

京都大学	博士（生命科学）	氏名	西村太志
論文題目	緑色植物型光化学系 II 超複合体における PsbP タンパク質の相互作用と分子機能		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>光合成における水分解酸素発生反応は、葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系 II（PSII）の内腔側に結合した Mn クラスターによって触媒され、その周囲には酸素発生系（OEC）タンパク質と呼ばれる膜表在性サブユニットが結合している。OEC タンパク質の組成は葉緑体の祖先であると考えられているシアノバクテリアと、高等植物や緑藻といった緑色植物で異なる。緑色植物が進化の過程で獲得した PsbP タンパク質は PSII 活性調節において重要な役割を担うと考えられているが、緑色植物型 PSII 複合体の詳細な構造はこれまで報告されておらず、PsbP の PSII への結合様式は未解明のままであった。一方、最近の化学架橋と質量分析を用いた解析から、PsbP は複数の PSII 膜内在性サブユニットと相互作用することが示されたが、それらの相互作用が PSII の構造や機能に及ぼす影響についても未解明であった。本研究は PsbP の PSII 複合体への結合様式や、その相互作用が PSII の構造と機能に及ぼす影響を解明することを目的とし、ホウレンソウを主たる材料として研究した。</p> <p>第 1 章では、PsbP の PSII との静電相互作用に関わる残基を同定するため、PsbP の分子表面の塩基性ポケットを構成する Arg48, Lys143, Lys160 に着目し、それらの残基を置換した変異型 PsbP の機能評価を PSII 膜 <i>in vitro</i> 再構成系にて行った。その結果、Arg48, Lys143, Lys160 の置換により PsbP の PSII への結合能が顕著に低下すること、また、塩基性ポケットを変異した PsbP は正常な Mn クラスター周辺の構造変化を誘導せず、PSII における Cl⁻保持能も低下することを認め、PsbP 分子表面の塩基性ポケットが PSII との機能的な相互作用に重要であることを明らかとした。また、最近明らかになった、電子顕微鏡解析による PSII-LHCII 超複合体の構造を参考にして、緑色植物型 PSII 複合体における PsbP の結合様式について考察した。</p> <p>第 2 章では、化学架橋実験で見出された PsbP の N 末端を介した Cyt <i>b</i>₅₅₉ α サブユニット (PsbE) との相互作用が PSII の構造と機能に及ぼす影響を解析するため、組換え PsbP タンパク質に加え、PsbP の N 末端配列を模したペプチド pN15 の再構成がホウレンソウ PSII 膜に及ぼす影響を解析した。Cyt <i>b</i>₅₅₉ の酸化還元差スペクトル測定により、PsbP の N 末端を介した相互作用が Cyt <i>b</i>₅₅₉ のレドックスポテンシャルの調節に重要であること、また、pN15 は全長の PsbP と同様に PsbE と相互作用し、Cyt <i>b</i>₅₅₉ のストロマ側での構造変化を伴うレドックスポテンシャルの変化を引き起こすことを示唆した。加えて、pN15 は水の酸化側に対して阻害的であることを示し、Cyt <i>b</i>₅₅₉ を介する PSII 副次的電子伝達の活性化に関連している可能性を示唆した。以上の結果より、PsbP の相互作用に伴う、PSII 内部の電子伝達の制御機構について考察した。</p> <p>第 3 章では、PsbP の生理的役割を <i>in vivo</i> で解析するために、緑藻クラミドモナスの PsbP 欠損株である BF25 株を材料とし、PsbP 機能相補系の構築を試みた。BF25 株における変異部位を明らかとするとともに、クラミドモナス野生株の核ゲノムにコードされる <i>psbP</i> 遺伝子、あるいは、C 末端に 6xHis タグ配列を付加した PsbP を導入することで PSII の活性や光独立栄養条件における生育が回復することを認めた。一方、N 末端 15 残基を欠失した PsbP-Δ15 の導入による PSII 活性や生育の回復は部分的であった。また、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより、PSII-LHCII 超複合体の精製に成功した。以上の結果より、PsbP の N 末端配列が <i>in vivo</i> での光合成に重要であること、また PsbP が PSII-LHCII 超複合体に安定的に結合していることを示唆した。</p> <p>以上、PsbP の PSII 複合体への結合様式や、その相互作用が PSII の構造と機能に及ぼす影響を解明するとともに、クラミドモナスにおいて PsbP 機能相補系を確立し、PsbP の機能解析や構造解析を行う上での有用な実験系を確立した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

