

# 学位審査報告書

新制
人
115

(ふりがな)	こやま こうへい
氏名	小山 公平
学位(専攻分野)	博士(人間・環境学)
学位記番号	人博 第 468 号
学位授与の日付	平成21年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	人間・環境学研究科 関連環境学専攻
(学位論文題目)          <div style="text-align: center;">                     Characterization of the photosynthetic                      electron transfer chain of a                      cyanobacterium <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC                      7421: Spectroscopic and biochemical                      studies                      (シアノバクテリア <i>Gloeobacter violaceus</i>                      PCC 7421 の光合成電子伝達系に関する分光                      学・生化学的研究)                 </div>	
論文調査委員	主査 教授      三室 守 副査 教授      田村 類 副査 教授      畑 安雄 副査 教授      鹿内 利治

氏名	小山 公平
----	-------

(論文内容の要旨)

<骨子> 本学位申請論文は、地球大気に初めて酸素をもたらした光合成生物であるシアノバクテリアのエネルギー代謝系に関する基本的な性質を明らかにしようとする意図された研究の成果である。シアノバクテリアには、光合成系と呼吸系という2種類のエネルギー代謝系が存在し、それらは電子伝達系として一部の成分を共有することが知られている。この相互関係を明らかにすることが本論文の骨子である。

<構成> 本論文は5章から構成される。第1章は序論であり、問題点の提示がなされている。第2章は、光合成を駆動する光エネルギーの獲得のための光合成色素系、特にシアノバクテリアに特有の光捕集超分子集合体であるフィコビリソームの成分分析と形態に関する研究である。第3章は、エネルギー代謝の基本となる電子の供給源である酸素発生系に関する、構造生物学的、細胞生物学的研究である。第4章は、光合成系と呼吸系の電子伝達系の相互関連、特にふたつの経路からの電子の供給・移送に関する生理学的研究である。第5章では、研究全体を通しての問題点の整理、データの統合的解釈、今後の問題点の提示を行っている。

<各章の要旨> 第1章では、光合成系と呼吸系の電子伝達系の相互関連を探索することの意義と、解析に最適な試料の選択が論じられている。多くのシアノバクテリアでは光合成系の活性が呼吸系のそれを圧倒的に上回るために、相互の関連を解明するには適さない。そこで、本学位申請論文申請者は、従来ほとんど研究の対象として使われることのなかった種 *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 を適合種として選択し、解析を進めることとした。この種は、チラコイド膜がなく、細胞膜上に、光合成系と呼吸系が共存するというシアノバクテリアとしては唯一の特異な性質を示す種であり、解析に適していることが明示された。

第2章では、*G. violaceus* のフィコビリソームから、2種の新しいタンパク質成分を単離・同定し、超分子集合体の構造維持に関する機能を明らかにした。2003年に明らかにされたこの種的全ゲノム情報と他のシアノバクテリアのフィコビリソーム構成成分との比較から、機能未知のタンパク質が存在することを推論し、それらを単離したフィコビリソーム中に発見した。2種の新しいタンパク質成分のアミノ酸配列を決定した結果、予想されたとおりに新規の成分であることが判明し、それらを CpeG、CpeJ と名づけた。さらに、それらの集合体中での局在性を明らかにすることによって、超分子構造体のユニット間を接合する機能を持つことを明らかにした。1973年に電子顕微鏡観察に基づいて発表されていたこの種のフィコビリソームの特異的な構造を支える因子が同定され、シアノバクテリアのフィコビリソーム形態に新しいモデルを加えることとなった。

第3章では、*G. violaceus* の水分解系で機能する3種の表在性タンパク質のアミノ酸配列の特異性に基づき、構造-機能相関を考察し、さらに酸素発生活性を測定することにより、機能の特異性の有無を解析した。その結果、特異的なアミノ酸配列は、構造的には有意な変異をもたらす可能性が高いものの、機能の変異が観測されないことから、酸素発生型光合成生物で高度に保存されている水分解反応過程に、従来はまったく考えられていなかった安定化過程、機構が存在する可能性を示した。この実体は現時点では明らかにされていないが、従来の酸素発生系の概念を大きく変えることになった。

