

論文の内容の要旨

Studies on the function of phosphatidylglycerol in photosynthesis

(光合成におけるホスファチジルグリセロールの機能に関する研究)

桜井 勇

1. 序論

光合成の初期反応は、ラン藻や植物の葉緑体に存在するチラコイド膜で起こり、太陽より降り注ぐ光エネルギーは、生物が利用できる化学エネルギーへと変換される。チラコイド膜は、主に光合成装置として機能する超分子複合体と、脂質二重層を形成する脂質分子から構成される。光合成装置を流れる電子の伝達経路や、光合成装置の構造に関しては、これまでの研究から、その詳細が明らかにされてきた。それに対し、光エネルギー変換反応を調節する重要なファクターと考えられる脂質分子については、その機能に関する理解があまり深まっていない。主な原因は、脂質分子がタンパク質のような触媒活性を示さないにもかかわらず、その機能が多岐にわたるためであると考えられる。多くの生体膜と異なり、チラコイド膜を構成する主要な脂質成分は糖脂質である。これは、光合成生物が、自然界で不足しがちなリンの必要量を抑制するために、チラコイド膜脂質のほとんどを糖脂質に置き換えるという、進化的適応を選択したことによると考えられている。しかしながら、チラコイド膜には唯一のリン脂質としてホスファチジルグリセロール (PG) が存在し、光合成の初期反応において、PG が糖脂質では代替し得ない重要な機能を担っていることを推測させる。そこで、本研究では、チラコイド膜脂質、特に、PG が光合成の初期反応に果たす機能を解析した。

解析には、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 において作製された、PG の合成能を欠損する *pgsA* 破壊株（以下、変異株と略す）をもちいた。この変異株では、PG 合成の中間反応を触媒するホスファチジルグリセロールリン酸合成酵素をコードする *pgsA* 遺伝子が破壊されている。変異株は、PG を含む培地では野生株と同様に生育するが、PG を含まない培地に植え継ぐと、細胞分裂することでチラコイド膜における PG 含量が低下し、いずれ増殖を停止する。しかし、培地に PG を再添加すると、変異株は増殖を再開する。このように、生細胞において PG 含量を容易にコントロール出来ることから、この変異株は、PG の機能を解析するために強力なツールとなっている。先行研究より、PG 含量の低下に伴い光合成活性が低下し、その原因は、光化学系 (PSII) における機能低下にあることが示されている。このような PSII における電子伝達の異常は、PSII 複合体の構造が PG 含量の低下により変化したこと、つまり、PG が PSII 複合体の構築や構造の維持に重要であることを示唆している。これまでも、*in vitro* の実験系を用いて、PSII 複合体の構築や構造の維持における PG の機能に関する解析が行われてきた。しかしながら、PSII 複合体の構築とは、数多くのステップが連続的に起こる複雑な生命現象であり、これまでの研究からは、それほど多くの知見が得られていない。それに対し、変異株は、生細胞において PG 含量をコントロール出来るため、PSII 複合体の構築や構造維持に果たす PG の機能について、これまでにない視点から解析することが可能になると思われる。そこで、本研究では、生細胞において PG 含量をコントロール出来るという変異株の利点を生かし、PSII 複合体の構築や構造維持という視点から、PG が光合成の初期反応に果たす機能を解析した。

2. PS 複合体の二量体化を介した光合成装置の修復における PG の機能

PG を含む培地で生育させた変異株を、PG を含まない培地に移すと、光感受性が増加し、わずかな光強度の上昇により、著しい生育阻害が引き起こされることが見出された。この生育阻害が、光合成の光阻害に起因するものと推測し、PG と光阻害の関係について解析した。-PG / 弱光条件下において培養し、チラコイド膜における PG 含量が低下した変異株を、強光条件下に移すと、光合成活性は速やかに低下した。これに対し、野生株ではほとんど活性の低下はおこらなかった。このことから、強光条件への適応に、PG が重要であることが示唆された。つぎに、PG 含量の低下した変異株で観察された光合成の光阻害が、光合成装置の失活と修復のいずれの過程に起因するのかを検討した。タンパク質合成阻害剤であるリンコマイシンを作用させ、光合成装置の修復を抑制した場合、光合成活性は PG の有無にかかわらず、ほぼ同様に低下した。また、強光照射した変異株を弱光下に移すことにより光合成装置の失活を抑制すると、光合成活性の回復は PG の添加により大きく促進された。以上の結果から、PG が光合成装置の修復過程に重要であることが明らかとなった。一方、光合成の光阻害は、おもに PS の機能低下に起因し、また、障害を受けた PS 反応中心の D1 タンパク質が速やかに分解され、新規に合成されたタン

