

光化学系II反応中心D1/D2と相互作用するホスファチジルグリセロール(PG714)の機能に関する研究

FUJITA, Yuji / 藤田, 勇二

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022107>

光化学系Ⅱ反応中心 D1/D2 と相互作用するホスファチジルグリセロール(PG714)の機能に関する研究

THE ROLE OF PHOSPHATIDYLGLYCEROL(PG714)
INTERACTED WITH REACTION CENTER D1/D2 OF PHOTOSYSTEM II

藤田 勇二

Yuji FUJITA

指導教員 水澤直樹

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能学領域修士課程

The crystal structure of PSII showed that one phosphatidylglycerol (PG) molecule (PG714) is located in the region between CP43 and D1/D2 heterodimer and interacts with D1-R140, D2-S230, D2-T231, and CP43-R447. To clarify the function of PG714 in PSII, we examined the effects of site-directed mutations of D1-R140L or Y, and D2-T231S or I, on the properties of PSII in *Synechocystis* sp. PCC 6803. All of the mutants obtained showed suppression of oxygen evolution in the presence of artificial benzoquinone and retardation of electron transfer from Q_A to Q_B . The levels of extrinsic proteins PsbU and PsbV were decreased in PSII monomer of the mutants, whereas that of Psb28 was increased. These results suggest that the interactions of D1-R140 and D2-T231 with PG714 are important to maintain the function of Q_B and to stabilize the binding of the extrinsic proteins to PSII.

Key Words : *Synechocystis*, *photosystem II*, *phosphatidylglycerol*

1. 緒言

光化学系Ⅱ複合体(PSⅡ)チラコイド膜中に存在する光合成酸素発生反応を担う超分子複合体である。PSⅡは反応中心のD1とD2、コアアンテナのCP47とCP43を含む17個の膜貫通タンパク質と3個の膜表在性タンパク質、Chl等の色素分子、電子受容体のプラストキノン(Q_A , Q_B)、酸素発生触媒中心のMnクラスター、脂質等様々な補欠分子から構成される。PSⅡ単量体の分子量は約350 kDaで、活性型は2量体であると考えられている。

チラコイド膜脂質には3種類の糖脂質および1種類のリン脂質であるホスファチジルグリセロール(PG)がある。シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803のPG合成欠損株(*ApgsA* 株)を用いた解析[1]から、PGは光合成的な増殖に必須であり、特にPSⅡの構造と機能およびアセンブリーに重要な役割をもつことがわかっている。

X線結晶構造解析[2]によると、PGはPSⅡ単量体あたり約5分子存在し、主にD1、D2、CP43上のアミノ酸残基と相互作用している。当研究室では、特定の部位に結合するPGの機能を明らかにするために、各PG分子と相互作用するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した変異株の光合成特性を解析してきた。これまでに Q_A 近傍に存在するPG664、PG694および Q_B 近傍に存在するPG772と相互作用するアミノ酸残基を置換した変異体の解析が行われ、

いずれのPGも Q_B の構造と機能の維持、表在性タンパク質の結合安定化に関与することが示唆された[3]。

一方、PG714はこれまでに解析されたPGとは異なり、 Q_A , Q_B とは離れた位置にあるため(各結合距離11 Å, 16 Å)、独自の機能をもつ可能性がある。構造解析によるとPG714はD1、D2、CP43の界面に存在し、D1-R140の側鎖とD2-T231の主鎖および側鎖と相互作用している(図1)。本研究では、*Synechocystis*においてD1-R140をロイシンまたはチロシンに置換した変異株(D1-R140L, D1-R140Y)およびD2-T231をセリンまたはイソロイシンに置換した変異株(D2-T231S, D2-T231I)の光合成特性を解析することで、PG714の機能を明らかにすることを目的とした。

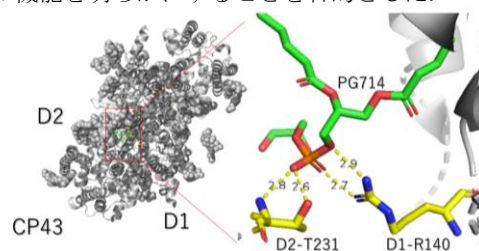


図1. PG714 と相互作用する D1-R140 と D2-T231I

2. 実験方法

Synechocystis のコントロール株(D1-pNA2, D2-pND1)と各部位特異的アミノ酸置換株は 300~500 μmol photons

m^2s^{-1} の光条件, 28°C, BG-11 培地中で培養し, 対数増殖期の細胞を増殖曲線, 酸素発生活性, クロロフィル蛍光測定等の解析に用いた. また, 大量培養した各細胞から粗精製 PS II 標品を単離し, さらにグリセロール密度勾配遠心で, PSII の二量体と単量体に分離し, SDS-PAGE(3 M Tris~7.5 M 尿素, 16~22%アクリルアミドゲルの濃度勾配) でタンパク質組成を解析した.

3. 結果と考察

(1) 増殖, 酸素発生活性, $\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{Q}_\text{B}$ 電子伝達への影響

D1-R140 変異株と D2-T231 変異株の光合成的な増殖を比較したところ, いずれの変異株でもコントロール株に比べ, 増殖遅延した.