氏名	小山 公平
----	-------

第4章においては、*G. violaceus* について、光合成系と呼吸系の電子伝達成分と其中での電子流量を解析し、相互関係を細部にわたり明らかにした。まず、電子伝達成分に関して、KCN 不感受性の酸素吸収（呼吸）成分が存在すること、さらに光合成電子伝達阻害剤である 3-(3,4)-dichlorophenyl-1,1-dimethyl urea (DCMU) に不感受性の酸素発生（光合成）成分が存在すること、というふたつの現象を明らかにし、他のシアノバクテリアではその存在さえも判然としない電子伝達成分が存在することを明示した。その上で、細胞を様々な生理条件化で維持した後の電子伝達活性を時間分解蛍光法で測定した結果、呼吸系の電子流量が他のシアノバクテリアと比較して 20 倍以上も大きいこと、電子伝達系の主要な構成成分であるプラストキノンの酸化還元レベルの決定に重要な役割を担うこと、光合成電子伝達系の酸化還元平衡反応において他のシアノバクテリアには存在する成分が観測されないこと、を明らかにした。これらの事実は、ふたつの電子伝達系の経路、流量、などが他のシアノバクテリアと大きく異なり、相互連関を得るのに適した材料であることを再確認する結果を与えた。

第5章では、*G. violaceus* の電子伝達系の特異性が総括的に論じられ、また今後の問題点が明らかにされた。光化学反応の基礎となる電子供与側と電子受容側について、前者の保存性の高さや後者の変異の大きさが明示された。前者に関してはアミノ酸配列が異なる成分が機能するにも関わらず、その反応系は保存されていた。一方、後者に関しては、電子伝達成分、その流量の両面において大きな変異が観測された。反応系の構築原理という観点から考察すると、生物の反応系としては異常に高い酸化電位を要求する電子供与側（水の分解反応）は変異を受け入れる余地がないが、0 V 付近の中位の電位を持つ電子受容側は多少の変異があっても、調整が可能な範囲での変異であるという原則が確認されることになった。今後の問題点として、*G. violaceus* の電子伝達系の実体の精査と、他の種との比較検討による普遍性の確認が必要であることが指摘された。

以上、5章にわたり、特異なシアノバクテリア *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 のエネルギー代謝系に関する解析と考察が展開された。

氏名	小山 公平
----	-------

(論文審査の結果の要旨)

<審査の内容> 本学位申請論文に関して、研究内容と結果の解釈の妥当性、当該研究領域での意義、当該研究領域の進展への寄与、の3点を中心として、審査を行った。

<研究内容と結果の解釈の妥当性> シアノバクテリアにおける光合成系と呼吸系の関連性を考察するために、この研究領域では、従来、ほとんど解析の対象とならなかった種、*Gloeobacter violaceus* PCC 7421 を適合種として選択したことは評価できる。この種については2003年に全ゲノム情報が明らかにされており、その点でも優位に研究を推進できることは明白であった。しかし、この種についての形質転換の方法論が確立していない現状では、解析に限度があることも研究を始める時点で明白であったはずであり、その点が十分に考察されたとは判断できないという問題点があった。

第2章の主題であった光捕集性超分子集合体であるフィコビリソームにおける新しいタンパク質の発見、同定、機能解析は、ゲノム情報に強く依拠したものではあるものの、この種が持つ特異な形態のフィコビリソームを維持する因子の発見であり、他のシアノバクテリアで見られる類似のタンパク質との系統性をも考察し、関連性にも言及するもので、評価できる。結果の解釈も妥当である。

