

氏名	小澤 真一郎
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4008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	Biochemical characterization of Photosystem I complex assembly in the green alga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (緑藻クラミドモナスにおける光化学系 I 複合体の分子集合機構の生化学的解析)
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

光化学系I (PSI) 複合体は、チラコイド膜上に存在する2種の光化学系の1つで、光を利用して電子伝達反応を駆動し、炭酸固定反応に必要なNADPHを生成する。PSI複合体は12-15のサブユニットと100以上のコファクターから構成され、植物と藻類ではさらにアンテナクロロフィル複合体I (LHCI) が結合することでPSI-LHCI複合体を形成する。近年の研究によって、サブユニットとコファクターが複体内で正確に配置されることにより、PSI-LHCI複合体は高い効率で機能を発揮することが明らかになった。ところが、PSI-LHCI複合体が構築される機構はあまり解明されていない。PSI複合体の分子集合に関与する因子の一つであるYcf4は、真核光合成生物では葉緑体遺伝子にコードされ、緑藻クラミドモナスでは大きな複合体 (Ycf4複合体) として存在する。本研究では、PSI複合体が分子集合する機構を明らかにするため、Ycf4複合体の精製と生化学的解析を行った。

Ycf4複合体を高度に精製するため、Ycf4のC末端にTandem Affinity Purification (TAP) タグを融合した葉緑体形質転換株を緑藻クラミドモナスから作出し、アフィニティークロマトグラフィーによってYcf4複合体を精製した。精製されたYcf4複合体は大きな構造を維持しており、見かけの分子質量は1500 kDaであった。また、精製標品のタンパク質組成を免疫プロット法や質量分析法などで解析した結果、Ycf4複合体の主要な構成タンパク質としてYcf4, Cop2, PsaFを見い出した。さらに、PSIサブユニット、PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaEが少量存在し、未完成なPSI複合体を形成していた。³⁵Sを用いたパルス・チェイスラベル実験により、この未完成なPSI複合体は、新規に合成されたPSIサブユニットが部分的に分子集合した分子集合中間体であることがわかった。その後、Ycf4複合体上で分子集合したPSI複合体は遊離し、LHCIと結合し、最後にPsaGとPsaKが組み込まれることを明らかにした。

本研究により、Ycf4複合体は合成されたPSIサブユニットをPSI複合体へ分子集合する上で必要な足場 (molecular scaffold) として機能することが示された。またPSI複合体の分子集合の最終段階でPsaGとPsaKが組み込まれ、LHCIとの結合を安定化することが示された。

論文審査結果の要旨

光化学系I複合体が構築されていくメカニズムはこれまでほとんど解明されていない。光化学系I複合体の分子集合に必須の因子であるYcf4は、緑藻クラミドモナスでは大きな複合体(Ycf4複合体)として存在している。本研究では、Ycf4複合体を高度に精製するためにYcf4のC末端側にTAPタグというアフィニティータグを融合した形質転換株を利用して、アフィニティークラムによってYcf4複合体を精製した。精製した標品は大きなサイズを維持しており、Ycf4、PsaF、Cop2、に加えて光化学系I複合体のサブユニットであるPsaA、B、C、D、E、の存在を確認した。また、³⁵Sを用いたパルス・チェイスラベルとYcf4に対する抗体による免疫沈降の結果、新規に合成された系I複合体のサブユニットがYcf4複合体と一過性的に結合することが示された。系Iを完全に欠損した Δ PsaA/B変異株では、Ycf4複合体は野生株と同様に大きな構造を有しており、極微量蓄積していたPsaFは全てYcf4複合体に結合していた。以上の結果より、Ycf4複合体は光化学系I複合体のサブユニットを取り込み光化学系I複合体へと供給し、光化学系I複合体の分子集合を安定に進行するためのスキップフォールドとして働くことがわかった。また、Cop2の蓄積量を野生株の10%まで減少させた変異株では光化学系I複合体の分子集合は正常に進行するがYcf4複合体の構造は不安定になったので、Cop2は分子集合に必須の因子ではないがYcf4複合体の構造安定化に重要であることがわかった。

また、チラコイド膜を可溶化しショ糖密度勾配超遠心すると分離するPsaGとPsaKを欠きLHCIとの結合が不安定なPSIサブコンプレックスは、³⁵Sによるパルス・チェイスラベル実験によって、PSI-LHCIの前駆体であることを示した。よって、PsaGとPsaKの組み込みによりPSI-LHCIの分子集合が完了することを明らかにした。

本研究は、光化学系I複合体のサブユニットが分子集合していく過程の全体像を、分子レベルで初めて明らかにし、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。