

氏名	むら かし けい こ 村 上 怜 子
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 48 号
学位授与の日付	平成 17 年 7 月 25 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	生命科学 研究科 統合生命科学 専攻
学位論文題目	酸素発生系 PsbO タンパク質の機能と発現の解析

論文調査委員 (主査) 教授 佐藤文彦 教授 河内孝之 教授 山本憲二

### 論 文 内 容 の 要 旨

光化学系Ⅱの構成タンパク質である PsbO は、酸素発生型光合成に重要な働きをもつタンパク質の 1 つであり、これまで高等植物では *in vitro* で解析が進められてきた。申請者は、本研究において、PsbO の量的質的な変化が、高等植物の個体レベルで光合成にどのような影響をもたらすかを明らかにすることを試みた。具体的には、*psbO1* および *psbO2* の 2 つの遺伝子をもつシロイヌナズナにおいて PsbO 変異株の単離を行い、PsbO の機能を *in vivo* で解析した。

クロロフィル蛍光を指標として選抜された高蛍光変異株のうち Fo 値の上昇するタイプの変異体から、光化学系Ⅱに異常が生じた変異体を選抜し、シロイヌナズナ *psbO1* 遺伝子欠損突然変異株 (*psbO1*) を単離・同定した。*psbO1* は、高等植物におけるはじめての PsbO 変異体であり、その解析から、同株においては PsbO タンパク質総量の低下、さらには、光化学系Ⅱの活性低下および生育の遅延が起こることを明らかにした。さらに、*psbO1* 欠損株の詳細な解析から、PsbO 蓄積量と、光化学系Ⅱの最大活性 (Fv/Fm)、光化学系Ⅱの他の構成タンパク質蓄積量の間にはよい相関があることを示し、PsbO の蓄積の制御が、光化学系Ⅱの活性の制御に重要であることを示した。

一方、シロイヌナズナのもう 1 つの PsbO 遺伝子 *psbO2* 欠損株についても T-DNA 挿入変異株より単離し、その表現型を検討した。解析の結果、*psbO2* 欠損株の示す表現型は *psbO1* 欠損株のそれに比べ著しく弱いものであり、野生型における PsbO2 の発現量が、PsbO1 に比べ顕著に少ないことに対応していることが明らかとなった。しかし、生育初期には、*psbO2* 欠損株においても光合成活性の低下が観察され、この時期には、PsbO 蓄積の絶対量が光化学系Ⅱの活性を左右することを明らかとした。

引き続き、PsbO1 と PsbO2 の機能的差異を明らかとするため、*in vitro* 再構成系を用いた実験を行なった。その結果、PsbO1 ならびに PsbO2 の示す光化学系Ⅱへの結合親和性は等しいが、再構成した光化学系Ⅱにおける酸素発生活性は PsbO2 を用いて再構成した場合の方が PsbO1 より低く、両 PsbO タンパク質には機能的な差異があることを明らかとした。さらに、両タンパク質の質的な差違をもたらしているアミノ酸残基の決定を行ない、両タンパク質の活性の差は C 末端に存在する V186S, V204I, L246I の 3 つのアミノ酸変化が複合的に影響するためであることを明らかにした。

以上の研究の結果、PsbO は *in vivo* においても光化学系Ⅱの活性制御に重要な役割を果たしており、その絶対量が重要であること、また、シロイヌナズナの *psbO* 遺伝子はともに必要であり、両者には発現制御とともに機能的差違があることを明らかにした。さらに、両 PsbO の機能的差違が 1 アミノ酸残基の変化で起こることを明らかにし、PsbO の改変により光合成活性を変化させる可能性を示唆した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

PsbO は、光化学系Ⅱ酸素発生系の重要な構成タンパク質である。緑藻では従属栄養的培養が可能であるため、PsbO 欠損株が単離され、その光独立栄養における必須性が明らかになっていたが、高等植物では PsbO 欠損株の単離は困難と考え

られ、*in vitro*での機能解析が主に行なわれてきた。本研究では、*psbO1*と*psbO2*の2つの*psbO*遺伝子をもつシロイヌナズナからPsbO変異株の単離を行い、PsbOの機能を*in vivo*で解析するとともに、両タンパク質の機能解析を行なったものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

1) クロロフィル蛍光を指標として選抜した高蛍光変異株のうちFo値の上昇するタイプの変異体から、光化学系IIに異常が生じた変異体を単離し、*psbO1*に変異が生じたシロイヌナズナ変異株を同定している。これは、高等植物におけるPsbO変異株のはじめての単離である。

2) *psbO2*の発現により部分的にPsbOを蓄積する*psbo1*株の解析から、PsbO蓄積量と、光化学系IIの活性(Fv/Fm)、他の光化学系II構成タンパク質蓄積量の間にはよい相関があることを示している。この結果から、PsbOの蓄積量の制御が、光化学系IIの活性を律速している可能性を示している。

3) T-DNA挿入変異株から、シロイヌナズナのもう1つのPsbOコード遺伝子*psbO2*欠損株を単離し、その表現型を*psbO1*欠損株と比較し、*psbO2*欠損株の示す表現型は*psbO1*欠損株のそれに比べ著しく弱く、この違いは、野生型におけるPsbO2の発現量が、PsbO1に比べ顕著に少ないことに対応していることを明らかにしている。さらに、生育時期の影響を詳細に解析し、*psbO2*欠損株でも、生育初期には光合成活性の低下が起こることを観察し、この時期におけるPsbO蓄積量の重要性、ならびにPsbOの絶対量が光化学系IIの活性を律速することを明らかにしている。PsbO蓄積量と光化学系IIの蓄積の関係は、*in vitro*の解析からはわからなかった点であり、興味深い。

4) PsbO1とPsbO2の機能的差異を明らかとするため、*in vitro*再構成実験を行ない、両タンパク質の光化学系IIへの結合親和性は等しいが、酸素発生活性への寄与はPsbO2の方が低く、機能的な差異があることを明らかにしている。

5) 変異組換えタンパク質を用いた詳細な解析から、酸素発生活性を変化させるアミノ酸残基を3つ決定し、PsbO2の機能低下はこれらのアミノ酸置換の複合的な影響であることをはじめて明らかにしている。さらにPsbOのアミノ酸残基の置換により、PsbOの機能の改変が可能であることも示唆している。

以上の結果は、我々の生存に不可欠な光合成酸素発生系の重要な構成タンパク質PsbOの機能解明に重要な知見を与えるものであり、植物分子生理学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成17年5月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(生命科学)の学位を授与される学力が十分にあるものと認めた。