

情報制御研究部門（客員研究部門）

佐 藤 公 行

太陽系において地球の内外の軌道に位置する金星と火星の場合とは対照的に、地球の大気は酸素に満ちている。この酸素のほとんどすべては、光合成の光化学系Ⅱにおいて電子供与体として水が利用される結果生じた副産物であると考えられている。我々は、これまでの研究により、この酸素発生反応の遂行に必要な強い酸化力を形成する“光化学系Ⅱ反応中心”を同定することに成功し、これが葉緑体 DNA 上の2つの遺伝子 (psbA と psbD) の産物で、互いに相溶性の高い2種類のタンパク質 (D1 と D2 タンパク質) を中心に構築されていることを明らかにした。本部門では、この研究の成果に立脚して、光化学系Ⅱ反応中心の分子構築を、その強い酸化力の形成機構に焦点を当てて解析するとともに、生体にとって極めて危険な存在であるこの強い酸化力の形成に対する安全装置として機能する動的な諸過程、特に構成サブユニットの1つである D1 タンパク質の光に依存する代謝回転の過程に注目して、反応中心の分子構築の動態を解明することを目標としている。これらのテーマに関連して、過去4年間に得られた主な成果ならびに今後の研究の展望は以下の通りである。

1. 光化学系Ⅱ反応中心の構造の解析

光化学系Ⅱ反応中心の結晶化による構造解析を1つの目標として努力して来たが、まだその成果は得られていない。光化学系Ⅱ反応中心で形成される強い酸化力の担い手である第一次電子供与体 (P-680) のチラコイド膜上での配向に関する EPR による解析の結果を基礎に、FT-IR 分光測定により P-680 の三重項状態を担っていると考えられるクロロフィル分子のカルボニル基の媒質との相互作用を解析し、D1、D2 タンパク質とクロロフィルとの間の水素結合に着目した P-680 の分子環境についてのモデルを提唱した。現在、このモデルで示されるようなクロロフィルとタンパク質との相互作用の存在の証明と、その酸化還元電位への影響について、形質転換の容易な *Synechocystis* sp. PCC6803 株を用いる部位特異的およびランダムな突然変異誘発により、その解析が行われている。

ところで、単離された光化学系Ⅱ反応中心には、6分子のクロロフィルと2分子のフェオフィチンに加えて、2分子の β -カロチンが含まれている。このカロチノイドの役割の解明に関連して、まず、それが 15-cis 配置であることを証明するとともに、エチルエーテル処理によるカロチノイドの選択的抽出に成功し、この系を用いる解析から反応中心における色素分子の位置関係を推定した。更に、二価性架橋剤を用いる解析から、反応中心を構成するサブユニットの配向を決定するとともに、サブユニット間の隣接関係を明らかにし、今後行われる結晶構造解析の際の助けとなるいくつかの新しい情報を提供した。

2. 光化学系II反応中心の分子構築の動態の解析

光化学系II反応中心の構造と機能の中核を担うD1タンパク質は、光照射反応条件下で高速度の分解と合成（代謝回転）を行っており、この現象は強い酸化力を形成する反応中心の作動に伴って必然的に起こる損傷とその修復の過程を示すものとして説明されている。この過程には、(1) 生体内における機能タンパク質の寿命の決定、(2) 損傷分子の検知とプロテアーゼの限定的な作用、(3) 翻訳段階におけるタンパク質合成の光制御、(4) タンパク質のC-末端切断による機能発現、(5) 超分子複合体の形成、解体、サブユニット交換、(6) 損傷と修復過程の共役（情報伝達）など、本質において普遍性のある数多くのユニークなプロセスが含まれている。ここでは、まず第一段階として、この代謝回転を構成する素過程の分子機構の解明に力点を置いた解析が行われているが、以下に、その成果の一部を示す。

(1) D1タンパク質合成における翻訳伸長の光による制御機構の解析：D1タンパク質の合成は翻訳の段階で光により制御されることが知られている。本研究では、エンドウ単離葉緑体を用いる解析で、暗所におけるD1タンパク質の合成が翻訳伸長の特定の段階で停止し、その解除には光条件下で作動する光化学系Iで還元されることにより活性化されるタンパク質の酸化還元因子が必要であることを見出した（図1参照）。この因子は生化学的に純化可能であり、今後、この因子とD1タンパク質上

