

TOPICS

好熱性シアノバクテリアを用いた PSII 小サブユニットの解析

東京理科大学工学部応用生物科学科

岩井雅子

1. はじめに

光化学系II(PSII)は光エネルギーを利用して、水から電子を引き抜き、酸素を発生する超分子複合体である。酸素発生型生物のみならず、酸素呼吸を行う生物にとっても大切な装置であり、その研究はシアノバクテリアから高等植物まで様々な材料を用いて行われてきた。近年、PSIIの構造解析がドイツ、日本、イギリスの3つのグループで進められているが、各グループがこれまでに報告した結果は一致していない¹⁻³⁾。例えば、図1は2005年のドイツのグループのものだが、36本の膜貫通ヘリックスのうち3本が未同定であり、X1, X2, X3とされている。この3本が他のグループで、どのようにアサインメントされているかを調べてみると、X1について日本、イギリスはそれぞれ未同定、PsbNとしている。X2について日本はPsbXとし、イギリスはヘリックス自体が存在しないとされている。X3について日

本、イギリスはそれぞれPsbH、PsbXとしている。ちなみになかなか認知されないが、PsbNはPSIIタンパク質ではない⁴⁾。このように小サブユニットの位置はPSIIの中では未だ確定していない。また、各小サブユニットはシアノバクテリアから高等植物まで広く保存されているからにはPSIIの活性に必要であると思われるが、その働きについてはよくわかっていないものが多い。

シアノバクテリアは高等植物よりも増殖速度が速く、細胞レベルでの解析に適している。特に好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 や *Thermosynechococcus vulcanus* は、光独立栄養のみで生育するため、PSIIが形成できない変異株の解析は行えないものの、活性や二量体などを保持した複合体を単離することができる点で非常に優れており、構造解析にも用いられている。我々はこれまでに好熱性シアノバクテリアを用いて、PSIIの小サブユニットの変異株

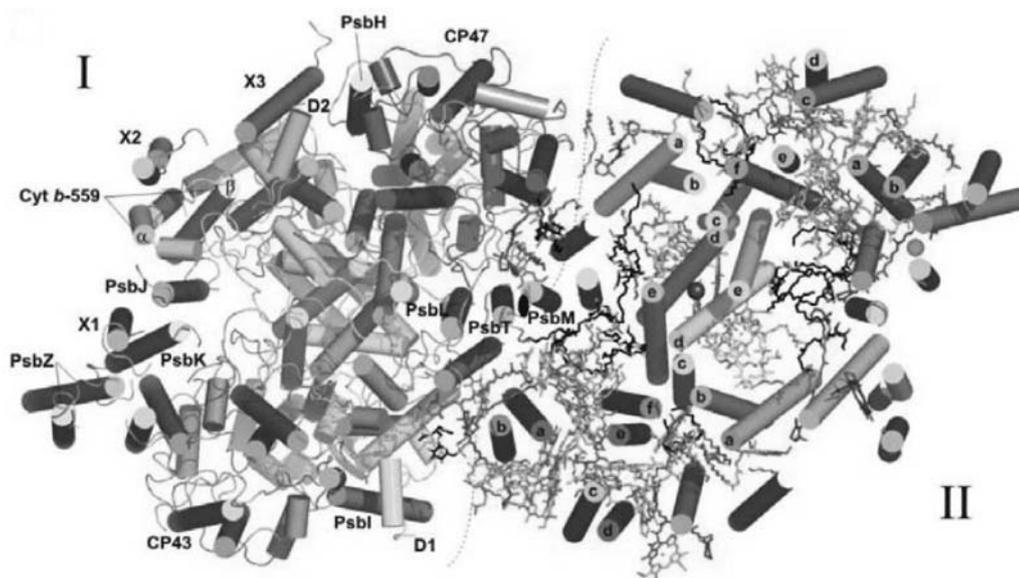


図1 好熱性シアノバクテリアのPSII複合体³⁾

を作製し、解析を進めてきたので、ここでまとめて紹介したい。

2. PSII 小サブユニット変異株の解析

まず、研究を始めるにあたって、好熱性シアノバクテリアは *T. elongates* BP-1 で全ゲノムが決定しているが⁵⁾、形質転換系については改善の余地があった⁶⁾。我々は *T. elongatus* BP-1 での形質転換系の改良⁷⁾、*T. vulcanus* での形質転換系の開発を行い、2種の *Thermosynechococcus* で PSII の変異株の作製を可能にした。

