

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名：長尾 遼

珪藻は海洋生態系において、主要な物質生産をする光合成生物であるが、これまでは、生態学的研究が主で、生化学や分子生物学の研究は非常に少ない。提出者は修士課程において、中心目珪藻 *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 標品（以下、粗系 II 粒子と略す）の単離に成功している。さらに、この標品を分析して、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 粒子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 粒子から安定な活性を保持する標品（以下、精製系 II 粒子と略す）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、まず粗系 II 粒子を精製した。界面活性剤 Triton X-100 によってチラコイド膜を可溶化し、遠心分画して粗系 II 粒子を単離した。これを再度 Triton X-100 処理した後、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 粒子を得た。これは、粗系 II 粒子の約 2.5 倍の高い酸素発生活性を示し、酸素発生に必要な 5 種類の表在性タンパク質（PsbO, PsbQ', PsbV, Psb31, PsbU）を保持していた。一方、粗系 II 粒子に大量に含まれていたフコキサンチン・クロロフィル *a/c* タンパク質（FCP）は除かれていた。粗系 II 粒子を暗所でインキュベートすると、酸素発生活性の急速な失活、フコキサンチンやクロロフィル *c* などの色素の消失、そして系 II タンパク質のすみやかな分解がみられた。一方、精製系 II 粒子ではこれらの急速な不活性化や消失、分解現象はみられなかった。粗系 II 粒子のタンパク質分解への阻害剤の効果を調べ、EDTA（金属型のプロテアーゼ阻害剤）と PMSF（セリン型のプロテアーゼ阻害剤）が強く抑制することを見いだした。以上の結果は、粗系 II 粒子の不安定化要因は Triton X-100 処理による精製ステップで除去されたことを示唆しており、要因として少なくとも金属型とセリン型プロテアーゼが推定された。色素のブリーチや酸素発生活性の失活の直接原因は不明であるが、速く分解されるタンパク質にその原因があるかもしれない。

第 2 章では、系 II タンパク質を分解するプロテアーゼの同定を目指した。1 章の粗系 II 粒子のプロテアーゼの検出が難しかったので、チラコイド膜を用いた。チラコイド膜を暗所でインキュベートし、系 II タンパク質と FCP アポタンパク質のすみやかな分解を確認した。また、特異抗体を用いたウエスタン解析によって、系 II 反応中心の D1/D2 タンパク質が 9 時間のうちに分解し、系 I 反応中心の PsaA/B タンパク質は 24 時間かけてゆっくり分解したが、シトクロム *f* がほとんど分解しなかった。このようなチラコイド膜における系 II や FCP のすみやかな分解は、粗系 II 粒子の分解とよく似ている。カゼインタンパク質を含む SDS ゲル電気泳動で分離後、カゼインの分解によって、プロテアーゼ活性の検出を試みた（zymography）。さらに EDTA と PMSF による阻害と組み合わせることで、チラコイド膜では、3 種の金属型と 1 種のセリン型プロテアーゼ活性を検出した。これらのプロテアーゼの局在を調べるために、チラコイド膜をドデシルマルトシドで可溶化しショ糖密度勾配遠心によって分画した。その FCP 画分を zymography 分析して、4 種の金属型と 1 種のセリン型のプロテアーゼ活性を検出した。また、チラコイド膜をド

デシルマルトシドで可溶化しネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分画した後、zymography 分析して、FCP 画分に 1 種の金属型のプロテアーゼ活性を検出した。これらの結果は、チラコイド膜に大量に含まれる FCP は系 II から遊離しやすい主要 FCP と系 II に強く結合した FCP に分けられ、後者には数種のプロテアーゼが結合していることを示しており、そのプロテアーゼが系 II や FCP タンパク質の分解を引き起こすことを示唆している。また、このようなチラコイド膜のプロテアーゼは 1 章でみた FCP を結合した粗系 II 粒子のタンパク質分解と相関があるかもしれない。

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を解析した。通常生育の弱光条件では酸素発生活性の失活やタンパク質分解は見られなかった。しかし、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、弱光下でも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。これらの分解や失活は暗所ではみられず、強光では著しく促進された。これはタンパク質の光傷害と修復過程を反映しており、他の植物と比べて非常に弱い光 ( $30 \mu \text{mol photons/m}^2 \text{ sec}^{-1}$ ) によって引き起こされる特徴がある。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、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プール付近の酸化還元状態によって調節されている可能性を示唆している。このようなクロラムフェニコール添加の光依存失活過程の細胞タンパク質をブルーネイティブ・ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した。その結果、系 II の二量体は速やかに単量体に変換され、やがて FCP とともに選択的に分解された。一方、系 I は緩やかに分解し、別の FCP 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、弱光でも、系 II の D1 タンパク質や他の系 II タンパク質や FCP の合成は比較的速いことが示された。これら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。

以上、本研究では、珪藻の粗系 II 粒子の不安定要因を精製により除くとともにタンパク質分解が重要な原因であることを示し (1 章)、チラコイド膜を用いて系 II や 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 画分に結合していることを示唆した (2 章)。生細胞を用いて、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唆した。これらの結果は、従来まったく知られていなかった珪藻の光化学系 II の阻害や分解・修復に関して独自のアプローチで重要な知見を得たところに、その研究の意義を認められる。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。