

論文内容の要旨

論文題目

Regulatory mechanism for maintaining the balance of two photosystems in response to high light

(強光下で2つの光化学系を協調させる調節メカニズムの解明)

氏名 藤森玉輝

序論

シアノバクテリアは進化の過程で、2つの光化学系を持つことによって、地球上に普遍的に存在する水を光合成の基質として利用することを可能にし、その生育範囲を全地球上に広げることができた。一方、このために2つの光化学系を協調させる必要性が生じた。絶えず変動する自然環境下で、2つの光化学系を協調させるメカニズムは主に2つ知られている。長期的な応答としての光化学系量比調節および短期的な応答として光アンテナから2つの光化学系へのエネルギー分配である。本研究では、これら2つのメカニズムの解明を目的とした。

1 光化学系量比調節のメカニズムの解析

光合成電子伝達では、光化学系 II と光化学系 I が協調して働いているため、光化学系 II と I の量比は、環境中の光強度の変化に応答して適切に調節されていなければならない。例えば光強度が強くなる場合には、光化学系 II に対して光化学系 I の量を大きく減少させることが知られている。これまで、光化学系量比が調節できない変異株として、*pmgA mutant* が単離され解析されてきた。この *pmgA mutant* では、強光が長時間続いた場合に光化学系 I 反応中心サブユニットをコードする遺伝子の発現を抑制できない。これが光化学系量比調節の欠損の原因であると予想されるが、それ以上の詳細なメカニズムは不明のままである。そこで、そのメカニズムの解明のため、新たな光化学系量比調節の欠損株を単離解析を試みた。

1.1 *pmgA* mutant と同様のクロロフィル蛍光挙動を示す変異株を単離した

当研究室の以前の研究結果により、クロロフィル蛍光強度の時間変化を観察した場合、同じ機能に欠損がある変異株は似た表現型を示すことが示されていた。そこでクロロフィル蛍光を指標に、*pmgA* mutant とよく似たクロロフィル蛍光強度の時間変化を示す変異株 *0205-79 mutant* を単離した。

1.2 強光下で *0205-79 mutant* は光化学系量比調節ができない

低温蛍光スペクトルにおける光化学系 II (F695)と I (F725)の蛍光ピークの比から、光化学系量比(光化学系 II/光化学系 I)の指標となる F_{695}/F_{725} を計算した。野生株では、強光移行後24時間で光化学系 I の減少に伴い F_{695}/F_{725} が 0.4 から 1 に増加するが、*0205-79 mutant* ではこの増加は見られなかった(Fig. 1)。この結果から、*0205-79 mutant* は *pmgA* mutant と同様に強光下で光化学系量比を調節できないことが明らかになった。

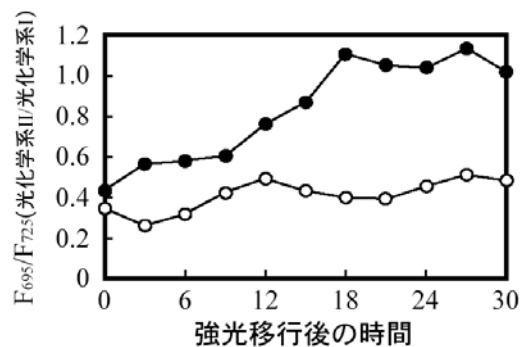


Fig. 1 強光順応過程における F_{695}/F_{725} (光化学系II/光化学系I)の時間変化 ● 野生株 ○ *0205-79 (sll1961)* mutant

1.3 *0205-79 mutant* の光化学系 I 反応中心サブユニット量は強光下で十分に減少しない

強光下では光化学系 I の量を積極的に減少させることによって、光化学系量比調節が行われている。そこで、光化学系 I 反応中心サブユニット PsaAB の量をウェスタン解析で調べた。弱光下では野生株と *0205-79 mutant* で細胞あたりの PsaAB 量には違いは見られなかった(Fig. 2)。一方、強光下では、*0205-79 mutant* では野生株と比較して PsaAB 量の減少が部分的に抑制されていた。同様の結果は *pmgA mutant* においても報告されている。

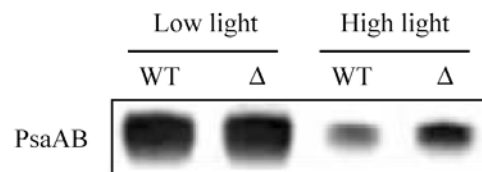


Fig. 2 弱光および強光下における野生株および *0205-79 (sll1961)* mutant の PsaAB の量

1.4 *0205-79 mutant* では *psaA* 遺伝子の発現は強光下で抑制されている

pmgA mutant では長時間の強光下で *psaA* の発現が十分に抑制できないことがすでに報告されている。リアルタイム RT-PCR で *psaA* の mRNA 量を調べると、*0205-79 mutant* では野生株と同様に *psaA* の mRNA 量は強光下で十分に抑制されていた。したがって、*0205-79 mutant* では *pmgA mutant* と異なり PsaAB の翻訳あるいは翻訳後調節に欠損があると考えられる。

1.5 光化学系量比の調節は長時間の強光下の生育に重要である

0205-79 mutant は強光移行後24時間では光化学系 I の量が多いため野生株と比較してやや生育がよかったが、48時間後、72時間後では生育阻害が見られた。

