

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Analysis of the regulation of quantitative modification of photosynthetic apparatus in response to environmental changes in cyanobacteria

シアノバクテリアにおける環境変化に対する光合成装置の量的変化  
機構の解析

氏名 佐藤 華代

### 序論

シアノバクテリアを含む光合成生物は様々な環境変化に対して様々な応答をすることにより光合成をはじめとする生命活動を円滑に行っている。光化学系量比の調節は光合成生物で広く観察される環境応答の一つであり、光の強さや光質に応答して光合成装置である光化学系の量を変化させることにより電子伝達を最適化する機構である。光合成装置は強い光に曝されると過剰な電子伝達によって活性酸素の発生などの酸化ストレスによる細胞の損傷を招く。これを避けるために、光化学系 II に対する相対的な光化学系 I の量を減少させる事が知られている。また、シアノバクテリアは窒素欠乏状態に曝されると集光アンテナ複合体、フィコビリソームを分解して不足した窒素を補う事が知られている。このように光合成装置の量的な変化はシアノバクテリアにおいて重要な環境変化に対する応答の一つであるが、その調節機構については多くのことがわかっていない。

これまでにシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株において、強光での光化学系量比調節に関与する因子として Sll1961 と PmgA という二つの因子が報告されている。一方、*Synechococcus elongatus* PCC 7942 株において窒素欠乏時の応答に必要な

な因子として NblA、NblC などの因子が知られている。強光応答に必要な PmgA と窒素欠乏時の応答に必要な NblC は高い相同性を持つことから、強光応答と窒素欠乏時の応答では共通した調節機構を有している可能性が考えられる。そこで本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と *Synechococcus elongatus* PCC 7942 でこれらの因子の変異株を用いて、これらの因子が強光応答、窒素欠乏時の応答に関与しているかを検証することによって、環境変化に対する光合成装置の調節機構の解明を目的とした。

## 結果と考察

### 1. 光化学系量比調節因子の窒素欠乏時の応答への関与

*Synechocystis* sp. PCC 6803 株において、強光下で光化学系量比調節に関与する Sll1961 と PmgA の変異株を用いて窒素欠乏時の応答への関与を調べたところ、NblC

と相同の PmgA の変異株では野生型と同様にフィコビリソームが分解され、青緑色の培地が退色する bleaching が起こっていた。しかし *sll1961* 変異株においては bleaching が起こらず培地が青緑色のままの non-bleaching 表現型が観察された。この時の色素量を比較したところ光化学系 I の主要色素であるクロロフィル量については野生株との差が認められなかった

が、フィコビリソームの主要色素であるフィコシアニンについては *sll1961* 変異株でのみ高いレベルを維持している事がわかった(Fig. 1)。フィコビリソームの構成因子である *cpcBA* の転写を調べたところ、*sll1961* 変異株で野生株と同じく窒素欠乏培地に移行後発現は抑制されており、新規フィコビリソーム合成の抑制には欠損がない事が示唆された。これまで *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株で報告されている

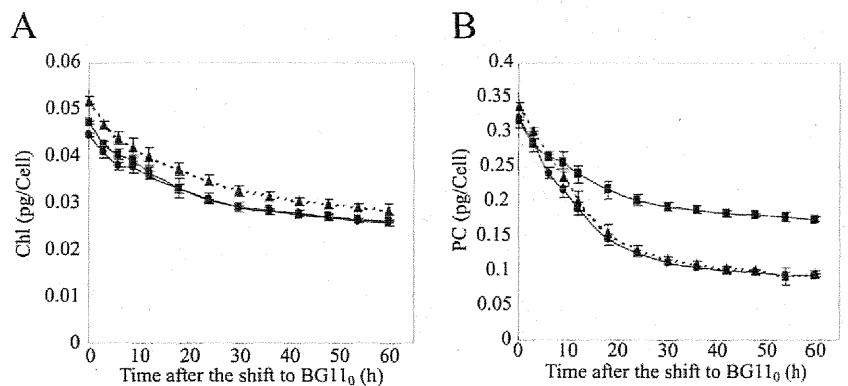


Fig. 1 窒素欠乏培地移行後の色素量の変化

窒素欠乏培地(BG11<sub>0</sub>)移行後の *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株(丸)、*sll1961* 変異株(四角)、*pmgA* 変異株(三角)における(A)細胞あたりのクロロフィル(Chl)量と(B)細胞あたりのフィコシアニン(PC)量。

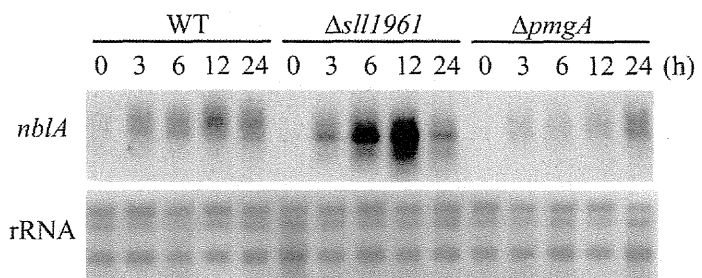


Fig. 2 窒素欠乏培地移行後の *nblA* の発現

ノーザンブロットによる窒素欠乏培地移行後の *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株、*sll1961* 変異株、*pmgA* 変異株における *nblA* の転写量の変化。rRNA はローディングコントロールとして表示。

