

氏名	吉岡 美保		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	理学		
学位授与番号	博甲第4149号		
学位授与の日付	平成22年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	Quality control of Photosystem II: the role of FtsH proteases under light stress and moderate heat stress (光合成光化学系 II の品質管理：光・熱ストレス下での FtsH プロテアーゼの役割)		
論文審査委員	教授 山本 泰	教授 高橋裕一郎	教授 沈 建仁

### 学位論文内容の要旨

高等植物の光合成光化学系 II 複合体は、葉緑体 DNA にコードされた反応中心結合タンパク質 D1 および D2, アンテナクロロフィル結合タンパク質 CP43 および CP47, シトクロム  $b_{559} - \alpha, \beta$  サブユニット, 核 DNA にコードされた PsbO, P および Q などから構成されており, 光エネルギーを利用して水を酸化しプラストキノン還元する。光ストレス下では主に D1 タンパク質が損傷を受け, 光合成能が低下する。損傷 D1 タンパク質は速やかに分解され, この分解過程にはチラコイド膜に存在するプロテアーゼの関与が示唆されている。本研究では, (1) 熱ストレス下での D1 タンパク質の分解における FtsH プロテアーゼの関与について, および (2) チラコイド膜における FtsH プロテアーゼの分布とサブユニット構造について解析した。

(1) ホウレンソウのチラコイド膜に 40°C, 30 分の熱ストレスを与えると, D1 タンパク質が DE-loop で切断された断片が生じた。しかし, チラコイド膜を 2M KSCN で処理したチラコイドでは熱処理をしても D1 タンパク質の分解が見られなかったことから, D1 タンパク質の分解に関わるプロテアーゼが KSCN 処理でチラコイドから遊離したことが示唆された。KSCN 処理上清についてプロテアーゼ活性の有無を調べたところ, Zn と ATP で活性化される約 77kDa の金属プロテアーゼが見出され, VAR2 (FtsH2) 抗体を用いたウエスタン分析で, それが FtsH プロテアーゼであることを確認した。また, チラコイド膜の MALDI-TOF mass 解析では, 70-80kDa 領域に *Arabidopsis* FtsH8 プロテアーゼを同定した。更に, KSCN 処理上清画分を用いた再構成実験で, 熱ストレス下での D1 タンパク質の分解を確認した。以上の結果から, 熱ストレス下における D1 タンパク質の分解には FtsH が関与していることが示唆された。活性型 FtsH は六量体リング構造をもち, ストロマチラコイド上で D1 の分解を行うと考えられてきたが, チラコイド膜における FtsH の分布や D1 を分解するメカニズムはまだ不明である。そこで次に, FtsH プロテアーゼの存在状態について解析を進めた。

(2) Clear-native PAGE でチラコイド膜での FtsH のサブユニット構成を調べると, 単量体 : 二量体 : 六量体 = 1.5 : 1 : 2 であった。これに対して PSII 膜では, 活性型の六量体 FtsH のみが存在していた。六量体 FtsH は 2 タイプのサブユニットから形成されていて, その構成比は, タイプ A (FtsH1/5) : タイプ B (FtsH2/8) = 1 : 2 であることが示されている。タイプ A サブユニットに反応する抗体 (DS9) とタイプ B サブユニットに反応する抗体 (VAR2) を用いたウエスタン分析で, 単量体で存在する FtsH はタイプ B のみで, 二量体と六量体は, タイプ A と B の両方から構成されていることが分かった。強光や熱に対する FtsH オリゴマーの安定性を調べると, 単量体や二量体はストレス下で消失したが, 六量体 FtsH はストレス耐性であった。これらの結果から, 活性型でストレス耐性を持つ六量体 FtsH プロテアーゼはグラナの光化学系 II の近傍に存在し, 損傷 D1 タンパク質の速やかな分解に関与していることが強く示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、光および熱ストレス下での光化学系 II の品質管理機構、特に D1 タンパク質の分解に関わる亜鉛依存性-、ATP 要求性-プロテアーゼ FtsH の作用機構、チラコイド膜での分布および存在状態に関する研究である。

ホウレンソウ葉緑体チラコイド膜に穏やかな熱ストレス（40℃、30分）を与えると、光化学系 II の反応中心結合タンパク質 D1 が酸化的損傷を受け分解されることを見だし、このタンパク質分解に FtsH プロテアーゼが関与することを、KSCN によるプロテアーゼの可溶化と特異抗体を用いた Western blotting による同定、ゼラチン activity gel 電気泳動によるプロテアーゼ活性の検出、再構成実験、質量分析によるプロテアーゼの同定の諸実験により示した。更に、ホウレンソウチラコイド膜をグラナ、ストロマチラコイド、グラナとほぼ同じ膜であるがグラナと調製法が異なる光化学系 II 膜、光化学系 II コアに分画し、FtsH の分布を調べた結果、FtsH がグラナに多く存在し、グラナのコアにも存在することを明らかにした。また、FtsH のオリゴマー構成を clear-native ゲル電気泳動で調べ、グラナに存在する FtsH が活性型の6量体であることを示した。この6量体型 FtsH は熱や光ストレスに対しては安定であった。光化学系 II 膜に強光を照射すると D1 タンパク質の分解が観察されたことから、FtsH は実際にグラナで作用していることを確認した。また、チラコイドに強光を照射した後にグラナを単離してグラナでの FtsH の量の変化と D1 の分解を調べたところ、強光照射でグラナに FtsH が集合し、その結果 D1 の分解も促進されることが分かった。

以上の研究結果から、FtsH プロテアーゼが強光や穏やかな熱ストレスで特異的に酸化損傷を受ける光化学系 II の D1 タンパク質の分解に関与すること、D1 の分解は従来考えられてきたストロマチラコイドなどのストロマに露出したチラコイド膜部分だけではなく、グラナでも起きることが明らかとなった。本研究は、環境ストレス下での光化学系 II の品質管理機構を解明する上で非常に大きな貢献をしたので、博士（理学）の学位に十分値すると判断する。