型制限の遺伝子オペロンを見だし、その制限酵素をコードする *tll2230* を破壊した。この *tll2230* 破壊株は従来の野生株と比べて、形質転換効率が有意に上昇しており、これまでに形質転換できなかったいくつかのコンストラクトでも形質転換体が得られることを実証した。一般に、原核生物の形質転換では、1回相同組換と2回相同組換が知られているが、本種ではこれまで2回相同組換しか知られていなかった。本研究では同一のコンストラクトでカセットの挿入位置を変えたものを用意し、エレクトロポレーションでは1回相同組換の方がさらに高頻度で起こること、それにもかかわらず自然形質転換では全く形質転換体が得られないことを明らかにした。以上の結果は、自然形質転換では DNA の分解が取込に先立って起こるため、1回相同組換で環状プラスミドを含んだコンストラクトの組込がおこらないと解釈できる。

第2章では、光化学系 II 低分子タンパク質をコードする *psbT* と *psbH* の破壊株を作製した。*psbT* がコードする PSII-T タンパク質は約 4.7kDa の膜貫通型タンパク質で、その破壊株の光合成活性、光独立栄養増殖の速度などは野生株とほとんど同等

であった。しかし、系Ⅱ複合体を単離したところ、そのほとんどが単量体であることが判明した。系Ⅱ複合体の二量体は広く保存された構造であるが、その生理的意義は不明であり、特異的に二量体が失われている *psbT* 破壊株は二量体の役割の解明に有効だと思われる。一方、約 6kDa リンタンパク質 PSII-H をコードする *psbH* の破壊株の場合は、多くの多重欠失表現型を示した。とくに、光独立栄養での増殖や強光下での *psbH* 破壊株の増殖の速度は光障害を受けやすいことを示した。なお、*psbH* 破壊株から光化学系Ⅱ複合体を単離したところ、PSII-X タンパク質が結合していないことが明らかになった。その遺伝子 *psbX* 破壊株の解析をした先行研究では、QA→QB 部位の反応が影響を受けるという報告がある。本研究では、複合体を単離したので、このようなアセンブリの中間体を単離することができたと考える。

第3章では、光化学系Ⅱの反応中心 D1 タンパク質の部位特異変異導入を念頭において、3個の *psbA* 遺伝子の機能解析として、3個のうち2個を破壊して1個の *psbA* 遺伝子だけを残した変異株を作製した。シアノバクテリアは複数コピーのゲノムをもつので、野生型ゲノムを完全に除去する必要がある。*psbA1* もしくは *psbA3* を残した株では完全に野生型ゲノムを除去することができたが、*psbA2* だけを残した株では除去できなかった。これは *psbA2* の発現だけでは光合成活性の維持には不十分であることを示している。*psbA1* だけを残した株は光合成に依存した増殖を示したが、その速度は野生株や *psbA3* だけを残した株と比べて遅く、しかも強光条件下では全く増殖できなかった。*psbA1* だけの株では、細胞の酸素発生活性も野生株と比べて低かったが、単離したチラコイド膜ではほとんど差が認められなかった。これは光化学系Ⅱにおいて *psbA1* は十分な役割を果たしているが、遺伝子破壊の間接的な影響で増殖が遅くなったと考えられる。一方、*psbA3* だけを残した株は野生株同様の増殖、光合成活性を示した。これらの結果は、反応中心D1タンパク質の部位特異変異の導入の対象としては *psbA3* がもっとも適していることが明らかになった。

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の光化学系Ⅱ複合体の構造、機能解析に遺伝子操作を取り込んで、総合的に解析できることを実証し、今後の詳しい解析の出発点となることを示した。これまで研究されてきた植物や常温性シアノバクテリアの光化学系Ⅱ複合体は不安定で、生化学解析や構造解析に適していなかったが、好熱性シアノバクテリアの系Ⅱ複合体にはそのような欠点がない。一方、後者では遺伝子操作法の整備が不十分であった。本研究の意義はこのような問題点を解決すべく、好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* の形質転換法を大きく改善し(第1章)、これまでの細胞レベルの変異株の解析では見えなかった PSII-T タンパク質

の系 II 複合体の二量体化、PSII-Hタンパク質によるPSII-Xタンパク質の安定化などを明らかにし(第2章)、反応中心 D1 タンパク質をコードする3個の *psbA* 遺伝子の機能解析(第3章)を通して、将来の部位特異変異導入と結晶構造解析への道筋をつけたことにある。

なお、本論文の第1章は、加藤浩、耿暁星、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、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。