

学 位 論 文 題 名

シアノバクテリアとシロイヌナズナの形質転換株を用いた、
色素タンパク質の可塑性に関する研究

学位論文内容の要旨

光合成生物は、集光装置を用いて光合成に必要な光を捕集している。集光装置は、反応中心周辺に存在する中心集光装置と、その周囲に存在する周辺集光装置に分けられる。中心集光装置は、クロロフィル *a* タンパク質複合体で構成されており、その色素組成はどのような環境でも一定である。一方、周辺集光装置は様々な色素で構成されており、周囲の環境に応じて、その集光装置全体の大きさを変えることが知られてきた。集光装置における色素組成、特に色素の配置は集光装置の機能に重要な役割を果たしている。集光装置内における正しい色素配置は、吸収したエネルギーを、反応中心に効率良く伝達するために必要である。このため、集光装置における色素の配置は、非常に厳密に決定されていて変化しないと考えられてきた。

しかし、周辺集光装置の色素配置は、環境光の強度の変化に対する適応、強光ストレスの回避のために可塑的に変化することが明らかになってきた。また、クロロフィル *b* 欠損変異体は、クロロフィル *b* を補うために、クロロフィル *a* だけで周辺集光装置を構成することが知られている。

本研究は、中心集光装置の色素配置も、周辺集光装置と同じように可塑性を持つことを、シアノバクテリアの遺伝子導入株を用いて、初めて明らかにした。シアノバクテリアの1種である *Synechocystis* sp. PCC6803 は、クロロフィル *a* で中心集光装置を、フィコビリんで周辺集光装置を構成している。私は、このシアノバクテリアに、高等植物のクロロフィル *b* 合成酵素であるクロロフィリド *a* オキシゲナーゼ (CAO) を導入した形質転換株を作製した。クロロフィリド *a* オキシゲナーゼは、クロロフィリド *a* を基質としてクロロフィリド *b* を合成することが知られている。CAO を導入したシアノバクテリアは、クロロフィル *b* を合成することができた。このクロロフィル *b* 合成形質転換株は、生育初期から対数増殖期にかけて、クロロフィル全体の1.4~10.6%のクロロフィル *b* を蓄積した。そして、この株のクロロフィルタンパク質複合体を非変性条件の SDS-PAGE で分離、解析したところ、クロロフィル *b* の大部分が光化学系 I の中心集光装置と結合していた。さらに、蛍光スペクトルの測定も行い、この形質転換株で合成されたクロロフィル *b* のほとんど全てが、色素タンパク質と結合していたことを明らかにした。また、光化学系 I と II の励起スペクトルから、光化学系 I の集光装置に取り込まれたクロロフィル *b* が、吸収したエネルギーをクロロフィル *a* に伝達していたことを明らかにした。以上の結果は、形質転換株内で合成されたクロロフィル *b* が中心集光装置、その中でも、主に光化学系 I の中心集光装置である PsaA/B に取り込まれ、集光色素として機能することを明らかにした。さらに、中心集光装置がクロロフィル *b* を取り込むことができるということを、緑藻のクラミドモナスを用いて明らかにした。このように、光化学系 I の中心集光装置が、可塑的に異なる色素を結合できることが明らかになった。この後、他のグループの報告により、光化学系 II の中心集光装置もクロロフィル *b* が結合可能であることが明らかになり、ほぼ全ての色素結合タンパ

ク質が、異なる色素を結合するポテンシャルを持つことが示された。

申請者は、クロロフィル *b* を結合した光化学系 I を精製し、この光化学系 I の吸収スペクトルをさらに解析することで、クロロフィル *b* が、光化学系 I のある特定の吸収スペクトルを持つクロロフィル *a* と置換していることを明らかにした。これは、集光装置が異なる色素をランダムに取り込むのではなく、ある特定のポケットを用いて色素を取り込むことを示していた。また、スペクトル解析と SDS-dodecyl- β -D-maltoside PAGE を用いて、クロロフィル *b* を結合した光化学系 I が構造変化を引き起こすことを明らかにした。そして、吸収スペクトル解析の結果より、構造変化に関与している領域を推定し、シアノバクテリアの光化学系 I の性質と構造解析の情報を結びつけることができた。

