

論文の内容の要旨

Supramolecular organization of photosystem complexes.

(光化学系複合体の超分子構造)

渡邊麻衣

光合成は、地球上のほとんどすべての生物の生存の根幹を支える重要な反応である。酸素発生型光合成生物は、太陽の光エネルギーを用いて二酸化炭素を固定し、糖やデンプンを合成する。その過程で酸素が発生する。光合成において最も重要な反応が、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光化学反応である。この反応を担うのが、光化学系 I (系 I) と光化学系 II (系 II) 複合体である。それぞれの複合体は、単離、精製され構造や機能が詳しく調べられてきた。系 II 複合体はシアノバクテリアから高等植物まで単量体と二量体として単離されており、二量体で機能していると考えられている。系 I 複合体はシアノバクテリアでは三量体、高等植物や緑藻ではアンテナを結合した単量体として機能しているといわれている。しかし、系 II が単量体でも十分な活性を持つことも報告されている。一方、シトクロム *b₆f* 複合体は二量体を形成することで、キノン結合部位ができ活性を持つことがわかっている。光化学系ではこのような超複合体構造と機能の関係は明確に解明されていない。また、光化学系複合体は効率的に光を集めるため、多様に進化したアンテナを結合している。アンテナは効率のよい光捕集に非常に重要であるが、光化学系との超複合体は

植物や緑藻の研究が主で、シアノバクテリアや他の藻類でのアンテナと光化学系の関係には未知の点が多い。

私は、光化学系複合体の超分子構造と機能の関係を明らかにすることを目指した。これまでの研究では、光化学系複合体が個別の生物から単離・精製されてきたため、手法や生物のちがいに、多様性や統一性について十分な理解が得られていなかった。そこで本研究では、光化学系複合体の超分子構造の解析手法を確立し、多様な生物間で比較し、その機能に迫った。

一章では系 II 複合体の構造を、結晶構造が決定されている好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を用いて、blue-native 電気泳動 (BN-PAGE) により再検討した。BN-PAGE はタンパク質複合体を単離・精製することなく、複合体構造を調べることができる方法である。少量のサンプルで分析でき、多数のサンプルの比較にも適している。また泳動に界面活性剤を必要としないため、より穏やかな条件で分離できると期待される。界面活性剤ドデシルマルトシドによるチラコイド膜の可溶化条件を BN-PAGE で調べたところ、系 II は二量体と単量体の二つの構造で存在しており、その量比はチラコイド膜の可溶化濃度により変動した。つまり、低濃度の界面活性剤で可溶化すると、単量体が多く二量体は少ないのに対し、高濃度の界面活性剤で可溶化すると、単量体が減少し、二量体が増加した。これは高い濃度の界面活性剤で複合体が解離されやすくなるという通説に反している。すでに決定されている結晶構造によれば、単量体同士の接着面には脂質分子も存在しているので、この脂質のドデシルマルトシドへの置換が二量体の安定化につながったと解釈できる。また、二量体の境界面に存在する PsbTc、PsbM サブユニットの破壊株では、二量体が減少した。これらの結果は、チラコイド膜では PsbTc や PsbM などのサブユニットとともに脂質が単量体間の接着に関わっていることを示している。系 II の二量体構造はその活性に必須ではないが、安定化に必要なものとして進化的に保存されていると考えられる。

二章では、系 I 複合体の超分子構造を生物間で検討した。これまで「系 II は、シアノバクテリアから植物の全てで二量体、系 I はシアノバクテリアでは三量体、植物、緑藻では単量体」と信じられてきた。しかし、複合体構造は一部の種でしか調べられておらず、系 I 複合体構造の機能の違いや進化はよくわかっていない。常温性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803、糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120、シアノバクテリアに近い真核藻類である原始紅藻、灰色藻の複合体構造を系 I 三量体の結晶構造が明らかになっている好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* と比較した。BN-PAGE の結果、系 I 複合体のサイズは種によって多様であった。三量体化を阻害すると考えられるサブユニットを持たない原始紅藻の系 I は三量体ではなく、系 I 型光捕集クロロフィル複合体 (LHCI)

