

氏 名	お ざわ しんいちろう 小 澤 真 一 郎
学位(専攻分野)	博士 (人間・環境学)
学 位 記 番 号	人 博 第 16 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 人 間・環 境 学 専 攻
学位論文題目	光合成光化学系Ⅱ複合体における電子移動調節 ——PSⅡ-L タンパク質の役割——

論文調査委員	(主 査) 教 授 豊 島 喜 則	教 授 池 永 満 生	教 授 竹 安 邦 夫
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

高等植物など酸素発生型の光合成系では、2種の光化学系、光化学系Ⅰ(PSⅠ)と光化学系Ⅱ(PSⅡ)がいわゆるZスキームを構成し、2段階光励起により水分子から NADP^+ へのエネルギー獲得型の電子移動が起こる。このためには、2つの光化学での反応はバランスをとって進行する必要がある、両系はそれを可能にする幾つかの環境応答型自己調節機能を備えている。本研究はPSⅡを対象として、その電子移動自己調節機能の分子機構の解明を目指したものである。

紅色光合成細菌の光化学反応中心複合体はPSⅡ複合体の原型である。しかし、前者には1種類の光化学系しか存在せず、その構造も4つのサブユニットタンパク質から成る比較的簡単なものであるのに対し、PSⅡ複合体は20種類以上のサブユニットから構成されている非常に複雑な超分子複合体である。PSⅡ複合体に結合している数多くの電子伝達系は全てD1/D2ヘテロダイマーに局在しているが、それだけでは完全な複合体で起こる正常な光励起電子移動($Z \rightarrow P_{680} \rightarrow \text{pheo} \rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$)が観測されない。この事実は、他のサブユニットの幾つかが電子移動調節に関与している可能性を示している。

本研究では、まずPSⅡ複合体での電子移動が正常に起こるために必要なサブユニットの同定を行った。全てのサブユニットを含む完全な複合体を葉緑体チコライド膜から単離し、それを可溶化剤で処理することにより、D1/D2/CP47/Cytb-559/Iサブユニット複合体(コアー複合体)を調製した。このコアー複合体では光励起による $P_{680} \rightarrow \text{pheo}$ への電子移動は起こるがその前後の電子移動は起こらない。そこで、可溶化剤処理により遊離したサブユニットタンパク質を単離精製後、コアー複合体に再構成する手法により、正常な電子移動に必須のサブユニットの同定を目指した。最初に再構成条件を検討し、75%の電子移動活性回復率を与える再構成法の開発に成功した。次いで、遊離させた各タンパク質の単離精製に成功し、それらを用いた再構成実験から、分子量5.0 KDaのPSⅡ-Lタンパク質のみがコアー複合体に正常な電子移動活性を回復させるに必須の成分であることを見出した。このことから、PSⅡ複合体における電子移動調節にPSⅡ-Lが重要な働きをしていることが明らかになった。

次に、電子移動調節における PSII-L の作用部位についての解析を行った。結晶構造解析の行われた光合成細菌の光化学反応中心での知見から、PSII 中での各電子伝達体のおよその位置が予想できる。一方、PSII-L の一次構造のハイドロパシープロットから複合体内での構造がある程度分かっている。これらの情報をもとにすれば、PSII-L に変異を与えることで、電子伝達に関与する PSII-L のアミノ酸残基を特定できれば、PSII-L が電子伝達のどのステップに直接関与しているかが推定できる。そこで、大腸菌を用いた PSII-L の大量発現系を開発し、それを利用して PSII-L の変異体を調製し、それらをコアー複合体に再構成することにより、電子伝達に関与するアミノ酸残基の特定を目指した。一般に、膜タンパク質の大量発現は困難であるが、これをマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させた後、PSII-L を切り出し、精製することに成功した。大量発現させた PSII-L は植物から単離したのと同じ電子移動回復活性を示した。この大量発現系を用いて、複合体中で 5 つの電子伝達体、即ち Z, P₆₈₀, pheo, Q_A, Q_B の位置に相当すると推測される PSII-L 上の 5 箇所のアミノ酸残基をそれぞれ他のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し、それらをコアー複合体に再構成させたところ、PSII-L のカルボキシル末端 (C 末端) に隣接した Tyr/Phe/Phe をいずれも Leu に置換した変異体のみが正常な電子移動活性を回復させる機能を失った。PSII-L はその C 末端側に貫通型 α ヘリックスを 1 本持っており、それを介して複合体に結合していると推測される。その配置が正しいとすれば、C 末端側に存在する Tyr/Phe/Phe の位置は複合体中の Z 結合部位に相当している。PSII 複合体での初発の電荷分離は光励起された P₆₈₀ から pheo への電子移動によって起こる。Z はその結果生じた P₆₈₀+カチオンラジカルを直接還元する電子伝達体で、その本体は D1 タンパク上の Tyr₁₆₁ である。これは P₆₈₀ の酸化側で P₆₈₀ と水分解酵素系を繋ぐ位置にあり、酸素発生意型光合成生物に特有のものである。本研究の結果から、PSII-L はその C 末端側で Tyr₁₆₁ と相互作用して、それに電子伝達体としての機能を付与し、Z → P₆₈₀+電子移動ステップを調節する役割を担っていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

