

論文の内容の要旨

論文題目

Molecular studies of photosystem I complex from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
(シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の光化学系 I 複合体の分子生物学的解析)

氏名

久保田 寿子

地球上の殆ど全ての生物は、植物の光合成によって太陽光エネルギーから変換された化学エネルギーに依存して生命活動を行っている。高等植物やシアノバクテリアなどが行う酸素発生型光合成の電子伝達系は、水を酸化して酸素を発生する光化学系 II (PSII) 複合体と、二酸化炭素を同化する還元力を生み出す光化学系 I (PSI) 複合体の二種類の超分子複合体が、シトクロム *b₆f* 複合体を介してつながって構成されている。PSI の反応中心である P700 は光誘起電荷分離によって P700⁺ となり、シトクロム *b₆f* 複合体からプラストシアニンを介して伝達された電子を受け取る。その電子は、PSI のコアタンパク質である PsaA 及び PsaB に配位している A₀ と呼ばれるクロロフィル、続いてフィロキノン A₁、さらに鉄イオウクラスター F_x へと伝達される。その後、電子はストロマ側の表在性サブユニット PsaC に結合している鉄イオウクラスターである F_A、F_B を経由し、フェレドキシンに渡り、最終的にフェレドキシン-NADP⁺レダクターゼによる NADPH の生産に使われる。高等植物において、PSI は単量体として存在しているが、シアノバクテリアの場合、その殆どが三量体として存在する。2001 年にシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* の PSI 結晶構造が 2.5Å の分解能で報告された。単量体は 12 種類のサブユニットからなるタンパク質部分と、96 分子のクロロフィル、2 分子のフィロキノン、3 つの鉄-硫黄クラスター、22 分子のカロテノイド、3 分子のホスファチジルグリセロール (PG)、1 分子のモノガラクトシルジアシルグリセロール (MGDG)、カルシウムと推定されている金属イオンと 201 個の水分子という極めて多種に及ぶ成分により構成されている。PSI はすでに多くの高等植物やシアノバクテリアから精製され、複合体の構成成分の分析や X 線結晶構造解析などが進められてきているが、精製した PSI について単量体と三量体を分離し、それらを構成する成分、活性、機能などの違いについて詳細に解析した例はない。

本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて PSI 複合体を効率よく簡便に精製する方法を確立し、精製した複合体の脂質やタンパク質成分の分析を行い、複合体に結合している新規の脂質やタンパク質サブユニットを同定した。通常、PSI は複数のイオン交換クロマトグラフ

イーなどを用いた煩雑な方法によって精製されているが、本研究では His タグを付加したサブユニットを発現する株 (PSI を構成するサブユニットである PsaF の C 末端、PsaJ の N 末端に His タグを付加した株) を作製し、PSI の精製に使用した。

本研究で作製した F-His と J-His 株は、光独立栄養条件下で野生株と同様の速度で増殖し、細胞を用いた光合成の net 活性、PSII 活性、また、チラコイド膜を用いた PSII 活性、PSI 活性において、野生株との差が見られなかった。このため、His タグ付加による影響は無いと考えられた。それぞれの株から調製したチラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化したのち、Ni アフィニティークロマトグラフィーを用いることにより PSI を精製した。精製した PSI をグリセロール密度勾配遠心法により単量体と三量体に分離した。精製した複合体の PSI 活性を測定したところ、三量体、単量体ともに、高い活性を保持しており、三量体は、単量体よりも高い活性を持っていることが明らかになった。三量体と単量体を SDS-PAGE を用いてタンパク質を分析した結果、三量体には、PsaA、PsaB、PsaD、PsaF、PsaL、PsaE、PsaC、PsaK2、PsaK1、PsaI、PsaJ、PsaM のサブユニットが検出され、PSI のサブユニット以外のタンパク質は検出されなかった。単量体では PsaK2 以外の PSI サブユニットが検出され、それに加えて多くの新規のタンパク質が含まれていることが明らかになった。これらのタンパク質を質量分析によって解析したところ、NDH-1 複合体の表在性領域を構成するタンパク質が 6 種類 (NdhH、NdhK、NdhI、NdhJ、NdhN、NdhM)、PSII アセンブリーオペロン (PAP オペロン) にコードされるタンパク質が 4 種類、その他のタンパク質が 4 種類、合計 14 種類のタンパク質が同定された。NDH-1 は PSI と相互作用し、サイクリック電子伝達を行っていることが知られているが、シアノバクテリアにおいて NDH-1 と PSI の相互作用を生化学的に示した報告はない。今回、初めて PSI 単量体と NDH-1 が結合していることを示唆する結果が得られた。PAP オペロンは、PSII のアセンブリーに関与しており、PSII の表在性タンパク質である PsbV、PsbQ、PsbP が欠損した株では PAP オペロンの発現が促進され、逆に酸化ストレスや PSI が欠如した株においては抑制されることがわかっている。PSI にも PAP オペロンにコードされたタンパク質が存在するという事は、それらのタンパク質が PSII だけでなく PSI のアセンブリーにも関与していることを示唆している。次に、ネイティブな複合体の状態を調べるために、精製した PSI の単量体と三量体を Blue Native-PAGE を用いて分離したところ、三量体は一つのバンドとして、また、単量体は近接する二つのバンド(高分子側の単量体 1 と低分子側の単量体 2)として検出された。これら複合体を形成するタンパク質を SDS-PAGE により分離し、サブユニット組成を解析した。三量体には、全ての PSI サブユニットが検出されたが、単量体には PsaK2 が検出されなかった。また、単量体の 1 及び 2 について詳しく解析した結果、単量体 1 には PsaL サブユニットが含まれているが、単量体 2 には含まれていないことが明らかになった。PsaL は PSI の三量体化に機能しているという報告があることから、単量体 2 に PsaL が結合して単量体 1 となり、それか