パク質と取り替えられることが、PS の修復において重要であるといわれている。そこで、PG が D1 タンパク質の失活、分解、再合成に影響を与えている可能性を考え、D1 タンパク質のターンオーバーについて解析したが、予想に反して、PG 含量が低下した変異株においても D1 タンパク質のターンオーバーは野生株と変わらず、また、D1 タンパク質の PS 複合体へのアセンブリーも正常に行われていた。しかしながら、PG 含量の低下した変異株において、PS 複合体の単量体が蓄積することが観察され、また、PG を再添加すると二量体が増加し、光合成活性が回復することも観察された。以上の結果から、PG は PS 複合体の二量体化を促進するという点で、PS 複合体の修復に寄与していることが明らかとなった。

3. PS 複合体への表在性タンパク質の結合に果たす PG の機能

上述のように、PG は PS 複合体の二量体化を促進することが明らかとなったが、どのように PG が PS 複合体の二量体化に関与するのかを明らかにするため、野生株および PG 含量が低下した変異株から PS 複合体の単量体および二量体を精製し、各複合体の性質を詳細に比較した。変異株より精製した PS 複合体の単量体および二量体の光合成活性は、野生株と比較して 40% 程度であり、また、野生株と変異株のいずれにおいても二量体は単量体の 3 倍程度の活性を有していた。つぎに、これらの活性の違いが何に起因しているのかを明らかにするために、両株より精製した PS 複合体のサブユニット組成を比較したところ、変異株の PS 複合体では PsbO、PsbV、PsbU、PsbQ、Psb27 といった、酸素発生反応をつかさどる Mn-クラスターの保護に関わっている表在性タンパク質が複合体から解離していることが明らかとなった。しかし、これらのサブユニットは、チラコイド膜には存在することがウエスタン解析により確認されたことから、PG は表在性タンパク質の PSII 複合体への結合に重要であることが示唆された。変異株より精製した PSII 複合体では、表在性タンパク質が解離していることから、Mn-クラスターが正常に形成されていない可能性が考えられた。そこで、各複合体の Mn 原子を定量したところ、野生株と変異株のいずれにおいても単量体は二量体に比較して 1/3~1/4 程度の Mn 原子を有しているのみであり、PSII 複合体の単量体は、Mn-クラスターの形成が未完成な、PSII 複合体の構築過程の中間段階にあるものと考えられた。また、変異株の二量体に含まれる Mn 原子量が、野生株と比較して減少しており、PG 含量が低下した変異株では、表在性タンパク質が解離することで、Mn 原子の遊離を引き起こし、光合成活性を低下させる原因になっていることが推測された。また、PG 含量が低下した変異株をリンコマイシンで処理し、新規のタンパク質合成を阻害した後に PG を添加したところ、チラコイド膜ルーメン内で遊離していたと考えられる PsbO が PSII 複合体に再結合した。このことから、PG は表在性タンパク質の PSII 複合体への結合を促進することが明らかとなった。

4. まとめ

これまでの結果から、PSII 複合体の構築や構造維持、そして、それらの過程に PG がどのように関わっているかを以下のように解釈することが出来る。単量体において Mn-クラスターが形成されると、表在性タンパク質が Mn-クラスターを保護するために PSII 複合体に結合し、活性型の単量体が構築される。その後、二量体化が起こり、PSII 複合体は二量体としてチラコイド膜中で安定に存在するものと考えられる。PG 含量が低下した変異株では、PSII 複合体への表在性タンパク質の結合が制限された結果、Mn-クラスターより Mn が遊離し、PSII 複合体の活性が低下したものと考えられる。なお、PG を欠乏する変異株では光合成の光阻害が容易に引き起こされたが、これも、表在性タンパク質が解離することで、Mn-クラスターが不安定化したことに起因すると考えられ、近年の報告にある“光合成の光阻害における初期ターゲットは Mn-クラスターである”という結果に合致するものである。また、表在性タンパク質の結合における異常は、PSII 複合体の二量体化を制限し、結果として、単量体を蓄積させる原因になっていると推測される。

本研究では、生細胞において PG 含量を容易に制御できるという変異株の特性を生かし、PS 複合体における PG の機能について解析を行った。その結果、PG は酸素発生場である Mn-クラスターを安定に維持するために重要となる、表在性タンパク質のアセンブリーを介して PS 複合体の構築に重要な機能を果たしていることが明らかになった。本研究は、光合成の初期反応における重要なファクターであるチラコイド膜脂質に関して、その一種である PG の機能を分子レベルで解明したもので、光合成の初期反応を理解する上で、従来の研究からは得られなかった重要な知見を提供する研究である。