HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	クロロフィルタンパク質複合体の構築と分解に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	下田, 洋輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11405号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55743
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yousuke_Shimoda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（**生命科学**）　氏　名　　下田　洋輔

学 位 論 文 題 名

クロロフィルタンパク質複合体の構築と分解に関する研究

クロロフィル（Chl）は、光合成において中心的な役割を果たしており、その代謝は植物の発育と密接な関係を持っている。発芽後は、植物の成長とともに Chl は活発に合成される。合成された Chl は、タンパク質に取り込まれ、光合成装置が形成される。生育ステージが進み葉の老化の段階を迎えると、葉緑体の中の窒素を回収し、成長組織に転流するため、Chl は活発に分解される。Chl の合成と分解は厳密に制御されなくてはならない。制御に失敗した場合、遊離の Chl や Chl 合成と分解中間体が蓄積し、細胞死や葉の枯死が引き起こされるためである。

Chl 代謝に関する研究は、多くの研究者によって活発に行われて、現在までに Mg-dechelatase を除くすべての Chl 代謝酵素が同定され、Chl 代謝経路の全容は、一部を除いて明らかになっている。しかしながら、Chl *b* 分解経路については、不明な点が残されている。また、光合成装置である Chl-タンパク質複合体の構築と分解過程については、理解が進んでいない。特に、Chl 代謝と協調した Chl-タンパク質複合体の構築と分解に関しては、ほとんど研究が行われていないのが現状である。次の Chl 代謝研究として、Chl 代謝と協調した Chl-タンパク質複合体の構築と分解過程が位置づけられると考えた。そのためには、まず Chl 代謝経路の全容が明らかにする必要がある。また、Chl-タンパク質複合体の構築に関する全容を明らかにする必要がある。そこで、私は、Chl *b* 分解経路を確定するのと同時に、特に Chl-タンパク質複合体構築に焦点を当て、光化学系に Chl が組み込まれる過程を、明らかにすべく以下の研究を行った。

第 1 章では、Chl 分解に関する研究を行った。Chl *a* 分解に関する研究は、多くの研究グループによって活発に行われ、現在までに Mg-dechelatase を除くすべての Chl *a* 分解酵素が同定され、Chl *a* の分解経路が確定された。一方、Chl *b* の分解経路については、未解決な点が残されている。Chl *b* は、Chl *b* 還元酵素（CBR）により、7 位のフォルミル基がヒドロキシメチル基に還元され、7-hydroxymethyl chlorophyll *a* (HMChl *a*)になる。さらに HMChl *a* 還元酵素(HCAR)により、ヒドロキシメチル基がメチル基に還元され、最終的に Chl a に変換されて分解が進む。しかしながら、CBR は、Chl *b* だけでなく葉緑体で存在しうる、中央金属の Mg を失った Pheophytin *b* (Phein *b*)やさらにフィチル基を失った Pheophorbide *b* (Pheide *b*)などの Chl *b* 派生物のフォルミル基を還元し､幅広い基質の特異性を示すことから、複数の Chl *b* 分解経路が提案された。しかし、実際どの経路で Chl *b* が分解されるのかに関しては、実験的な証拠はなかった。

本研究では①Chl *b* 分解経路を確定すること、および②植物がその経路を採用した理由を解明することを目的として、以下の実験を行った。

①Chl *b* 分解経路の解明

Chl *b* 分解経路を決定するための鍵は、HCAR の基質特異性にある。そこで、まず HCAR の組み換えタンパク質を用いて、基質特異性を調べた。その結果、HCAR は、HMChl *a* を基質にするが、中心金属の失った HMPhein *a* と HMPheide *a* を基質にすることができなかった。CBR と HCAR タンパク質の共存下で、Chl *b* を基質にした場合は、Chl *a* へ転換された。このとき、HMChl a の蓄積がほとんどみられなかった。さらに、Chl *b* を結合しているアンテナタンパク質である LHCII を基質にした場合は、HMChl *a* の蓄積がほとんどなく、LHCII の Chl *b* は全て Chl *a* へ転換された。これらの結果から、フォルミル基のメチル基への転換において、Chl *b*→HMChl *a*→Chl *a* が唯一の経路であることが示された。

②植物はなぜこの分解経路を採用したか

この点を解明するため、Chl *b* が通常の経路では分解されない形質転換体を利用した。シアノバクテリア *Prochlirothrix hollandica* の Chl *b* 合成酵素 PhCAO を導入したシロイヌナズナは、通常は Chl *b* を結合しない光化学系 I や光化学系 II のコアアンテナにも Chl *b* が取り込まれる。in vitro の分解実験で、コアアンテナに取り込まれた Chl *b* は、CBR によって効率よく触媒されないことが分かった。そのため、形質転換植物に蓄積した Chl *b* の相当量が通常の分解経路では分解されないことが考えられた。Chl *b* がコアアンテナに取り込まれた形質転換植物を暗所に置き Chl の分解を誘導したところ、Chl *b* が正常な分解経路を取らず、CBR の代わりに Mg-dechelatase が先に働き、HMPheide *a* や Pheide *b* を蓄積した。その結果、蓄積した HMPheide *a* や Pheide *b* が細胞死を誘導した。

これらの結果から、(1) Chl *b* の分解経路は、LHCII-Chl *b*→HMChl *a*→Chl *a* の順に還元され、そのあとに Mg の離脱が起こること、(2) それ以外の経路で分解されると細胞死が誘導されることが明らかになった。

第 2 章では、Chl-タンパク質複合体の構築機構、特に光化学系 II（PSII）に関する研究を行った。Chl-タンパク質複合体には、コアアンテナである PSII と PSI、そして周辺アンテナである LHCs の 2 種類がある。周辺アンテナの Chl により光エネルギーが捕集され、反応中心の Chl *a* が電荷分離し、電子伝達系が駆動される。結晶構造解析の結果、PSII、PSI そして LHCs の立体構造が明らかになっている。このように、生理的そして構造的に Chl-タンパク質複合体の理解が進んでいるが、Chl-タンパク質複合体の構築機構については、研究は遅れている。特に、光化学系に Chl が組み込まれる過程については、全く明らかにされていない。合成された Chl がどのようにして Chl-タンパク質複合体のアポタンパク質への組み込まれるのか、あるいは Chl 合成経路と光化学系の Chl-タンパク質複合体がどのように協調して合成されていくのかについては、不明である。高等植物の場合、コアアンテナの Chl-タンパク質複合体欠損体はアルビノ、あるいは致死を示すためである。本研究では、PSII に焦点を絞り、Chl が光化学系に組み込まれてから、光合成色素として機能するまでの反応過程の解明することを最終目的とし、まず PSII 構築機構に関わる制御因子を同定することで、PSII 構築の過程を明らかにしようとした。そこで、緑藻クラミドモナスを用いた PSII 異常変異体のスクリーニングを行った。

glass bead 法を用いて、タグを挿入したクラミドモナス変異体プールを作製した。Chl 蛍光を指標として、Fluorcam を用いて、約 7 万の変異体プールから PSII 異常変異体を多数単離した。次に、TAIL-PCR によって網羅的に PSII 異常変異体のタグの挿入位置を決定した。最終的に、相補テストを行うことで、3 つの PSII 異常変異体について新規の原因遺伝子を同定することができた。

本研究では、陸上植物の Chl b 分解経路を確定することができた。また、緑藻から PSII 異常変異体を多数単離し、その中から 3 つの PSII 構築に関与する新規因子を同定することができた。