以上の結果は、色素系が多様化する前に存在していた光合成生物が、進化の過程で新しい色素を獲得する機構を、初めて実験室で再現できたことを示している。光合成生物は、新しい色素を獲得するときに、色素結合タンパク質も同時に獲得したのではなく、既存の色素タンパク質を用いて、一時的な新規色素タンパク質を作り、その後、その色素を特異的に結合できるタンパク質を合成していったことを示唆している。

このように、中心集光装置のタンパク質がクロロフィル *b* を結合できることが明らかにされたが、自然に存在しているクロロフィル *b* を持つ光合成生物は、クロロフィル *b* のほとんど全てを周辺集光装置の色素として利用しており、中心集光装置にはクロロフィル *b* が存在しない。このことは、中心集光装置と周辺集光装置における色素の分配制御が行なわれていることを示している。植物において、クロロフィル *b* は Light harvesting complex (LHC) と呼ばれる周辺集光装置を構成するタンパク質に結合している。クロロフィル *b* の LHC への局在は、クロロフィル *b* 合成酵素である CAO によって行なわれることが考えられたため、LHC を持たないシアノバクテリアの 1 種である *Prochlorothrix hollandica* の CAO (PhCAO) をシロイヌナズナのクロロフィル *b* 欠損株内で発現させて、この形質転換株の解析を行った。

この結果、PhCAO を導入したシロイヌナズナの変異株 (*PhCAOI*) は非常に高いクロロフィル *b* 合成量を示したが、クロロフィル *a/b* 結合タンパク質の量は、野生株と変わらなかった。次に、野生株と *PhCAOI* のクロロフィルタンパク質複合体を分離、解析したところ、*PhCAOI* の光化学系 I、II 両方のクロロフィル *a* タンパク質にクロロフィル *b* が結合していた。また、野生株の中心集光装置の PsaA/B や CP43/47 は高いクロロフィル *a/b* 比を示し、周辺集光装置の LHCII は低いクロロフィル *a/b* 比を示したのに対し、*PhCAOI* の各クロロフィル結合タンパク質におけるクロロフィル *a/b* 比は、全て低い値を示した。このように、高等植物の集光装置も可塑的にクロロフィル *b* を結合することが明らかになった。そして、これらの結果は集光装置におけるクロロフィル *b* の分配には、クロロフィル *b* 合成酵素である CAO が関与することを示していた。

以上の研究結果は、中心集光装置の可塑性と、この可塑性が持つ重要性を明らかにした。また、集光装置における色素の分配機構の存在を示し、このメカニズムの一端を明らかにしたと考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中	歩
副査	教授	原	登志彦
副査	助教授	皆川	純
副査	助教授	山崎	健一

学位論文題名

シアノバクテリアとシロイヌナズナの形質転換株を用いた、 色素タンパク質の可塑性に関する研究

陸上植物を含む光合成生物は、様々な色素を用いて光を捕捉し、光合成を行なっている。この色素間のエネルギー伝達は、色素のエネルギー準位依存的に行なわれる。クロロフィルは色素タンパク質に取り込まれたとき、様々なエネルギー準位をとり、色素タンパク質から光化学反応中心へのエネルギー勾配を作ると考えられている。このため、色素タンパク質中の色素の空間的な配置は正確に決定されている。

本研究では、シアノバクテリアとシロイヌナズナの色素合成系の形質転換株を用いて、色素タンパク質中の色素の配置と、その光吸収とエネルギー伝達における性質について、分光学的、生化学的な解析を行った。

本研究は、シアノバクテリアのクロロフィル *b* 合成株を用いた、クロロフィル *a* 結合タンパク質に関する解析結果を示した前半部と、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 過剰合成株を用いた解析結果を示した後半部に分かれている。

