

氏名	大西 岳人
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4007号
学位授与の日付	平成21年 9月30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	Studies on the subunit composition and assembly of photosystem I complex in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (緑藻クラミドモナスにおける光化学系 I 複合体のサブユニット構造と分子集合の解析)
論文審査委員	教授 高橋裕一郎 教授 山本 泰 教授 沈 建仁

学位論文内容の要旨

酸素発生型光合成電子伝達系で機能する光化学系 I (PSI) は、多数のサブユニットとコファクターを含む複合体を形成し、光エネルギーを利用してプラストシアニンもしくはシトクロム c_6 からフェレドキシンへの電子伝達反応を駆動する。この PSI の反応は、集光反応、光化学反応および電子伝達反応などの多数の反応を含むが、高い効率で進行することが大きな特徴である。これまでの研究により PSI 複合体の構造と機能が明らかにされ、サブユニットやコファクターが秩序正しく配置されていることが、高い反応効率に必須であることが明らかにされてきた。しかし、このように高度な構造をもつ PSI 複合体が分子集合する分子機構の研究は遅れている。本研究では、PSI 複合体の構造と分子集合の生化学的解析を、光合成研究のモデル生物の一つである緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて行った。

まず、PSI サブユニットの中で研究が遅れている PsaN と PsaO および 9 種のアンテナ複合体 I (LHCI) サブユニットの解析を行った。化学架橋法により、これらのサブユニットの PSI 複合体における位置関係を解析した結果、PsaN と PsaF、PsaO と PsaH、PsaO と PsaL、PsaG と Lhca9、Lhca9 と Lhca2、PsaF と Lhca8、Lhca8 と Lhca4、PsaK と Lhca3、Lhca5 と Lhca6 が架橋した。すべての LHCI サブユニットの配置を明らかにすることはできなかったが、ほとんどの LHCI サブユニットは PSI 複合体の PsaG/PsaF/PsaK サブユニットが存在する領域に配置され、PsaN は PsaF と、PsaO は PsaL、PsaH と隣接することが示された。

次に、PSI サブユニットの複合体への分子集合機構を明らかにするため、この過程に必須である *ycf4* 遺伝子へ部位特異的突然変異を導入し、分子集合への影響を解析した。本研究では、*Ycf4* の保存されたアミノ酸のいくつかを特異的に置換した形質転換株を作出した。作製した形質転換株の中で、E179 と E181 を Q に置換した株は、成熟型の PSI 複合体を蓄積せず、サイズの小さい複合体を微量蓄積した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでこの複合体のサイズを調べると 150-170kDa で、700kDa の正常な複合体に比べかなり小さかった。この複合体に含まれるポリペプチドを質量分析すると、反応中心サブユニットの PsaA と PsaB のみが検出された。タンパク質のプルステイスラベル実験から、この複合体は活発に合成されるが、速やかに分解されることが分かった。この形質転換株では、PSI 複合体の初期分子集合はおこるが、分子集合が不完全であるか、もしくは後半の分子集合が阻害されたため、不安定な複合体しか分子集合されなかったと考えられる。以上の結果から、*Ycf4* は PSI 複合体分子集合の初期過程に関与すると結論した。

本研究により、緑藻クラミドモナスにおける PsaN と PsaO サブユニットの PSI 複合体における配置が明らかにされ、LHCI のサブユニットの配置が部分的に解明された。複雑な構造をもつ PSI 複合体の分子集合機構については、反応中心サブユニットの分子集合という初期過程に葉緑体にコードされた *Ycf4* が関与することが示された。

論文審査結果の要旨

本研究では、PSI 複合体の構造と分子集合の生化学的解析を、光合成研究のモデル生物の一つである緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて行った。

まず、PSI サブユニットの中で研究が遅れている PsaN と PsaO および 9 種のアンテナ複合体 I (LHCI) サブユニットの解析を行った。とくに化学架橋法により、これらのサブユニットの PSI 複合体における位置関係を解析した結果、PsaN と PsaF、PsaO と PsaH、PsaO と PsaL、PsaG と Lhca9、Lhca9 と Lhca2、PsaF と Lhca8、Lhca8 と Lhca4、PsaK と Lhca3、Lhca5 と Lhca6 が架橋した。すべての LHCI サブユニットの配置を明らかにすることはできなかったが、ほとんどの LHCI サブユニットは PSI 複合体の PsaG/PsaF/PsaK サブユニットが存在する領域に配置されて、PsaN は PsaF と、PsaO は PsaL と PsaH に隣接することが示された。

次に、PSI サブユニットの複合体への分子集合機構を明らかにするため、この過程に必須である *ycf4* 遺伝子へ部位特異的突然変異を導入し、分子集合への影響を解析した。本研究では *Ycf4* の保存されたアミノ酸のいくつかを特異的に置換した形質転換株を作出した。作製した形質転換株の中で、E179 と E181 を Q に置換した株は、成熟型の PSI 複合体を蓄積せず、微量のサイズの小さい複合体を蓄積した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーでこの複合体のサイズを調べると 150-170kDa で、700kDa の正常な複合体に比べかなり小さかった。この複合体に含まれるペプチドを質量分析すると、反応中心サブユニットの PsaA、PsaB のみが検出された。タンパク質のパルスチェイス実験から、この複合体は活発に合成されるが、不安定で速やかに分解されることが分かった。この形質転換株では、PSI 複合体の初期分子集合はおこるが、分子集合が不完全であるか、もしくは後半の分子集合が阻害されたため、安定な分子集合はおこらなかったと考えられる。以上の結果から、*Ycf4* は PSI 複合体分子集合の初期過程に関与すると結論した。

本研究により、緑藻クラミドモナスにおける PsaN と PsaO サブユニットの PSI 複合体における配置が明らかにされ、LHCI のサブユニットの配置が部分的に解明された。複雑な構造をもつ PSI 複合体の分子集合機構については、反応中心サブユニットの分子集合という初期過程に葉緑体にコードされた *Ycf4* が関与することが示された。これらに研究成果は重要な知見を提供しており、学位にふさわしいと判断される。