

## 論文の内容の要旨

# Mechanisms of degradation and de novo synthesis of photosynthetic protein complexes in a diatom,

## *Chaetoceros gracilis*

(珪藻の光合成タンパク質複合体の分解と合成機構)

長尾遼

光合成反応は、物理化学的な光化学反応と、生化学的な酵素反応の組合せで構成されている。そのため、様々な環境条件で光合成反応の最適化やストレス防御を実現するために、複雑な光合成システムと多様な調節機構が各光合成生物で進化している。つまり、これらの光合成反応は、各光合成生物のもつ固有の光合成システムとその生物がおかれる環境条件に依存している。このような光合成システムは、これまでおもに高等植物と緑藻、シアノバクテリアを対象として詳しく研究されてきたが、地球生態系に大きな割合を占める珪藻の光合成研究は遅れていた。その理由のひとつは、チラコイド膜や光合成装置の単離に適した珪藻のモデル種の確立が遅れていたことにある。中心目の *Chaetoceros gracilis* は海洋に広く分布する優占種であり、すでに光化学系 I が単離されている。私は修士課程において、この *C. gracilis* を用いて、初めて酸素発生活性を保持した光化学系 II の単離に成功した (長尾 2008)。この標品 (以下、粗系 II 標品と略す) を分析して、新たな表在性酸素発生因子を発見した。しかし、この粗系 II 標品の酸素発生活性が非常に不安定であった。そのため、本研究では、粗系 II 標品から安定な活性を保持する標品 (以下、精製系 II 標品と略す) を単離し、両標品の比較から、タンパク質分解が失活の主要要因であると推論した (第 1 章)。さらにそのタンパク質分解酵素の局在を推定し (第 2 章)、*in vivo* での分解と合成に関する現象と比較した (第 3 章)。

第 1 章では、粗系 II 標品の精製と様々な不活性化現象について報告した。私は、*C. gracilis* から酸素発生活性を保持した粗系 II 標品の調製についてこれまでに報告している [Nagao et al., 2007]。粗系 II 標品は、多量のフコキサンチンクロロフィルタンパク質複合体 (FCP) が結合しており、また酸素発生活性が失活しやすかった。そこでまず、粗系 II 標品

を界面活性剤 Triton X-100 で再処理後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによって、精製系 II 標品を得た。この標品は、粗系 II 標品の約 2.5 倍の高い酸素発生活性 ( $\sim 2135 \mu\text{mol O}_2 (\text{mg Chl } a)^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) を示した。また、酸素発生に関わる 5 種類の表在性タンパク質 (PsbO, PsbQ', PsbV, Psb31, PsbU) を保持しており、大部分の FCP は除かれていた。この標品の色素組成は、2 分子のフェオフィチン *a* あたり、クロロフィル *a* が 42 分子、ジアジノキサントニンが 2 分子、クロロフィル *c* が 2 分子であった。分光測定の結果、典型的な系 II の吸収スペクトルや蛍光スペクトルを示した。また、粗系 II 標品を 25 °C、暗所でインキュベートすると、酸素発生活性の失活、色素の消失、そしてタンパク質のすみやかな分解がみられたが、これらの不活性化現象は精製系 II 標品ではみられなかった。さらにタンパク質分解に着目したところ、粗系 II 標品の分解は、金属型のプロテアーゼ阻害剤である EDTA とセリン型のプロテアーゼ阻害剤である PMSF により抑制された。FCP が除去された精製系 II 標品ではこうした不活性化現象がみられなかったため、このことは不活性化成分が FCP に結合していることを示唆している。