前半部では、クロロフィル *a* とフィコビリンを主要な集光色素として利用しているシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 合成酵素であるクロロフィル *a* オキシゲナーゼ (CAO) を導入して、クロロフィル *b* を合成する形質転換株を作製し、この株の解析を行った。非変性の電気泳動を用いて、この形質転換株で合成されたクロロフィル *b* が光化学系 I、II のクロロフィル *a* タンパク質に結合していたことを明らかにした。さらに、励起スペクトル測定によって、クロロフィルタンパク質に結合したクロロフィル *b* が光の捕集とエネルギー伝達に寄与していることを示した。また、光化学系 I においては、クロロフィルタンパク質に結合したクロロフィル *b* が、光化学系 I 全体の分光学的特性や、高次構造に大きな影響を与えていることを、吸収スペクトル解析と非変性の電気泳動を用いて明らかにした。

これらの解析結果から、色素タンパク質が、可塑的に様々な色素を結合し、光の捕集に利用するポテンシャルを持つことを明らかにした。また、クロロフィルタンパク質中のク

クロフィル分子種の違いが、光化学系 I 全体に大きな影響を与えることを証明した。

後半部では、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 過剰合成株を用いて、高等植物の色素タンパク質も、シアノバクテリアと同様に可塑的な性質を持つことを明らかにした。

原核緑藻 *Prochlorothrix hollandica* の CAO を、シロイヌナズナのクロロフィル *b* 欠損株に導入して得られた *PhCAOI* 変異株は、非常に高いクロロフィル *b* 蓄積量を示した。野生株と *PhCAOI* のクロロフィルタンパク質のクロロフィル *a/b* 比を調べたところ、野生株では、色素タンパク質の種類によってクロロフィル *a/b* 比は大きな差を示したが、*PhCAOI* のクロロフィルタンパク質はどれも低いクロロフィル *a/b* 比を示していた。また、この結果は精製したチラコイド膜、光化学系 I-LHCI 複合体、LHCII タンパク質の吸収スペクトル、蛍光スペクトルの測定結果からも支持された。すなわち、高等植物のクロロフィルタンパク質も、本質的にはシアノバクテリアと同様に可塑性を持つことが明らかになった。これまで、高等植物のクロロフィルタンパク質の可塑的な性質は、*in vitro* の実験を代表とした間接的な方法で証明されてきたが、本研究は、初めて直接的な方法で高等植物のクロロフィルタンパク質の可塑性を明らかにしたことになる。

高等植物のクロロフィルタンパク質におけるクロロフィル *a/b* 比の変化が、クロロフィルタンパク質に与えた影響を調べるために、*PhCAOI* の LHCII タンパク質を分光学的に詳細に解析した。*PhCAOI* の LHCII は、野生株のものに比べてクロロフィル *b* を多く結合しており、吸収スペクトル、カーブアナリシスの結果もこの状態を反映するスペクトルを示した。しかし、77K で測定した蛍光スペクトルは *PhCAOI* の LHCII の蛍光スペクトルの 730nm 付近に新しい蛍光成分が出現したことを示していた。さらに、LHCII 全体のクロロフィルが吸収した光エネルギーの何割かが、この蛍光成分の原因のクロロフィル分子に伝達されていることが示唆された。*PhCAOI* では、LHCII の蛍光スペクトルのピークに対して、730nm の蛍光成分が相対的に大きくなったことから、中心集光装置へのエネルギー伝達に何らかのロスが生じている可能性を示唆していた。

本研究は、色素タンパク質の理解において、生物種に関係なく、色素タンパク質は色素を可塑的に結合するポテンシャルを持つことを明らかにした。また、この発見により、色素タンパク質中の色素の配置が、タンパク質のアフィニティーによって決められているのではなく、何らかの能動的な制御メカニズムによって決定されている可能性が示唆された。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（地球環境科学）の学位を授与される資格を有するものと判定した。