

京都大学	博士（生命科学）	氏名	井戸 邦夫
論文題目	高等植物光化学系 II 酸素発生系 PsbP タンパク質の分子機能解析		
（論文内容の要旨） 光合成における水分解酸素発生反応はチラコイド膜に存在する光化学系II（PSII）のチラコイド膜内腔側に結合するMnクラスターにより触媒される。Mnクラスター周辺には酸素発生系タンパク質（OECタンパク質）と呼ばれる表在性タンパク質が結合しており、緑色植物（高等植物と緑藻）の葉緑体ではPsbO, PsbP, PsbQから構成されている。in vitro再構成系を用いた解析から、PsbPは水分解酸素発生反応に必須な無機因子であるCa²⁺とCl⁻の保持に関わっていること、またPsbQは主にCl⁻の保持に関わることが明らかとなっている。本研究では緑色植物がPsbPとPsbQをもつ意義を明らかにするため、発現抑制により植物の生育が顕著に遅延することが示されているPsbPに注目して、より詳細な分子機能解析を行った。 第1章ではPsbPのin vivoにおける機能を明らかにするため、PsbPの発現をRNAi法によって抑制したタバコ（PsbP-RNAi株）を用いて、PsbPの発現抑制がPSII複合体の形成・蓄積に及ぼす影響を解析した。その結果、PsbP-RNAi株では集光アンテナであるLHCIIと結合した活性型PSIIであるPSII-LHCII超複合体の蓄積が顕著に減少しているが、PSII 2量体は安定して蓄積していることが明らかになった。さらに、PsbP-RNAi株のPSIIでは、酸素発生を行うPSII酸化側に加えて、PSII還元側における電子伝達活性が阻害されていることが明らかとなった。すなわち、PsbPが高等植物のPSIIにおいて、その構造と機能の活性化に必要であることが明らかとなった。 第2章では機能がこれまで明らかにされていないPsbPのC末端側ドメインの役割を解析した。ハウレンソウPsbPの結晶構造解析で推定されていたZn²⁺結合アミノ酸（His144とAsp165）をそれぞれAlaとValに置換したPsbP（H144AとD165V、およびその2重変異体）を、in vitro再構成系において解析した結果、H144A変異体ではPSIIの機能的相補が不完全であり、2重変異で回復することを認めた。さらに、PsbPのPSII内での結合サイトおよび結合トポロジーを、化学架橋剤を用いて解析した結果、PsbPはPSIIの膜内在性サブユニットPsbE（Cyt <i>b₅₅₉</i> αサブユニット）と直接相互作用していること、PsbPのN末端とPsbEのGlu57が架橋されていること、His144/Asp165周辺の構造がPsbPとPsbEの相互作用に重要であることが明らかとなった。 第3章ではPsbPと他のPSIIサブユニットとの機能的な関係について調べるため、PSIIの相互作用に関わっており、PsbEの近傍に位置することが示唆されているPSIIサブユニットPsbRの機能について解析した。シロイヌナズナPsbR欠損株では野生株と同程度のPsbPが蓄積しており、生育にも違いは認められなかったが、光照射下におけるPSII還元側の電子伝達が阻害されるなどタバコPsbP-RNAi株に類似した表現型を示した。またPsbR欠損株のチラコイド膜では、野生株に比べてPsbPが解離しやすい傾向を認めた。 以上、本研究によってPsbPがin vivoにおける活性型PSIIの安定した蓄積に必要であること、そのPSII内での結合サイトと結合トポロジーが明らかとなった。これらの結果を踏まえて、PsbPがPSIIとLHCIIの相互作用において果たす役割、およびシアノバクテリアと高等植物のPSIIアンテナ構造の違いとの観点から、PsbPが獲得された意義を考察した。			

(論文審査の結果の要旨)

光合成は、植物の最も重要な機能の1つであり、生命の源である。本研究は、光合成における水分解酸素発生反応を構成する光化学系 II (PSII) の Mn クラスター周辺に存在する酸素発生系タンパク質 (OEC タンパク質) の構成因子である PsbP タンパク質の生理的機能とその構造的特性について、PsbP の発現を抑制した形質転換植物体 (PsbP-RNAi 株) を用いた解析、PsbP の変異型タンパク質を用いた再構成実験による解析、さらには、PsbP の安定性に寄与すると示唆される PsbR 変異体を用いた解析を行った結果をまとめたものであり、以下のような知見をえている。

- 1) PsbP-RNAi 株では、集光アンテナである LHCII と結合した活性型 PSII である PSII-LHCII 超複合体の蓄積が顕著に減少するが、PSII 2 量体は安定して蓄積していることを明らかにし、PsbP が PSII-LHCII 超複合体の形成の制御に関与することを明らかにしている。
- 2) PsbP-RNAi 株の PSII では、酸素発生を行う PSII 酸化側に加えて、PSII 還元側における電子伝達活性が阻害されていることを明らかとし、PsbP が高等植物の PSII の機能の活性化に必要であることを明らかとしている。
- 3) ホウレンソウ PsbP の結晶構造解析で推定されていた Zn^{2+} 結合アミノ酸 (His144 と Asp165) をそれぞれ Ala と Val に置換した PsbP (H144A と D165V、およびその 2 重変異体) を、*in vitro* 再構成系において解析し、H144A 変異体では PSII の機能的相補が不完全であり、2 重変異で回復することを明らかにし、PsbP 機能における His144 の重要性を明らかにしている。
- 4) 化学架橋剤を用いた解析により、PsbP は PSII の膜内在性サブユニット PsbE (Cyt *b*₅₅₉ α サブユニット) と直接相互作用していること、PsbP の N 末端と PsbE の Glu57 が架橋されていること、さらには、His144/Asp165 周辺の構造が PsbP と PsbE の相互作用に重要であることを明らかとし、PsbP のチラコイド膜におけるトポロジーと結合サイトに関しての重要な知見をえている。
- 5) シロイヌナズナ PsbR 欠損株を用いた解析により、同欠損株では、野生株と同程度の PsbP が蓄積しているが、単離チラコイド膜においては、野生株に比べて PsbP が解離しやすく、タバコ PsbP-RNAi 株に類似した表現型を示すことを明らかにしている。

以上のように、本研究は、PsbP の *in vivo* における生理機能ならびに、PSII 内での局在性について、重要な知見を明らかとし、高等植物における光合成の分子機能の解明に貢献したものである。従って、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。

また、平成 24 年 10 月 5 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。

要旨公開可能日： 年 月 日