第3章では、酸素発生系で機能する3種の表在性タンパク質に関する解析と考察を行っている。特に、この種では、他のシアノバクテリアで見られる同種タンパク質とのアミノ酸配列の差が顕著であり、それに起因する高次構造の差、さらに機能との関連が重要な問題となる。実際に結晶を得て、構造解析を行うのではなくモデル構造の構築による推定を行わざるを得ない状態ではあるが、反応中心タンパク質との相互作用が、他のシアノバクテリアの場合とは大きく異なるという推論は妥当である。一方、実験において証明された酸素発生反応の保存性の高さと同種タンパク質のアミノ酸配列の異なりとは必ずしも整合しない。そこで、学位申請論文申請者によって提唱された従来とは異なる機構による水分分解系の安定化が、可能性として大きく取り上げられることは妥当であるが、検証が不十分であることは否めない。これに反して、アミノ酸配列として大きな変化が見られない電子受容(還元)側での反応性の違いは、この種の電子伝達系の重要な特徴として捉えることができるが、その実態が必ずしも明らかではない。この点の証明も必要と考えられるが、実験による証明には至っていない。この課題は引き続き第4章で論じられることとなった。

第4章で申請者は、第3章で明らかにした光化学系IIの還元側での電子伝達反応の違いを、実験によって証明することを意図している。電子伝達成分に関して、KCN不感受性の酸素吸収(呼吸)成分が存在すること、さらに光合成電子伝達阻害剤である3-(3,4)-dichlorophenyl-1,1-dimethyl urea (DCMU) に不感受性の酸素発生(光合成)成分が存在すること、というふたつの現象を明らかにしたことは新事実の発見であり、評価に値する。しかし、時間分解蛍光法を用いた電子伝達系の速度論についての解析は、体系的に遂行されたものではなく、かつ、結果の解釈にも不明確な点が残っており、十分な考察がなされたとは言えない。

氏名	小山 公平
----	-------

第5章では、第2章から4章までに得た実験結果に基づき、光合成電子伝達系の構築原理に言及するなど、広い視野に立った論述を行い、この研究の意義を述べている。論調は事実の説明が多く、また、光合成系でのこの研究の意義に関しては限定的な記述に留まるために、やや不十分との評価もできるが、単なる推論を行うことではなく、具体的に検証可能な事項を指摘していることは、実験科学者としての態度として評価に値する。

〈本学位申請論文の当該研究領域での意義〉 シアノバクテリアにおける光合成系と呼吸系の関連は、酸素発生型光合成生物に一般的に見られることではなく、葉緑体の分化が起こっている真核光合成生物には見られない現象であるために、時として本質的な問題とは考えられないままに見過ごされてきた課題である。しかし、本論文で論じられたように、光合成エネルギー変換過程の極めて本質的な原理をも照準に入れた解析が可能であり、具体的な課題をいくつか実験的に証明したことは、当該研究領域に大きな意義を与えたものと評価できる。

〈当該研究領域の進展への寄与〉 本論文にある研究課題は、シアノバクテリアが光合成の研究材料として用いられるようになった1950年代から既に知られていたのであるが、実質的な進展はほとんどなかった。1996年以降、シアノバクテリアのいくつかの種について全ゲノムが明らかにされた後も、考慮されることはほとんどなく、いわば副次的な反応系との認識が研究者の間にあったが、エネルギー変換過程の本質的な装置である電子伝達系の基本原理について考察するのに適した事項であったことが、本論文の内容を通して明らかとなった。その意味で、この研究領域の進展への貢献は大であると評価できる。

〈論文内容の公表の現状と予定〉 本論文の第2章、第3章の内容は既に国際的学術誌に掲載されている。その他にも関連論文が2編、国際的学術誌に掲載されている。第4章の内容に関しては現在、学術誌への投稿を準備している段階である。

〈結論〉 以上の結果を総合して、本論文は、自然と人間の調和的な共生を可能とする新しい科学・技術及び社会システムの在り方を目指している相関環境学専攻分子・生命環境論講座の研究にふさわしい内容を備えたものと判断できる。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。平成21年1月22日に論文内容と関連する学術的知識等について試問を行った結果、合格と認めた。