光合成生物の出現は原始地球環境を大きく変化させ、現在の環境を創り出したが、その過程において、環境の変化を感知し、分子レベルで自らを最適化する機構を獲得してきた。酸素発生意型光合成電子伝達系の持つ環境応答性自己調節機能はその典型的な例である。酸素発生意型光合成生物は 2 種の光化学系、光化学系 I (PSI) と光化学系 II (PSII) を持つことにより、2 段階光励起による水分子から NADP⁺ へのエネルギー獲得型の電子移動を可能にした。その一方で、2 つの光化学系での反応がバランスをとって進行する必要が生じ、両系はそれを可能にする幾つかの環境応答型自己調節機能を備えざるを得なくなった。本研究は PSII を対象として、その電子移動自己調節機能の分子機構の解明を目指したものである。

1 種類の光化学系しか持たない紅色光合成細菌の場合、その光化学反応中心複合体の構成タンパク質は 4 つの比較的少数であるのに対し、そこから進化したと考えられている PSII 複合体は 20 種以上のサブユニットからなる非常に複雑な超分子複合体である。PSII 複合体に結合している数多くの電子伝達体は全て D1/D2 ヘテロダイマーに局在しているが、それだけでは完全な複合体で起こる正常な光励起電子移動 (Z → P₆₈₀ → pheo → Q_A → Q_B) が観測されない。この事実から、光合成細菌には存在しない他のサブユ

ニットタンパク質の幾つかが電子移動調節に関与していることが想像できる。これが本学位申請者の研究の出発点である。

本学位申請論文は3章からなり、第1章ではこの研究題目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章では、PSII 複合体での電子移動が正常に起こるために必須なサブユニットタンパク質の同定を行った結果が述べられている。全てのサブユニットを含む完全な複合体を葉緑体チラコイド膜から単離し、それを可溶化剤により D1/D2/CP47/Cytb-559/I サブユニット複合体（コアー複合体）にまで解体した。このコアー複合体では、光励起による $P_{680} \rightarrow \text{pheo}$ への電子移動は起こるがその前後の電子移動は起こらない。そこで、可溶化剤により遊離させたサブユニットタンパク質を単離精製後、それらをコアー複合体に再構成し、正常な電子移動に必須のサブユニットの同定を行った。まず、超分子複合体の機能的再構成における困難な課題を克服し、75%の電子移動性回復率を与える再構成法の開発に成功している。次いで、遊離させた各タンパク質の単離精製に成功し、それらを用いた再構成実験から、分子量5.0 KDa の PSII-L タンパク質のみがコアー複合体に正常な電子移動活性を回復させるに必須な成分であることを見出し、PSII 複合体における電子移動調節に PSII-L が重要な働きをすることを明らかにしている。

第3章では、電子移動調節における PSII-L の作用部位についての解析結果が述べられている。結晶構造解析の行われた光合成細菌の光化学反応中心での知見から、PSII 中での各電子伝達体のおよその位置は予想できる。一方、PSII-L の一次構造のハイドロパシブロットから複合体内での構造がある程度分かっている。そこで、PSII-L に変異を与えることで、電子伝達に関与する PSII-L のアミノ酸残基を特定し、PSII-L が電子伝達のどのステップに直接関与しているかを推定しようとした。まず、その為に必要の大腸菌を用いた PSII-L の大量発現系を開発した結果が報告されている。一般に、膜タンパク質の大量発現は困難であるが、これをマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させた後、PSII-L を切り出し、精製することに成功している。さらに、大量発現させた PSII-L が植物から単離したのと同じ電子移動回復性を示すことを確認している。次いで、この大量発現系を用いて、5つの電子伝達体、即ち Z, P_{680} , pheo, Q_A , Q_B の複合体中での位置に相当すると推測される PSII-L 上の5箇所のアミノ酸残基をそれぞれ他のアミノ酸残基に置換した変異体を作成し、それらをコアー複合体に再構成して電子移動活性の測定を行った。その結果、PSII-L のカルボキシル末端（C 末端）に隣接した Tyr/Phe/Phe をいずれも Leu に置換した変異体のみが正常な電子移動活性を回復させる機能を失うことを見出している。PSII-L はその C 末端側に膜貫通型 α ヘリックスを1本持っており、その α ヘリックスを介して複合体に結合しているので、C 末端側に存在する Tyr/Phe/Phe の位置は複合体中の Z 部位に相当している。PSII 複合体での初発の電荷分離は光励起された P_{680} から pheo への電子移動によって起こる。Z はその結果生じた $P_{680} + \text{カチオンラジカル}$ を直接還元する電子伝達体で、その本体は D1 タンパク質上の Tyr₁₆₁ である。本研究の結果は、PSII-L はその C 末端近くに位置する Tyr と Phe のいずれかで Tyr₁₆₁ と相互作用し、Tyr₁₆₁ に電子伝達体としての機能を付与することにより、 $Z \rightarrow P_{680} +$ の電子移動ステップを調節する役割を担っていることを示している。Z は酸素発生型光合成電子伝達鎖に特有のもので、 P_{680} の酸化側に位置し P_{680} と水分解酵素系を繋いでいる。 P_{680} の還元側の電子移動は紅色光合成細

菌の光化学反応中心と類似しており、それとの比較からその構造と機能がある程度推測できるが、酸化側の知見は極めて限られている。本研究の成果は酸化側の機能について全く新しい知見を与えたものであり、今後の研究に大きな影響を与えるものと期待できる。成果は既に国際学的学術誌に発表されており、国際的にも高い評価を受けている。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値のあるものと認める。平成9年2月5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。