1.6 *sll1961* 遺伝子の破壊によって光化学系量比の調節が欠損する

0205-79 mutant では *sll1961* の ORF 内に抗生物質耐性カセットが挿入されていた。また、新たに *sll1961 mutant* を作製し、低温蛍光スペクトル測定により強光下における光化学系量比調節を調べ

た。新しい *sll1961* mutant は *0205-79* mutant と同様の表現型を示した。これらの結果から、*sll1961* 遺伝子が強光下の光化学系量比調節に関与していることが明らかになった。

1.7 DNA マイクロアレイによって Sll1961 の下流因子を探索した

Sll1961 は転写調節因子と相同性があり、Sll1961 は下流因子を転写調節していると考えられる。そこで、DNA マイクロアレイ解析で下流因子を調べたところ弱光培養条件では *0205-79* mutant と野生株の間で発現に差がある遺伝子は認められなかった。一方、強光移行後3時間では、*0205-79* mutant で野生株と比較し *sll1773* の発現が誘導され、*slr0364*、*slr2057*、*slr2076* の発現が抑制されていた。*sll1773* は pirin-like protein、*slr0364* は unknown protein、*slr2057* は water channel protein、*slr2076* は 60-kD chaperonin をコードしている。

1.8 強光下で *slr0364* mutant は光化学系量比調節に部分的な欠損がある

slr0364 の発現は強光下で誘導されることが報告されていたので、*slr0364* に注目し、*slr0364* の破壊株を作成し強光下における光化学系量比を調べた。F695/F725 は細胞を弱光から強光へ移行すると 0.4 から 0.7 まで増加した。この結果から、*slr0364* mutant では強光下の光化学系量比調節に部分的な欠損があることが明らかになった。

1.9 結論

強光下での光化学系量比調節に関与する新たな因子 Sll1961 を明らかにし、その下流で Slr0364 が働いている可能性を示した。今後 Sll1961 の解析を進めることにより、強光下で光化学系 I を減少させるメカニズムにおける PsaAB 量の翻訳あるいは翻訳後調節の役割を明らかにできると考えている。

2 光アンテナから 2 つの光化学系へのエネルギー分配のメカニズムの解析

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光アンテナであるフィコビリソームから 2 つの光化学系(光化学系 I と光化学系 II)へのエネルギー分配は、環境中の光強度の変化に応答して適切に調節されている。弱光下では、フィコビリソームで吸収された光エネルギーは主に光化学系 II へ伝達されるのに対して、強光下では光化学系 II だけでなく光化学系 I にも伝達される。これまで、このエネルギー伝達に関して、光アンテナであるフィコビリソーム側のコンポーネントに関しては研究が進められてきたが、光化学系側については全く解析がなされなかった。

2.1 強光下で PsaK2 サブユニットが光化学系 I 複合体内へ組み込まれる

強光下では、光化学系 I のサブユニットをコードするほとんどの遺伝子の発現が抑制されるのに対して、*psaK2* 遺伝子の発現は誘導されている、という報告から、光化学系 I サブユニット PsaK2 に着目した。まず、強光下における光化学系 I 複合体中の PsaK2 サブユニット量を調べた。弱光条件もしくは強光条件で培養した細胞から、ショ糖密度勾配遠心と非変性ゲル電気泳動を行って光化学系 I 複合体を精製し、SDS ゲル電気泳動によりサブユニット組成を調べた。弱光下では PsaK1 量が多く、PsaK2 量は痕跡量しか認められなかったが、強光下では PsaK2 量が著しく増加していた(Fig. 3)。

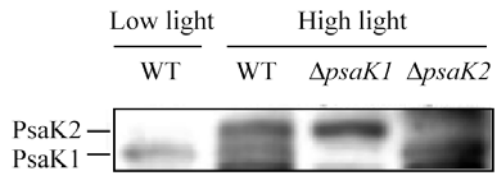


Fig. 3 弱光および強光下における光化学系I内のPsaK1とPsaK2の量

2.2 強光下でPsaK2はフィコビリソームから光化学系 I へのエネルギー伝達に関与している

強光下での PsaK2 の機能を調べるために、野生株と遺伝子破壊株(*psaK1* mutant、*psaK2* mutant)を弱光および強光下で24時間培養し、パルス変調蛍光法を用いて光合成を測定した。強光培養した野生株および *psaK1* mutant では *psaK2* mutant よりも光合成電子伝達に利用される以外の原因による蛍光強度の低下を表す Nonphotochemical quenching(qN)は高い値を示していた。弱光培養した株ではこの差は見られなかった。一方、他の光合成パラメーターについては弱光および強光において株間の違いは観察されなかった。シアノバクテリアでは qN はフィコビリソームから光化学系 I へエネルギーが伝達されることによる蛍光強度の低下を表している。したがって、この結果は、強光下で PsaK2 がフィコビリソームから光化学系 I へのエネルギー伝達に関与していることを示している。このことは、低温蛍光スペクトルの測定によっても確かめられた。

2.3 *psaK2* mutant では強光下における生育が阻害される

野生株、*psaK1* mutant および *psaK2* mutant の培養液を培地にスポットし、弱光および強光下で生育を調べた。弱光下では、株間で大きな違いは見られなかったが、強光下では *psaK2* mutant の著しい生育阻害が観察された。

2.4 結論

PsaK2 は強光下で光化学系 I 複合体へ組み込まれ、フィコビリソームから光化学系 I へのエネルギー伝達を引き起こすことが明らかになった。また、このエネルギー伝達は、強光下における生育に必須である。