

氏名	いわ た たつ や 岩 田 達 也
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学位記番号	人 博 第 161 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 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	人間・環境学研究科環境相関研究専攻
学位論文題目	Mutational Analysis of the Role of the PsbL Subunit in Photosystem II Complex (変異導入による光化学系 II 複合体の PsbL サブユニットタンパク質の機能解析)
論文調査委員	(主査) 教授 松井正文 助教授 加藤 真 助教授 瀬戸口浩彰 教授 豊島喜則(立命館大学)

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、植物葉緑体に存在する光合成光化学系 II (PS II) 複合体中での光誘起電子移動に対する PsbL サブユニットタンパク質の役割とその生理的意義を扱ったもので、まず第 1 章では研究の背景を紹介している。

葉緑体の PS II は 23 種類のサブユニットから構成されるが、それらの大部分は機能が分かっていない。この中で、PsbL は、*in vitro* 再構成実験によって、光化学反応中心 (P_{680}) の酸化側電子移動に関与していることが示唆されていたが、その生理的意義は明らかではなかった。また、生体中でも同じ機能を担っているかについての検証はなされていなかった。本研究では、PsbL の機能を *psbL* 欠失変異体の作製と *in vitro* 再構成法を組み合わせることで検討することにより、PS II 酸化側電子移動に関する PsbL タンパク質の役割とその分子機構ならびに生理的意義を明らかにし、その内容を第 2, 3, 4 章で報告している。

第 2 章では、*psbL* 遺伝子欠失変異体タバコの作製とその電子移動挙動の解析結果が報告されている。遺伝的に安定な *psbL* 遺伝子欠失ホモ変異体タバコの作成に初めて成功し、この変異体が光独立栄養的には生育しないが、グルコース存在下では生育することを明らかにした。しかし、グルコース存在下でも、変異体は野生株に比べて生育が極端に遅く、また、クロロフィル含有量は野生株の 1/3~1/5 であり、成葉は薄い緑色を示した。さらに、PAM (パルス増幅変調法) によるクロロフィル蛍光測定から、この変異体の成葉中には光誘起電子移動活性を持った PS II 複合体は存在しないことを明らかにした。これらの事実は、PsbL が、PS II 複合体の光誘起電子移動に必須の構成成分であることを示している。抗 D1 抗体を用いたウェスタン解析から、PS II のコアを形成する D1 タンパク質は野生株の 1/2 以上存在していることを示し、PsbL が PS II 複合体の形成あるいは電子移動調節のいずれかに必須のサブユニットであることを確認している。

第 3 章では、PsbL が PS II 酸化側の電子移動調節因子として作用している可能性を示唆した先行研究の成果を踏まえ、*in vitro* 再構成法により PsbL の機能解析をした結果が報告されている。強光下では、過剰な電子移動反応のため、チラコイド膜内側 (ルーメン) の pH が極端に低くなり、それに伴い、PS II の水分解活性が減少することが知られていた。 P_{680} の酸化側電子移動の pH 依存性を EPR 法により調べた結果、この原因が光酸化を受けた $P_{680}(P_{680}^+)$ とその第一電子供与体である Y_D 間の電子移動 ($P_{680}^+ \rightarrow Y_D$) 活性の pH 依存性に起因していることを見出した。さらに、この pH 依存性に PsbL が関与していることを明らかにした。すなわち、正常の PS II 複合体では、pH 上昇に伴い、酸化側の電子移動により生ずる Y_D のラジカル生成量が 2 段階 (pK4.5 と pK6.5) で増加するが、PsbL 欠損複合体では、pK4.5 の成分が消失した。この結果から、PsbL は $P_{680}^+ \rightarrow Y_D$ の pK4.5 成分に必須であり、ルーメンの pH に応答して酸化側電子移動を調節する因子であると結論している。また、PsbL の部位特異的変異体を用いた再構成実験から、PsbL の C 末端側にある Y^{34} がこの機能に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。

第 4 章では、前章の結果に基づいて Y^{36} (葉緑体 PsbL の Y34 に相当) に着目し、*psbL* に部位特異的変異を導入したラ

ン藻を作成し、その電子移動挙措の解析を行っている。ラン藻の PsbL 欠損変異体は通常、光独立栄養条件下では生育しないが、 $Y^{36} \rightarrow L$, $Y^{36}FF \rightarrow LLL$ はともに光独立栄養条件下で生育した。酸素発生活性は、 $Y^{36}FF-LLL$ では野生株の約 1/2 に活性が減少し、 Y^{36} を含む PsbL の C 末端側の酸化側電子移動への関与が示唆されたが、酸素発生活性の pH 依存性に対する $Y^{36}FF-LLL$ 変異の影響は認められなかった。ラン藻にはチラコイド膜内外のプロトン勾配に応答した PS II 電子移動制御機構の存在は知られていないことと合わせて、PsbL がルーメンの pH に応答して酸化側電子移動を調節する機構はラン藻から葉緑体への進化の過程で獲得されたものであろうと推測している。