第 2 章では、単離したチラコイド膜を用いて粗系 II 標品でみられた系 II と FCP のタンパク質分解を担うプロテアーゼについて報告した。チラコイド膜を 25 °C、暗所でインキュベートすると、系 II と FCP サブユニットのすみやかな分解がみられた。また、抗体を用いたウェスタン解析によって、系 II 反応中心サブユニットの D1/D2 タンパク質のほとんどが 9 時間のうちに分解したこと、PSI 反応中心サブユニットの PsaA/B タンパク質が 24 時間かけて少しずつ分解したこと、シトクロム *f* が 24 時間後でもほとんど分解されないことが示された。これらの結果は、チラコイド膜には FCP と系 II タンパク質を選択的に分解するプロテアーゼが結合していることを示唆している。カゼインタンパク質を含むゲル中で SDS-PAGE を行う zymography によりプロテアーゼ活性の検出を試みた。チラコイド膜では、3 種の金属型と 1 種のセリン型のプロテアーゼ活性が検出された。これらのプロテアーゼの局在を調べるために、色素タンパク質複合体の分画を試みた。まず、チラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化した後、ショ糖密度勾配遠心によって、2 種の FCP 画分と 1 種の光化学系画分を得た。zymography により 4 種の金属型と 1 種のセリン型のプロテアーゼ活性が 2 つの FCP 画分から検出された。一方、チラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化した後、Clear-Native PAGE により、系 I、系 II、および 2 種の FCP 複合体を得た。このうち、1 種の金属型のプロテアーゼ活性のみが FCP 複合体から検出された。このことは、系 II や FCP のタンパク質分解を担う金属型とセリン型のプロテアーゼが FCP に結合していることを示唆している。

第 3 章では、生細胞を用いて *in vivo* でのタンパク質分解と新規タンパク質合成について報告した。通常の生育条件 ( $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) でタンパク質の分解はみられなかったが、タンパク質合成阻害剤クロラムフェニコールを添加したところ、顕著なタンパク質の分解と酸素発生活性の失活がみられた。この分解や失活は暗所ではみられず、強光 ( $300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) では著しく促進された。また、光の効果は系 II の電子伝達阻害剤

DCMUによって抑制されたが、シトクロム b6f 複合体を阻害する DBMIB によっては抑制されなかった。このことは、タンパク質分解がプラストキノン付近の酸化還元状態によって調節されていることを示唆している。この光依存タンパク質分解が生じた細胞を Blue-Native PAGE (BN-PAGE) に供し、色素タンパク質複合体の分画を試みた。その結果、系 II の二量体と FCP 複合体が選択的に分解され、一方、系 I は緩やかに分解し、別の FCP 複合体は分解されなかった。このことは、チラコイド膜で検出されたプロテアーゼが細胞内でも作用していることを示唆している。次に、放射性同位体  $^{35}\text{S}$ -メチオニンを用いて新規タンパク質合成について調べた。弱光では、系 II の D1 タンパク質の新規合成が主に検出された。さらに、二次元 SDS-PAGE の銀染色による系 II の二量体の量が単量体に比べ多いにもかかわらず、放射性同位体の導入量は両者で変わらなかった。このことは、珪藻においても系 II の D1 タンパク質の速い代謝回転が起きていることを示している。一方、系 I のタンパク質の合成は遅いが、系 II の他のタンパク質や FCP タンパク質の合成は比較的速いことが示された。この結果は珪藻固有であり、FCP にプロテアーゼが結合していることと関連があると考えられる。一方、暗所にも関わらず系 II の二量体の形成がみられた。これは、光依存タンパク質分解に備えるために、暗所での系 II 合成を行っていると考えられる。

本研究では、まず、系 II と FCP の分解がすみやかに進行し、その分解を担う金属型とセリン型のプロテアーゼが FCP に結合していることを示唆した。系 II と FCP の優先的なタンパク質分解と合成が *in vivo* の光合成装置の維持に重要な役割を果たしていることを示した。これらの結果から、珪藻の光合成装置の維持機構が植物やシアノバクテリアと似ているが、FCP とプロテアーゼが大きな役割を果たしている点で珪藻はユニークな光合成生物であると推論される。なお、電子伝達阻害剤のタンパク質分解への効果から、タンパク質分解がプラストキノン付近の酸化還元状態によって制御されていることが示唆された。珪藻は、過剰光散逸機構としてキサントフィルサイクルの存在は確認されているが、ステート遷移については確認されていない。*C. gracilis* のように沿岸付近で生育している珪藻には、波などにより生じる急激な光変動に耐えうる機構が必要となる。珪藻には、過剰光による PSII の過還元状態を検知すると、系 II と FCP を分解し、水分解反応を抑制する機構が備わっているのかもしれない。この特別な環境適応能力のおかげで、珪藻は様々な環境下で繁栄し、水域圏において優占種になりえたのかもしれない。