を結合した単量体を形成した。LHCIを持たない灰色藻の系Iは三量体でも単量体でもなく、四量体であった。また、三量体だと思われた *Anabaena 7120* の系I複合体も四量体であった。これまで、シアノバクテリアの系Iは三量体で機能していると考えられており、これは新規の構造である。系Iサブユニットのうち四量体構造に対応するものとして、PsaLおよびPsaIだけが *Anabaena* の仲間だけ特異な系統を示すことを見いだした。また、灰色藻の系I複合体が *Anabaena 7120* と同じく四量体であったことは、四量体を持つシアノバクテリアが葉緑体の祖先であることを示唆しているかもしれない。アンテナである、LHCIが出現することにより系I複合体は三量体から単量体になり、その後単量体を安定に保つために新たなサブユニットが出現したのではないかと考えられる。

BN-PAGEにより、系I複合体の構造が種によって異なることがわかった。特に、*Anabaena 7120* や灰色藻で見られた四量体構造はこれまでに報告のない新たな超分子多量体構造であった。四量体の単粒子解析を行うため、単離方法の検討を行った。ショ糖密度勾配遠心法の条件を改良することにより、系I四量体を単離することに成功した。現在、単粒子解析を行っているところである。

三章では、ショ糖密度勾配遠心法により新たに得られた、系I・フィコビリソーム超複合体の解析を行った。ショ糖密度勾配遠心法は分離媒体による希釈効果が大きいいため、界面活性剤の添加が必須であるが、電気泳動と違って溶液の組成に制限が少ないことが利点である。私はこの分離法を検討することによって、二章で述べた四量体よりもさらに大きな超複合体の単離に成功した。この超複合体は、系I複合体のサブユニットに加え、アンテナであるフィコビリソーム (PBS) の色素結合タンパク質 CpcA、CpcB とリンカータンパク質 CpcG3 を含んでいた。通常、PBS は主にフィコシアニンを結合するロッドと、アロフィコシアニンを結合するコアからなる。しかし、系I超複合体にはPBSのコアを構成するサブユニットは含まれていなかった。CpcG3はPBSのリンカータンパク質の一つであるロッドコアリンカーであるといわれているが、通常、PBSには含まれておらず、これまでCpcG3の実体は疑問視されていた。超複合体の吸収スペクトルを測定したところ、PBSのロッドの色素であるフィコシアニンの吸収が確認できたがアロフィコシアニンの吸収はなかった。低温蛍光スペクトルにより、フィコシアニンから系I複合体へのエネルギー伝達が確認できた。これらの結果から、CpcG3とフィコシアニンを含むロッドが系Iのアンテナとして機能していることが示唆された。特異的抗体により、CpcG3の局在を調べたところ、CpcG3は系Iの超複合体でのみ検出された。このことは、CpcG3が系Iの特異的アンテナであることを示している。CpcG3はC末端に疎水性の領域をもっており、それによりPBSロッドを系Iに直接結合していると考えられる。本研究により、CpcG3がロッドとコアを結合するリンカーではなく、ロッドを膜に存在するタンパク質に結合するロッド-膜リンカ

一であることが示された。そのため、CpcG3 を CpcL と命名した。先行研究において、シアノバクテリアにおける系 I 複合体の特異的アンテナとして、*Synechocystis* 6803 でも *Anabaena* 7120 と同様のアンテナの存在が示唆されている。しかし、系 I 複合体との超分子複合体は得られておらず、実体は不明であった。本研究は、光化学系と PBS の超複合体を単離した初めての例である。

*Anabaena*7120 は窒素欠乏時に、窒素固定に特化した細胞であるヘテロシストを分化させる。窒素固定を行うニトロゲナーゼは酸素に弱いため、ヘテロシストには系 II がなく嫌氣的で、系 I によりつくられる ATP によって窒素固定が進行する。そのため、ヘテロシストにおいては他の細胞よりも系 I の活性が重要であると考えられた。ヘテロシストを単離し CpcL を検出したところ、CpcL の割合が増加していることが確認された。このことは、系 I とアンテナの超複合体が窒素固定に重要な機能を持つことを示唆している。*cpcL* 破壊株、大量発現株の作製を行うことで、ヘテロシストにおける窒素固定反応へのフィコビリソームの貢献の検証を現在進めている。