

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 久保田寿子

地球上の殆ど全ての生物は、植物やシアノバクテリアなどが行う光合成に依存して生命活動を行っている。光合成の初期反応はチラコイド膜でおこり、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。この光エネルギー変換反応を担う光合成装置は、いくつかの超分子複合体により構成されている。それらの超分子複合体の一つが光化学系 I 複合体 (PSI) であり、本論文提出者はこの PSI に注目して研究を行った。PSI はすでに多くの植物やシアノバクテリアから精製され、複合体を構成する成分の分析や X 線結晶構造解析などが進められている。シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の PSI 三量体については、2001 年に結晶構造が 2.5 Å の分解能で報告されている。複合体は単量体当り 12 種類のサブユニットからなるタンパク質部分、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おり、それらの構成成分の複体内での配置や立体構造が明らかとなっている。植物の PSI 単量体についても X 線結晶構造解析によって得られた構造が報告されている。一方、PSI は植物においては単量体として存在しているが、シアノバクテリアでは単量体と三量体の状態で存在し、三量体の活性の方が単量体の活性に比べて高いことが知られ、三量体の結晶構造のみがこれまで報告されている。しかし、なぜ植物の PSI は単量体で存在し、シアノバクテリアでは単量体と三量体の状態で存在するのか、シアノバクテリアの PSI 単量体と三量体の成分、構造、機能の違いについても未だに不明であり、それらの点について詳細に解析した例はない。そこで、本論文提出者は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 から簡便に PSI を精製する方法を確立し、その方法で精製した PSI の単量体および三量体の構成成分や活性を詳細に調べ、単量体と三量体の成分や機能の違いについて解析した。

本論文提出者は、*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。通常、PSI は複数のイオン交換クロマトグラフィーなどを用いた煩雑な方法によって精製されているが、His タグを付加したサブユニットを発現する株を用いれば、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るものと考えた。作製した株から PSI を精製したところ、これらの株では活性の高い PSI 複合体を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を明らかにした。精製した PSI の構成成分を詳細に分析したと

ころ、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を検出したが、単量体では 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 種類の新規のタンパク質を同定した。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。NDH-1 のサブユニットが PSI に含まれていたという結果は、シアノバクテリアにおいて PSI 単量体と NDH-1 が結合している可能性を初めて示した重要な知見である。一方、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知られている。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。

また、本論文提出者は脂質についても分析し、三量体には反応中心当り 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を明らかにした。この結果は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の PSI には *T. 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 に存在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た。

さらに、本論文提出者は PSI における新規に同定された脂質 DGDG の機能を解析するために、J-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)。作製した *dgdA*/J-His からチラコイド膜や PSI を精製して脂質分析を行ったところ、DGDG は検出せず、PG、MGDG、SQDG の増加がみられ、PSI では反応中心当たり 5~7 分子の脂質の増加が確認された。チラコイド膜と PSI の活性についても測定したところ、何れのサンプルでも、J-His から精製したものの活性よりも 30%以上低く、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。これらの実験結果は、DGDG が PSI 三量体構造を安定化し、PSI の高い活性の維持に必要であることを示している。

以上のように、本博士論文の研究内容は、これまで未解明であったシアノバクテリアの PSI 単量体と三量体の構成成分や活性の違いについて分子レベルで解析し、単量体のみ結合している新規タンパク質成分の同定、従来の研究から知られていた MGDG や PG 以外に、DGDG や SQDG も PSI に存在することの発見、さらに、PSI における DGDG の重要性を明らかにした点で優れており、植物生理学や光合成の研究分野に貴重な知見を提供するものである。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。