2.1 PsbTc

PsbTc は PsbTn (高等植物が持つ核コードの PsbT) とは異なり、膜を1回貫通する低分子タンパク質である。クラミドモナスで光阻害を受けた PSII の効率的な回復に必要であり、特に Q_A の回復に関わるという報告がある^{8,9)}。私はこの変異株を作製し、クラミドモナスと異なり、細胞での酸素発生活性や強光下での生育に影響がないことを確認した。また PSII を単離することで、二量体形成に関わっていること、PsbM の PSII への結合に関わっている可能性、を見いだした¹⁰⁾。最近、我々は同じコンストラクトを用いて *T. vulcanus* で変異株を作製し、質量分析や結晶構造解析を行い、第48回日本植物生理学会年会で報告した。その結果、実は形質転換用のコンストラクト作製時の問題により、前述の結果は PsbTc 欠損による影響ではなく、PsbTc の C 末端除去による影響を調べていたことが判明した。この株には PsbM の欠失はみられず、PsbTc の C 末端が PsbM の PSII への結合に関与するかどうかは不明だが、PSII の二量体形成にはある程度関わっていること、PsbTc の C 末端がストロマ側に出ていることが判明した。また、PsbTc の位置が特定され、その場所はドイツ、イギリスと一致した。

2.2 PsbM

最近、タバコで Q_B サイトへの影響が報告されている¹¹⁾。我々は変異株を作製し、細胞での酸素発生活性や通常条件での生育に影響がないことを確認した。PSII を単離することで、二量体形成に関わっていること、他タンパク質の PSII への結合に関わっていないことを

見いだした。*T. vulcanus* を用いた解析も行い、第48回日本植物生理学会年会で報告したように、PsbM の場所はドイツ、イギリスのグループの図と一致した。変異株では、PsbM があった場所あたりに、界面活性剤または脂質分子が一つ入っているようである。残念ながら解像度が低く、PsbM がなくなることによる周囲のアミノ酸残基への影響まではまだいえていないが、今後解像度が上がればそのようなことについても明らかにできると考えている。

2.3 PsbH および PsbX

クラミドモナスを用いた PsbH 欠損株は PSII の活性がみられないため¹²⁾、*Synechocystis* を用いた破壊株の解析が行われ、強光では増殖しづらい、 Q_A 、 Q_B 間の電子伝達に影響が出る、CP47 にアセンブリーしていると言った報告がある¹³⁻¹⁶⁾。私は PsbH 変異株を作製し、*Synechocystis* と同様、細胞での酸素発生活性や強光下で生育に影響があることを確認した。この変異株から PSII を単離することで、二量体形成に関わっていること、表在性タンパク質である PsbO、PsbU、PsbV、と PsbX の PSII への結合に関わっている可能性を見だし、2006年に報告した¹⁷⁾。

PsbX は前述のように、その場所が3グループで一致していないヘリックスのうちの一つである。PsbH の結果からは PsbH の近傍に PsbX はありそうである。池内研の先輩である加藤浩さん(現三重大学助手)が PsbX 変異株を作製し、細胞での酸素発生活性や低 CO_2 条件で生育の低下を確認している。また変異株から PSII を単離することで、酸素発生活性の低下、PsbH などの他タンパク質の PSII への結合に関わっていないこと、二量体形成に関わっていないことを見いだしている¹⁸⁾。

2.3 PsbI

これまでの構造解析では日本のグループだけ他2グループと場所が異なっていた。

Synechocystis、クラミドモナスの PsbI 欠損株は酸素発生活性が野生株より落ち、光感受性が増し^{19,20)}、タバコの PsbI 欠損株は光感受性となり、PS II のリン酸化と PS II-LHC II 複合体の安定化に影響が見られる²¹⁾。加藤さんは PsbI 変異株を作製し、細胞での酸素発生活性の低下を確認した。PSII を単離することで、PSII での酸