non-bleaching 変異株の多くは *nblA* の転写異常により non-bleaching 表現型になることが知られている。そこで *sll1961* 変異株で *nblA* の転写を調べたところ、*sll1961* 変異株では *nblA* の発現は窒素欠乏培地移行後上昇している事がわかった。それに対し、*pmgA* 変異株では部分的に *nblA* の発現量が抑制されていた (Fig. 2)。この結果より *Synechocystis* sp. PCC 6803 株において *PmgA* は *NblC* と同様に *nblA* の発現上昇に関与するものの、部分的な *nblA* の発現の抑制はフィコビリソームの分解に影響しない事がわかった。次に *NblA* の *Sll1961* の制御への関与を調べるため *nblA* 変異株における *sll1961* の転写量を調べたところ、野生株と比較して抑制されている事がわかった。この結果より、*NblA* は *sll1961* を正に制御しており、*nblA* 変異株で観察される non-bleaching の表現型は *sll1961* が正常に発現されていない事によって引き起こされている可能性が考えられる。この可能性を調べるために、窒素欠乏下でも恒常的に発現している *psbAII* のプロモーターに *sll1961* 遺伝子をつなぎ、*nblA* 変異株で *sll1961* を恒常的に発現させたが窒素欠乏時の non-bleaching の表現型は相補されなかった。これらの結果より窒素欠乏時のフィコビリソーム分解には *sll1961* と *nblA* が両方発現している事が必要である事が示唆された。

## 2. フィコビリソーム分解に関与する因子の強光応答への関与

次にフィコビリソーム分解に関与する因子が強光への応答に関与するかどうかを調べた。まず *Synechocystis* sp. PCC 6803 株でフィコビリソーム分解に関与する事が知られている *NblA* の変異株で光化学系量比調節が正常に行われているかを液体窒素温度下のクロロフィル蛍光スペクトルの測定により調べた。強光移行後、野生株では光化学系 II に対する相対的な光化学系 I のピークの減少が観察されるが、*nblA* 変異株では量比の変化が観察されなかった。そこで光化学系 I の反応中心タンパク質 *PsaA/B* の量を調べたところ、*nblA* 変異株では強光移行後も野生株ほど減少していない事がわかった。これらの結果より *NblA* は *Sll1961* と同様に窒素欠乏時のフィコビリソームの分解と強光下の光化学系量比調節の両方に関与している事がわかった。

次に *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株を用いて窒素欠乏時のフィコビリソーム分解に関与する因子の強光応答への関与を調べた。まず *NblA* の変異株で光化学系量比を調べたところ光化学系 I のピークの減少が観察され、正常な光化学系量比調節が行われている事がわかった。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株の *PmgA* と相同の因子 *NblC* の変異株についても同様に正常な光化学系量比調節が観察された。これらの結果より *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における強光下での光化学系量比は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 とは異なる機構で調節されていると考えられる。

## 3. *Sll1961* と *NblA* の光質変化による光化学系量比調節への関与

光化学系量比は光の強さに加え、光質の変化によっても調節されることが知られている。光化学系 I によって主に吸収される青色光によって強光と同様に光化学系 I の相対的な量が減少する事が報告されており、強光に対する応答と同様の光化学系量比の調節機構

が存在すると考えられている。そこで強光下で光化学系量比調節に関与する事が明らかになった *Sll1961* と *NblA* が、*Synechocystis* sp. PCC 6803 において青色光による光化学系量比調節にも関与するかを調べた。液体窒素温度下のクロロフィル蛍光スペクトルの測定により光化学系量比を調べたところ、*sll1961* 変異株、*nblA* 変異株ともに青色光に応答した光化学系 I のピークの減少が観察され、共に光質による光化学系量比調節には欠損がない事がわかった。これにより、青色光に対する光化学系量比調節機構は、強光に対する機構とは異なる事が示唆された。次に青色光への応答でも光化学系 I の量の減少によって光化学系量比調節がされているかを調べるため光化学系に含まれる色素量を測定した。通常強光下では光化学系 I の量の減少に伴って光化学系 I に結合しているクロロフィル量が減少する事が知られている。しかし、青色光下では野生株、*sll1961* 変異株、*nblA* 変異株すべてにおいてクロロフィル量が変化していない事がわかった。これらの結果より青色光下では光化学系 II あたりの相対的な光化学系 I 量は低下するが、光化学系 I の量は変化していない事が示唆された。さらに光化学系 II のアンテナ色素であるフィコシ

アニンが青色光下で増加しており、光化学系 II が増加している可能性が考えられた。そこで光化学系 II の反応中心タンパク質 D1 の量を調べたところ、野生株、*sll1961* 変異株、*nblA* 変異株

のすべての株で青色光移行後増加している事がわかった (Fig. 3)。これらの結果から、強光に対する応答では光化学系 I の量を減少させることによって光化学系量比を調節しているのに対し、青色光に対する応答では光化学系 II の量を増加させることによって光化学系量比を調節しており、*Sll1961* と *NblA* は光化学系量比調節において光化学系 I の減少には関与するが、光化学系 II の増加には関与していない事がわかった。この結果から、光化学系量比は光化学系 I の量の調節によってのみ行われるというこれまでの仮説に反し、青色光に対する応答では光化学系 II の量の調節という全く異なる調節機構が存在することが明らかとなった。

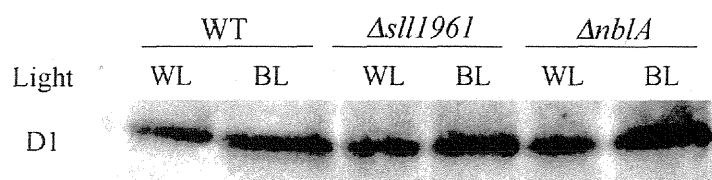


Fig. 3 青色光における光化学系 II の量の変化

ウエスタンブロットによる光化学系 II の反応中心 D1 タンパク質の変化。白色光 (WL) から青色光 (BL/445 nm-465 nm) に移行後 24 時間経過したときの *Synechocystis* sp. PCC 6803 野生株、*sll1961* 変異株、*nblA* 変異株における D1 タンパク質の量。