

博士論文審査報告書

論文題目：好熱好酸性原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* の光化学系 複合体の特徴および新規サブユニットタンパク質 Psb30 に関する研究

申請者：高橋 武志

1. 論文内容の要旨

多くの地球上の生命を支えている酸素分子は、主にチラコイド膜中に存在する光化学系（系）複合体によって生成される。これまで系 コア複合体の結晶構造が何例か報告されているが、結晶の分解能が低く、材料も実質的に原核生物の一種に限られている。

申請者は、系 複合体の構造と反応機構を原子レベルで解明することを目的に、好熱・好酸性原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* より、高純度で活性の高い系 コア複合体を精製した。系 コア複合体は 16%の単量体と 84%の二量体との二つの形態でそれぞれ精製された。結晶化のために活性を長期間高く維持できる方法を検討し、2 週間にわたって酸素発生活性を高く維持する条件を見いだした。

並行して、申請者は単量体と二量体の違いについて詳細に研究を行った。ポリペプチドや色素、キノン組成には違いが見られず、酸素発生活性も僅かに二量体の方が高かったが有意な差はなかった。人工的電子受容体と両複合体との相互作用に違いが見られたので、酸素発生活性の僅かな違いはこれを反映していると考えられた。界面活性剤で可溶化したチラコイド膜を陰イオン交換クロマトグラフィーにかけたが、このとき洗浄量に比例して二量体の割合が増加し、逆に単量体の割合が減少した。このことは、二量体が細胞内での本来の系 コア複合体の状態ではない可能性を示唆している。可溶化直後のチラコイド膜を Blue Native-PAGE かけると、単量体のみが検出されたことからこの考えが支持された。単量体と二量体では、 Q_A 還元に伴う蛍光強度増加曲線に違いがあり、チラコイド膜や細胞では単量体と同じ曲線を示した。このことも、系 コア複合体の生体内での本来の機能的な状態は単量体であり、二量体は単量体と平衡状態にあるとしても生体内での存在量は少ないという考えを支持している。

また、*C. merolae* の系 コア複合体標品からも Psb30 が検出されたが、これが本当に系 複合体の構成成分であることを確認するために、申請者は遺伝子操作が可

能なラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いて、Psb30 の C 末端に His-tag を導入した株、Psb30-His 株を作製した。この株より、Ni affinity カラムを用いて系複合体を精製することができた。このことは、Psb30 が間違いなく系複合体の構成成分であることを示している。

2 . 論文審査結果

地球上の生物にとって重要な反応である光合成酸素発生反応に関連して、これまで好熱性ラン色細菌を材料に系複合体の結晶構造がいくつか報告されている。しかし結晶の分解能が 3 Å と低く、酸素発生反応に関与するマンガノクラスターの構造は未だに確定していない。

申請者は、真核生物である *C. merolae* から純度と活性が高い系複合体を得ることに成功し、また活性を長期間高く維持する条件を見いだした。この系複合体標品には、その役割や帰属が明確ではなかった Psb30 タンパク質が存在していた。そこで、モデルラン色細菌である *Synechocystis* sp. PCC6803 において Psb30-His 株を作製し、それを用いて、系複合体に Psb30 が結合していることを明らかにした。また、結晶構造からは系コア複合体が二量体で存在することが報告され、広く信じられてきたが、申請者は系複合体がチラコイド膜中や細胞内に存在する時には単量体として存在し、機能している可能性を示した。以上の成果は、光合成生物における系コア複合体の構造と反応機構のさらなる解明に大いに貢献するものであると考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 21 年 1 月 28 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：佐藤和彦 印

副査：吉川信也 印

：渡辺憲二 印

：山本泰 印

（岡山大学大学院自然科学研究科、教授）

：菓子野康浩 印