

氏 名 足立 秀行

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 4275 号

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 25 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 Structural biology of photosystem II from a red alga *Cyanidium caldarium*

(紅藻 *Cyanidium caldarium* 由来光化学系 II の構造生物学的研究)

論文審査委員 教授 沈 建仁 教授 山本 泰 教授 高橋 裕一郎

学位論文内容の要旨

光化学系 II (以下 PSII) は光合成の初期反応である、光エネルギーを化学エネルギーへの変換、及び水を分子状酸素に分解する反応を触媒する膜タンパク質複合体である。PSII に存在する Mn₄Ca クラスタは水から電子を引き抜き、分子状酸素を発生させる役割を持っている。この Mn₄Ca クラスタの安定化・活性を維持しているのが、膜の表面に結合している 3-4 種の表在性タンパク質である。これらの表在性タンパク質の組成は、原核生物であるシアノバクテリアから真核藻類である紅藻、及び高等植物の間で異なっている。これまでシアノバクテリア由来 PSII の結晶構造は 3.8 から 2.9 Å 分解能で報告されてきたが、真核生物由来 PSII の結晶構造は報告されていない。紅藻はシアノバクテリアに近い真核藻類のひとつであり、その光化学系はシアノバクテリアから高等植物へ移行している段階にある。紅藻の PSII は PsbQ' を含む 4 つの表在性タンパク質を持っており、シアノバクテリアや高等植物の PSII と異なっている。紅藻 PSII における表在性タンパク質の結合部位、機能についてはこれまでの研究で解析されてきたが、その立体構造が解明されていないため、これらの詳細は明らかになっていない。

紅藻 PSII の立体構造を解明するため、本研究では、好熱性、好酸性紅藻 *Cyanidium caldarium* を用いて PSII の精製方法の改良、結晶化条件の確立、結晶の分解能の向上と構造解析を行い、次のような結果を得た。(1) PSII の精製においては従来の可溶化条件を改良し、新たな界面活性剤の添加、及び 2 回カラム精製法を用いることにより、高純度、高活性を持つ紅藻 PSII を得ることに成功した。得られた PSII 標品を用いて、広範な結晶化条件のスクリーニングを行うことにより、2 種類の結晶を析出させることに成功し、そのうち、高い分解能を与える結晶から 3.5 Å の回折データを収集した。さらに分子置換法により結晶のパッキング様式を明らかにし、単位格子に 4 つの PSII 四量体が含まれていることを明らかにした。(2) 結晶の分解能を向上させるため、再結晶化法を取り入れ、PSII 標品の純度と均一性を大幅に向上させることに成功した。また結晶の脱水処理条件を最適化することによって、結晶の質と分解能を向上させることに成功した。その結果、得られた結晶の分解能は 2.89 Å に向上した。(3) X 線結晶構造解析に必須である位相情報の取得のため、重原子同型置換体の作成条件を確立し、多数の重原子誘導体から回折データを収集した。その結果、4 つの重原子同型置換体から位相情報を取得することに成功し、それに基づき電子密度図を計算し、紅藻 PSII の初期モデルを構築した。

論文審査結果の要旨

上記学生は好熱、好酸性紅藻*Cyanidium caldarium*から光化学系II複合体（以下PSIIとする）を単離精製し、その結晶化、構造解析を行った。PSIIは太陽の光エネルギーを利用して生物利用可能な化学エネルギーに変換すると同時に、水を分解し酸素を発生する反応を触媒している重要な複合体であり、17種の膜タンパク質と3種の膜表在性タンパク質を含む、分子量350 kDaの超分子複合体である。PSIIの立体構造は原核生物であるラン藻から報告されているが、真核生物由来PSIIの結晶化・構造解析は報告されていない。しかし、真核生物由来PSIIは、表在性タンパク質の組成がラン藻と異なっている部分があり、その構造も一部異なっていることが予想される。上記学生は博士課程在籍中、次の3つのテーマについて研究を行い、成果を得た。① 紅藻*Cyanidium caldarium*よりPSII複合体を単離精製し、結晶化条件のスクリーニングによりその結晶化に成功した。得られた結晶についてX線回折実験を行い、分解能3.5 Åの回折データを収集することに成功した。② 紅藻PSIIの結晶構造解析を行うため、標品の純度・均一性を改善するよう精製条件の改良や新たな精製手法としての再結晶化法の導入を行い、さらに結晶のパッキングを改善するための最適脱水処理条件を確立した。その結果、紅藻PSII結晶の分解能を2.74 Åまで向上させることに成功した。③ PSIIの構造を解析するため、各種重原子化合物を用いた重原子誘導体結晶を作成し、X線回折データを収集・分析した。その結果、有用な位相情報を与える重原子誘導体を3種取得し、得られた位相情報を用いて紅藻PSIIの電子密度図を計算した。得られた電子密度図から、紅藻独自の表在性タンパク質であるPsbO'の位置が示唆された。さらにこの電子密度図とラン藻PSII構造との比較から、ラン藻PSIIに存在しない新たな膜貫通ヘリックス2本の存在が示唆された。

以上の成果の一部は論文として発表され、残りも現在発表準備中であり、これらの成果は博士学位の授与に十分値すると判断した。