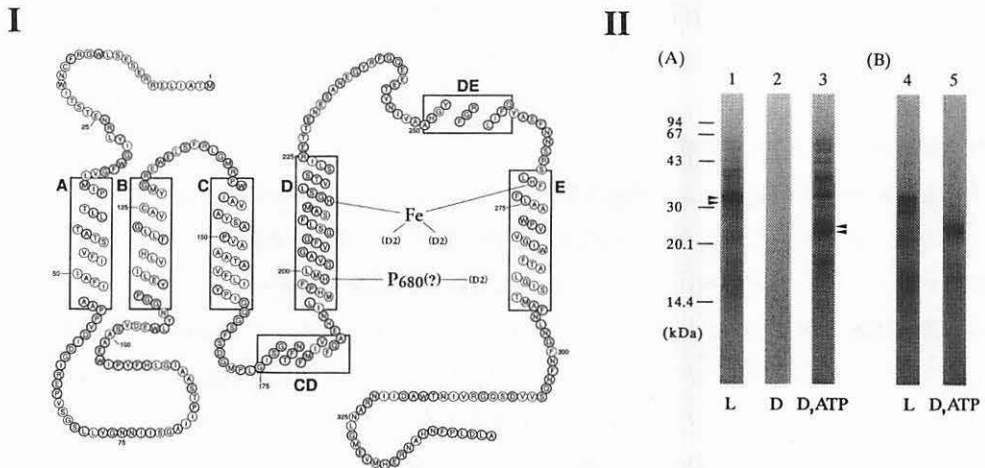


図1 D1タンパク質の構造と翻訳伸長制御

(I) D1タンパク質の二次元構造モデル

A～Eは膜貫通ヘリックスを示す（図2参照）。一字記号で表わされたアミノ酸のうち、これまでに塩基配列の決定された約50の例で保存されているものは太マルで区別されている。

(II) D1タンパク質合成における翻訳伸長の制御

明所（L）、暗所（D）および暗所でATP添加（D, ATP）の条件下で、 ^{35}S -メチオニンの取り込みを見たもの。（B）は（A）のサンプルをリシルエンドペプチダーゼ処理して電気泳動にかけたもの（エンドウのD1タンパク質はリジン残基を持たない）。左からの矢印は前駆体と成熟体、右からの矢印は2つの翻訳中間体の位置を示す。

の翻訳中断部位の同定を通して、光による翻訳伸長制御の分子機構とその生理的役割の解明を行っていく。一方、この翻訳制御との対比のもとで、根などの非光合成組織における転写段階での遺伝子情報発現抑制の機構についても解析を進める。

(2) D1 タンパク質前駆体C-末端プロセシングに関する解析：D1 タンパク質はそのC-末端に8-16のアミノ酸よりなる延長部分を持つ前駆体として合成され、この部分の切断除去により水分子を電子供与体として利用する光化学系Ⅱが完成する。本研究では、まず、ホウレンソウ葉緑体よりこの過程に関与する酵素を純化することに成功し、そのcDNAの塩基配列を決定した。ついで、これらの結果をもとに、基質のC-末端に相当する合成オリゴペプチドの利用ならびに *in vivo* でのD1 タンパク質の遺伝子工学的な改変により、この酵素の基質認識機構を解析した。さらに、大腸菌内で活性を持つ状態で大量に発現させた酵素を活用して、新しいタイプのプロテアーゼと考えられる本酵素の活性中心の同定および触媒機能発現の制御機構の解析が行われており、今後、これらの成果にもとづき、この酵素の作用によるD1 タンパク質のC-末端切断によってはじめて可能になる光化学系Ⅱ反応中心の強い酸化力を用いる水分解機能の発現のしくみを解明して行く予定である（図2参照）。

(3) Random mutagenesis による解析：光化学系Ⅱ反応中心の動態の解明を目的に、D1 タンパク質のランダムな改変を、*Synechocystis* sp. PCC6803株の *psbA2* 遺伝子について行い、強光条件下で選抜