素発生活性の低下、二量体形成に関わっていること、他タンパク質のPSIIへの結合に関わっていないことを見いだした²²⁾。最近、我々が行った*T. vulcanus*を用いた解析から、PsbIの場所は2003年に報告した場所ではなく、ドイツ、イギリスのグループの図と一致することがわかった。

2.4 PsbZ および PsbK

クラミドモナス、タバコでのPsbZ欠損株の解析から、CP26,CP29といったLHCIIのPSIIへの結合、PSIIのリン酸化、キサントフィルサイクルやNPQといったことに影響することが示されている²³⁾。私はPsbZ変異株の解析からPsbZがPsbKのPSIIへの結合に影響を与えていることを見いだした。PsbZとPzbKはドイツ、イギリスでは隣り合っている。

PsbKは全てのグループの図でCP43のすぐそばに存在している。クラミドモナスではCP43に強く結合しており、PsbO欠損株ではPsbKは1/4に減少することが示されている²⁴⁾。また、タバコではPsbOより先にPSIIにアセンブリすることが示されている²⁵⁾。加藤さんはPsbK変異株を作製し、細胞での生育に大きな影響はないものの、酸素発生活性の低下を確認した。PSIIを単離することで、二量体形成に関わっていること、PsbOを含め、他タンパク質のPSIIへの結合に関わっていないことを見いだした²²⁾。これまでの結果からはPSIIへの結合に関わっていないように見えるが、先ほどのPsbHとPsbXのような結果を考えると、すぐ外側に存在するX1のPSIIへの結合へ本当に影響がないのか、

さらなる解析が必要と考えている。

3. まとめ

これまでの好熱性シアノバクテリアでの結果をまとめてみると、表1のようになる。ここであげた小サブユニットはどれもPSII活性に必須ではないが、影響を与えている。しかし、すべての変異株で細胞での増殖にまで影響をしているわけではない。表在性タンパク質や膜貫通タンパク質といった他のPSIIサブユニットの安定化に効いているものもある。大半のサブユニットがPSIIの二量体化に関係があるが、細胞内での二量体化形成に影響があるのか、PSII単離時の二量体化維持に影響があるのかについては現段階ではわからない。このようにPSIIの構造や機能については、まだまだわかっていないことが残されている。

4. 今後

PSII変異株での構造解析を進めており、各サブユニットの位置の特定をしていく予定である。また、残るPsbJ, PsbYについても変異株を作製し、解析を進めている。今後は、各変異株での二量体形成への影響や他のPSIIサブユニットへの影響がPSIIを単離する時に不安定になるためなのか、細胞内でも二量体が形成されづらいのか調べていく必要がある。細胞で影響が見えているPsbH、PsbX変異株は*in vivo*でもPSIIに影響があると思われる。また、他の変異株についても、水分解系への影響、集光タンパク質であるフィコビリソームとの関連、PSII周辺のタンパク質への影響などを調べて

表1 好熱性シアノバクテリアでのPSII欠損株の解析

PSII欠損株	細胞増殖への影響	細胞での酸素発生活性	単離PSIIでの酸素発生活性	他サブユニットへの影響	PSII二量体化への影響
PsbH欠損株	通常条件で生育阻害。強光下でさらに阻害。	野生株の60%に減少。	野生株の30%に減少。	PsbO, PsbV, PsbU, PsbX	野生株の50%に減少。
PsbI欠損株	通常条件で影響無し。	野生株より減少。	野生株の80-70%に減少。	影響なし。	野生株より減少。
PsbK欠損株	通常条件で影響無し。	野生株より減少。	野生株の50%に減少。	影響なし。	野生株より減少。
PsbM欠損株	通常条件で影響無し。	野生株と差なし。	野生株の80-70%に減少。	影響なし。	野生株の50%に減少。
PsbTcC末欠損株	弱光条件、通常条件、強光条件で影響無し。	野生株と差なし。	野生株と差なし。	影響なし。	野生株の30%に減少。
PsbX欠損株	通常条件で影響無し。低CO ₂ 条件で生育阻害。	野生株の80%に減少。	野生株の50%に減少。	影響なし。	野生株より減少。
PsbZ欠損株	弱光条件、通常条件で影響無し。	野生株と差なし?	野生株の70%に減少?	PsbK	不明