光合成における水分解酸素発生反応は、葉緑体チラコイド膜に存在する光化学系 II (PSII) の内腔側に結合した Mn クラスターによって触媒され、その周囲には酸素発生系 (OEC) タンパク質と呼ばれる膜表在性サブユニットが結合している。緑色植物が進化の過程で獲得した OEC タンパク質のひとつ PsbP タンパク質は PSII 活性調節において重要な役割を担うと考えられているが、PsbP の PSII への結合様式は未解明のままであった。一方、最近の化学架橋と質量分析から、PsbP は複数の PSII 膜内在性サブユニットと相互作用することが示され、それらの相互作用が PSII の構造や機能に及ぼす影響が示唆されたが、その詳細は未解明であった。本研究は PsbP の PSII 複合体への結合様式や、その相互作用が PSII の構造と機能に及ぼす影響を解明することを目的とし、ハウレンソウを主たる材料として研究したものであり、以下のような成果を挙げている。

1) PsbP の分子表面の塩基性ポケットを構成する Arg48, Lys143, Lys160 を置換した変異型 PsbP の機能評価を *in vitro* 再構成系にて行い、Arg48, Lys143, Lys160 の置換により PsbP の PSII への結合能が顕著に低下すること、また、これらの変異した PsbP は正常な Mn クラスター周辺の構造変化を誘導せず、PSII における Cl⁻ 保持能も低下することを認め、PsbP 分子表面の塩基性ポケットが PSII との機能的な相互作用に重要であることを明らかとした。

2) 化学架橋実験で見出された PsbP の N 末端を介した Cyt *b*₅₅₉ α サブユニット (PsbE) との相互作用を解析するため、組換え PsbP タンパク質に加え、PsbP の N 末端配列を模したペプチド pN15 の再構成能を検討し、PsbP の N 末端を介した相互作用が Cyt *b*₅₅₉ のレドックスポテンシャルの調節に重要であること、また、pN15 は全長の PsbP と同様に PsbE と相互作用し、Cyt *b*₅₅₉ のストロマ側での構造変化を伴うレドックスポテンシャルの変化を引き起こすことを示唆した。加えて、pN15 は水の酸化側に対して阻害的であることを示し、Cyt *b*₅₅₉ を介する PSII 副次的電子伝達の活性化に関連している可能性を示唆した。

3) PsbP の生理的役割を *in vivo* で解析するために、緑藻クラミドモナスの PsbP 欠損株である BF25 株における変異部位を明らかとするとともに、クラミドモナス野生株の核ゲノムにコードされる *psbP* 遺伝子、あるいは、C 末端に 6xHis タグ配列を付加した PsbP を導入することで PSII の活性や光独立栄養条件における生育が回復すること、一方、N 末端 15 残基を欠失した PsbP-Δ15 の導入による PSII 活性や生育の回復は部分的であることを明らかにした。また、His タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーにより、PSII-LHCII 超複合体の精製に成功した。

以上、PsbP の PSII 複合体への結合様式や、その相互作用が PSII の構造と機能に及ぼす影響を解明するとともに、クラミドモナスにおいて PsbP 機能相補系を確立し、PsbP の機能解析や構造解析を行う上での有用な実験系を確立したものであり、光合成 PSII の構造と機能の分子機構ならびに機能について極めて有用な知見を与えるものであった。以上、植物生命科学に関する高度で幅広い学識、植物光化学分野における優れた研究能力、そして植物生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されているとともに、論理的かつ一貫性をもって記述されていることから、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 29 年 1 月 23 日 論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第 8 条の規定により、猶予期間は学位授与日から 3 ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日