最後に第 5 章で、上述の研究結果に基づく結論が述べられている。

論文審査の結果の要旨

酸素発生型光合成生物の水分解機能を担う光化学系 II 複合体 (PS II) の構造と機能の解明に向けた研究は現在植物生理学分野の重要な研究課題の 1 つとなっている。光合成反応のエネルギー源である光は、同時に、複合体の損傷 (光阻害) を引き起こすため、植物の光合成はこれを防ぐいろいろな仕組みを備えている。その中で光強度に応じて電子移動の効率を調節する機能の存在が指摘されているが、その実体は明らかにされていない。

本学位申請論文は、植物の PS II での電子移動調節に対する PsbL サブユニットの関与を検討した結果を報告したものである。PS II は 23 種類のサブユニットから構成され、この内、PsbL は、*in vitro* 再構成実験から、光化学反応中心 (P_{680}) の酸化側電子移動に関与していることが示唆されていたが、その生理的意義は明らかではなかった。本研究では、PsbL の機能を *psbL* 欠失変異体の作製と *in vitro* 再構成法を組み合わせて検討し、PS II 酸化側電子移動に関する PsbL タンパク質の役割とその生理的意義を明らかにしている。本論文は 5 章から成り、第 1 章ではこの研究に関わるこれまでの諸研究の成果と問題点に触れ、当該研究の動機付けと目的が述べられている。第 2, 3, 4 章で申請者の研究成果が報告されており、第 5 章で全体の結論が記述されている。

第 2 章では、遺伝的に安定な *psbL* 遺伝子欠失ホモ変異体タバコを作成し、その電子移動挙措を解析した結果を報告している。光独立栄養的には生育しないこの変異体を、グルコース存在下で従属栄養的に生育させることに成功している。葉緑体遺伝子の形質転換は極めて困難であり、PS II 構成タンパク質への変異導入の最初の成功例である本研究は、その点からも高く評価できる。PAM (パルス増幅変調法) によるクロロフィル蛍光測定から、この変異体の成葉中には光誘起電子移動活性を持った PS II は存在しないこと、従って、PsbL が、PS II の光誘起電子移動に必須の構成成分であることを証明している。抗 D1 抗体を用いたウエスタン解析から、PS II のコアを形成する D1 タンパク質が存在していることを示し、PsbL が PS II の複合体形成あるいは電子移動調節のいずれかに必須のサブユニットであることを確認している。これらの結果は、生体中での PsbL の機能を確認したものとして、高く評価できる。

第 3 章では、*in vitro* 再構成法により PsbL の機能解析をした結果が報告されている。強光下では、過剰な電子移動反応のため、チラコイド膜内側 (ルーメン) の pH が極端に低くなり、それに伴い、PS II の水分解活性が減少することが知られていた。この知見を踏まえ、 P_{680} の酸化側電子移動の pH 依存性を EPR 法により調べた結果、その原因が光酸化を受けた $P_{680}(P_{680}^+)$ とその第一電子供与体である Y_D 間の電子移動 ($P_{680}^+ \rightarrow Y_D$) 活性の pH 依存性にあること、さらに、この pH 依存性に PsbL が関与していることを明らかにした。正常の PS II では、 $P_{680}^+ \rightarrow Y_D$ 活性は 2 段階 (pK4.5 と pK6.5) の pH 依存性を示すが、PsbL 欠損複合体では、pK4.5 の成分が消失した。この結果から、PsbL は $P_{680}^+ \rightarrow Y_D$ の pK4.5 成分に必須であり、ルーメンの pH に応答して酸化側電子移動を調節する因子であると結論している。さらに、PsbL の部位特異的変異体を用いた再構成実験から、PsbL の C 末端側にある Y^{34} がこの機能に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この発見は、PS II 光応答電子移動調節機構の実体を最初に提出したものとして高く評価できる。

第 4 章では、前章の結果に基づいて Y^{36} (葉緑体 PsbL の Y^{34} に相当) に着目し、*psbL* に部位特異的変異 ($Y^{36} \rightarrow L$ と $Y^{36}FF \rightarrow LLL$) を導入したラン藻を作成し、その電子移動挙措の解析を行っている。水分解活性は、 $Y^{36}FF-LLL$ では野生株の約 1/2 に活性が減少し、 Y^{36} 酸化側電子移動への関与を示したが、水分解活性の pH 依存性に対する変異の影響は認められなかった。ラン藻にはチラコイド膜内外のプロトン勾配に応答した PS II 電子移動制御機構の存在は知られておらず、PsbL が pH に応答して酸化側電子移動を調節する機構はラン藻から葉緑体への進化の過程で獲得したものであろうと推測

している。

以上、本研究の成果は、PSⅡにおける光応答電子移動調節機構に対し、最初の分子論的実体を提出したものであり、すでに国際的にも高い評価を受け、今後のこの分野の研究に新たな展開を与えるものであると言える。

本申請者が所属する環境相関研究専攻生物環境相関論講座の目的の1つは、生命現象と環境の相関を分子レベルで追求していくことにあり、本研究は、この目的に沿ったものと言える。

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。また、平成14年2月8日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。