いきたい。よく研究されている光阻害でのD1タンパク質の代謝回転における各サブユニットの寄与についても、これらの変異株を使って解明できると考えている。

5. おわりに

今回紹介した結果は、その大部分が東京大の池内研に大学院生として在籍中に得られたものであり、最近の *T. vulcanus* での構造解析は岡山大の沈研究室、大阪市立大の神谷研究室との共同研究によるものである。深く感謝を申し上げたい。また、現在も PSII の研究を快く続けさせてくださっている井上先生に感謝を申し上げたい。

参考文献

- Kamiya, N. and Shen, J. R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 98-103.
- Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004) *Science* 303, 1831-8.
- Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) *Nature* 438, 1040-4.
- Kashino, Y., Koike, H., Yoshio, M., Egashira, H., Ikeuchi, M., Pakrasi, H. B. and Satoh, K. (2002) *Plant Cell Physiol.* 43, 1366-73.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S. (2002) *DNA Res.* 9, 123-30.
- Muhlenhoff, U. and Chauvat, F. (1996) *Mol. Gen. Genet.* 252, 93-100.
- Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004) *Plant Cell Physiol.* 45, 171-5.
- Ohnishi, N. and Takahashi, Y. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 33798-804.
- Ohnishi, N., Kashino, Y., Satoh, K., Ozawa, S. and Takahashi, Y. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 7107-15.
- Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2004) *Plant Cell Physiol.* 45, 1809-16.
- Umate, P., Schwenkert, S., Karbat, I., Bosco, C. D., Mlcochova, L., Volz, S., Zer, H., Herrmann, R. G., Ohad, I. and Meurer, J. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 9758-67.
- Summer, E. J., Schmid, V. H., Bruns, B. U. and Schmidt, G. W. (1997) *Plant Physiol.* 113, 1359-68.
- Mayes, S. R., Dubbs, J. M., Vass, I., Hideg, E., Nagy, L. and Barber, J. (1993) *Biochemistry* 32, 1454-65.
- Komenda, J. and Barber, J. (1995) *Biochemistry* 34, 9625-31.
- Komenda, J., Lupinkova, L. and Kopecky, J. (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 610-9.
- Komenda, J., Tichy, M. and Eichacker, L. A. (2005) *Plant Cell Physiol.* 46, 1477-83.
- Iwai, M., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2006) *Photosynth. Res.* 87, 313-22.
- Katoh, H. and Ikeuchi, M. (2001) *Plant Cell Physiol.* 42, 179-88.
- Kunstner, P., Guardiola, A., Takahashi, Y. and Rochaix, J. D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9651-9654.
- Ikeuchi, M., Shukla, V. K., Pakrasi, H. B. and Inoue, Y. (1995) *Mol. Gen. Genet.* 249, 622-8.
- Schwenkert, S., Umate, P., Dal Bosco, C., Volz, S., Mlcochova, L., Zoryan, M., Eichacker, L. A., Ohad, I., Herrmann, R. G. and Meurer, J. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 34227-38.
- Katoh, H. and Ikeuchi, M. (2001) in *PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis* (CSIRO Publishing, Melbourne), pp. S5-50.
- Swiatek, M., Kuras, R., Sokolenko, A., Higgs, D., Olive, J., Cinque, G., Muller, B., Eichacker, L. A., Stern, D. B., Bassi, R., Herrmann, R. G. and Wollman, F. A. (2001) *Plant Cell* 13, 1347-67.
- Sugimoto, I. and Takahashi, Y. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 45004-10.
- Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N. and Aro, E. M. (2005) *Biochem. J.* 388, 159-68.