ら三量体が形成されるのではないかと考えられる。さらに、得られた PSI 三量体について脂質分析を行ったところ、反応中心当り 6 分子の脂質 [2 分子の MGDG、1 分子のジガラクトシルジアシルグリセロール (DGDG)、1 分子のスルホキノボシルジアシルグリセロール (SQDG)、2 分子の PG] が含まれていることが明らかになった。この結果は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の PSI には *S. elongatus* の PSII の X 線結晶構造解析では同定されていない DGDG や SQDG も PSI に結合していることを示しており、これらの脂質が PSI において重要な機能を担っているものと推定される。なお、これらの全ての分析について、F-His 及び J-His 間に差はなく同様の結果が得られた。

次に、PSI における新規に同定された脂質 DGDG の PSI における機能を解析するために、PsaJ-His を用いて DGDG 合成酵素遺伝子 (*dgdA*) の欠損株を作製した (*dgdA*/J-His)。*dgdA*/J-His は、光独立栄養条件下で $\Delta dgdA$ とほぼ同様の速度で増殖したため、His タグの影響は無いと考えられた。DGDG 合成酵素欠損株から調製したチラコイド膜を可溶化し、Blue-Native-PAGE を行ったところ、PSII の二量体は大幅に減少し、PSII 単量体及び CP43-less 単量体が増加していた。一方、PSI は三量体、単量体ともに野生株とほぼ変わらない割合で検出された。しかし、チラコイド膜を可溶化した後、His タグ精製を行った PSI についてグリセロール密度勾配遠心法や Blue-Native-PAGE を用いて PSI の複合体を分離したところ、殆どが三量体として存在している場合 (PSI-T) と、殆どが単量体として存在している場合 (PSI-M) があった。単量体が殆どを占めている場合は、単量体と三量体の間に PSI の分解によって生じたと考えられる複合体に相当する二本の緑色のバンドが検出された。PSI-T の単量体 (T-mono) と三量体 (T-tri)、PSI-M の単量体 (M-mono) と三量体 (M-tri) を構成するタンパク質を SDS-PAGE を用いて分離しサブユニット組成を分析したところ、全ての PSI 複合体において、PsaM と PsaI サブユニットが検出されなかった。T-tri と M-tri には、PsaA、PsaB、PsaD、PsaF、PsaL、PsaE、PsaC、PsaK2、PsaK1、そして PsaJ-His サブユニットに加えて、双方共に未知のタンパク質が検出された。T-mono と M-mono のタンパク質組成は異なっており、T-mono は、J-His のそれと同様のサブユニット組成を持ち、PsaK2 が検出されなかった。しかしながら、M-mono には、PsaK2 が存在しており、PSI 以外のサブユニットの量が少なくなっていた。これらのことから、M-mono は、生体内においては三量体を形成していた PSI が、DGDG が欠落していることにより不安定化し、精製途中で単量体に解離したものであることが示唆された。*dgdA*/J-His から調製したチラコイド膜、また、それから精製した PSI、T-tri 及び M-tri の PSI 活性を測定した。すると、何れのサンプルも、J-His から精製したものの活性よりも 30%以上低かった。このことから、DGDG は PSI の活性を維持するのに重要な役割を持つことが示唆された。*dgdA*/J-His のチラコイド膜について脂質分析を行った結果、DGDG は検出させず、代わりに J-His と比較して、PG、MGDG、SQDG の増加がみられた。一方、精製 PSI の T-tri 及び M-mono の脂質分析を行うと、T-tri の場

合、反応中心当たり 3 分子の PG、4 分子の MGDG、3 分子の SQDG が、M-mono の場合、反応中心当たり 3 分子の PG、5 分子の MGDG、4 分子の SQDG が検出された。合計、反応中心当たり 5~7 分子の脂質の増加が確認された。これらのことから DGDG は、PSI 三量体構造を安定化し、PSI が高い活性を維持するのに必要であることが明らかになった。

本研究では、*Synechocystis* sp. PCC 6803 から PSI 複合体を簡易に精製する方法を確立するために His タグを付加した PsaF サブユニットまたは PsaJ サブユニットを発現する F-His 株と J-His 株を作製した。これらの株では、活性の高い PSI 複合体を Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィーを用いて簡便に精製することができ、精製した PSI をグリセロール密度勾配遠心法に供与することで単量体と三量体を分離できることが明らかとなった。精製した三量体には、これまで PSI のサブユニットとして知られているタンパク質のみが同定されたが、単量体では 14 種類の新規のタンパク質が同定された。これらのタンパク質は PSI、特に単量体において重要な機能を担っている可能性が示唆される。また、三量体の脂質を分析したところ、反応中心当たり 6 分子の脂質が存在することが明らかになった。興味深いことに、*S. elongatus* の PSI 結晶構造では同定されていない DGDG や SQDG が *Synechocystis* sp. PCC 6803 の PSI には存在していた。DGDG の PSI における機能を調べるために、DGDG が合成できない *dgdA*/J-His 株を作製し、DGDG の欠損が PSI に与える影響について調べたところ、DGDG が欠損すると PSI の活性が低下し、PSI 複合体が単量体に解離し易くなることが明らかとなった。これらの結果は、DGDG が PSI の活性維持や構造の安定化に寄与していることを示している。