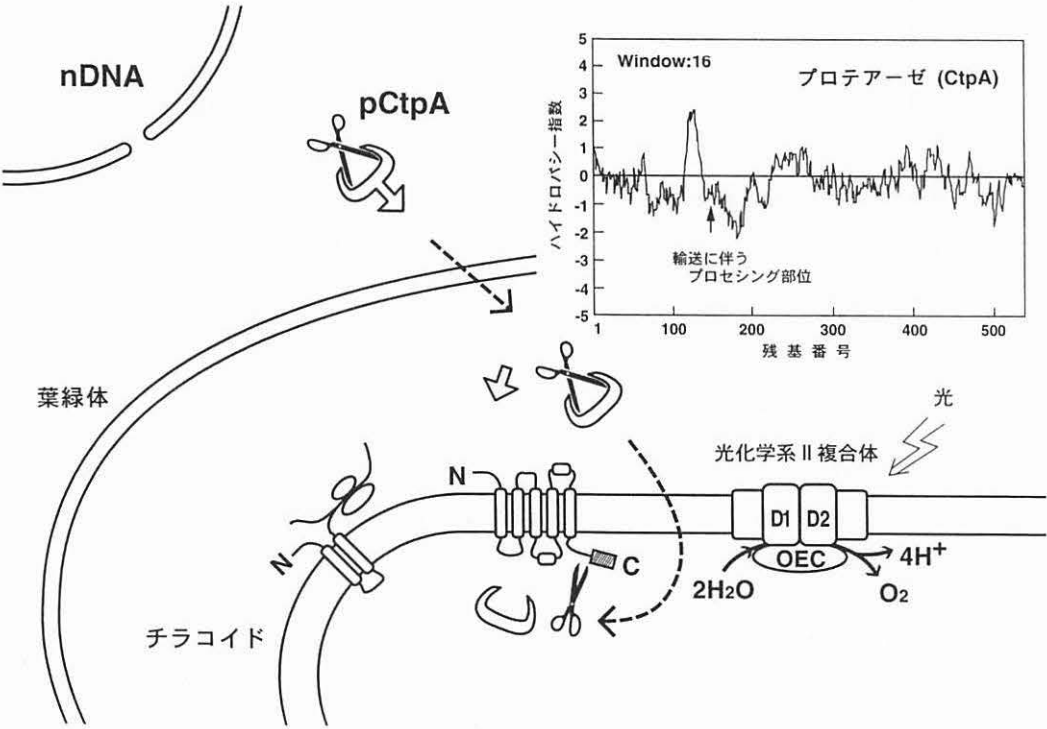


図2 D1 タンパク質前駆体C-末端プロセシング酵素の機能発現とこの酵素の作用による光化学系Ⅱ複合体の機能発現を示す模式図

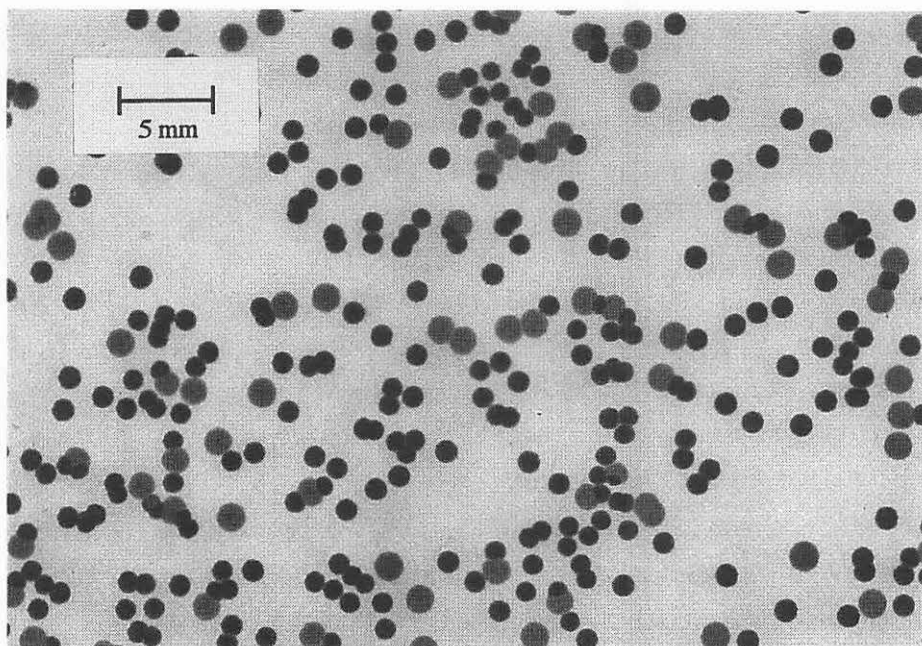


図3 *psbA* の random mutagenesis により得られた *Synechocystis* sp. PCC6803 の光耐性株の一例
 $320\mu\text{ mole photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の可視光照射下で対照株（黄緑色）と光耐性株（濃緑色）を混合培養して比較したもの。

することにより18株の光耐性株を入手した（図3；口絵6参照）。これらの変異株はD1タンパク質上に1～数カ所のアミノ酸置換が認められ、現在、これらのアミノ酸置換と表現型としての光耐性発現との間の因果関係の解明が進行中である。

参考文献

1. Noguchi, T., Inoue, Y. and Satoh, K. (1993) FT-IR studies on the triplet state of P680 in the photosystem II reaction center: Triplet equilibrium within a chlorophyll dimer. *Biochemistry* 32, 7186-7195.
2. Taguchi, F., Yamamoto, Y. and Satoh, K. (1995) Recognition of the structure around the site of cleavage by the carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein of the photosystem II reaction center. *J. Biol. Chem.* 270, 10711-10716.
3. Inagaki, N., Yamamoto, Y., Mori, H. and Satoh, K. (1996) Carboxyl-terminal processing protease for the D1 precursor protein: Cloning and sequencing of the spinach cDNA. *Plant Mol. Biol.* 30, 39-50
4. Satoh, K. (1996) Introduction to the photosystem II reaction center — Isolation and biochemical and biophysical characterization. In "Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions" (D.R. Ort & C.F. Yocum eds.) Kluwer Academic Publishers (Dordrecht), pp. 193-211