D1-R140 変異株と D2-T231 変異株の細胞はコントロール株と同じ酸素発生活性を示した(表 1). 一方, Q_B 部位から電子を受容する 2, 5-dimethyl-1, 4-benzoquinone (DMBQ) および 2 mM FeCN を添加すると, コントロール株では活性が上がったのに対し, 変異株は逆に活性が低下した. また, 細胞から単離したチラコイド膜を界面活性剤 n-dodecyl- β -D-maltoside で可溶化して精製した PS II 標品では, 各変異株はコントロール株に比べ 40~80%程度酸素発生活性が低下していた.

表 1. 酸素発生活性

酸素発生活性 ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$)				
細胞			PS II 標品	
Strain	Net ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$)	PSII($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCBQ}$)	PSII($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DMBQ}$)	4 mM FeCN
pNA2	210	300	380	1330
R140L	210	110	230	490
R140Y	210	70	210	260
pND1	220 $\pm$ 10	340 $\pm$ 50	380 $\pm$ 70	1300 $\pm$ 160
T231S	210 $\pm$ 10	150 $\pm$ 20	150 $\pm$ 10	760 $\pm$ 90
T231I	240 $\pm$ 5.0	150 $\pm$ 20	100 $\pm$ 10	710 $\pm$ 30

閃光照射後のクロロフィル蛍光減衰で変異が与える $\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{Q}_\text{B}$ の電子伝達への影響を調べたところ, コントロール株では蛍光が速やかに減衰したのに対し, 変異株では減衰が遅延した(図 2). このことは, 変異株では $\text{Q}_\text{A}^- \rightarrow \text{Q}_\text{B}$ の電子伝達が遅延していることを示唆している.

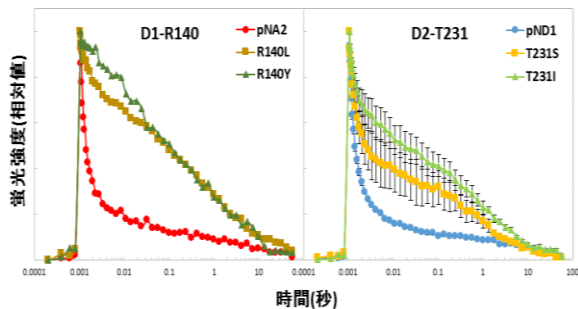


図 2. 細胞の Q_A^- 再酸化測定

(2) 表在性タンパク質の解離

各株で PS II 二量体と単量体標品のタンパク質組成を比較した. 全ての変異株は PS II コアタンパク質の CP47,

CP43, PsbO, D1, D2, PsbE をコントロール株と同様に保持していた(図 3). 一方, 全ての変異株で Mn クラスターを安定化する表在性タンパク質 PsbV と PsbU が解離していた. 特に D1-R140 変異株でその傾向が顕著で, D2-T231 変異株では解離は部分的であった. これらのことから, 変異株の PS II 標品でコントロールに比べ活性が低下した(表 1)原因は PS II 精製の過程で PsbV と PsbU が解離し Mn クラスターが流出したためであると推測された. また, 各変異株の単量体では修復に関与するタンパク質 Psb28 が増えていた.

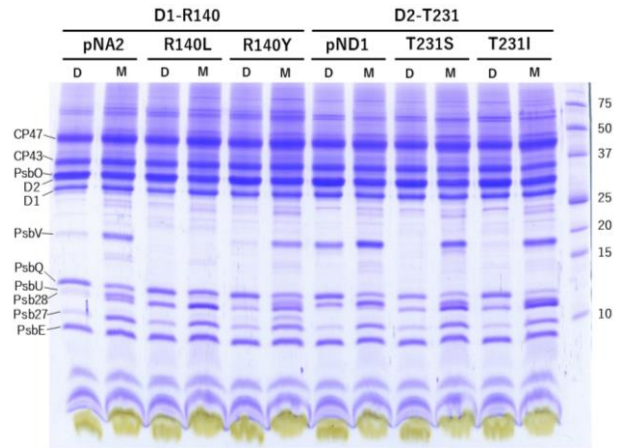


図 3. D1-R140 および D2-T231 のダイマーとモノマーの SDS-PAGE 解析

4. 結言

D1-R140 変異株および D2-T231 変異株の解析から, PG714 と相互作用するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基へ置換すると Q_A^- から Q_B の電子伝達が遅くなり, 表在性タンパク質 PsbV と PsbU が解離しやすくなることがわかった. PG714 は, 他の PG と同様に, Q_B の機能維持や表在性タンパク質の安定化に関与していると考えられる. PG714 は Q_A , Q_B や表在性タンパク質からは離れているので, これらの現象は変異の直接的な影響ではなく, 変異で誘発された周辺タンパク質の構造変化による間接的な影響と推察される. 今後は各変異株の PS II 標品を脂質分析し, 変異株で PG の欠損が起きているか調べる方針である.

参考文献

- 1) Hagio et al.(2000) Plant Physiology.124 : 795-804
- 2) Umena et al.(2011) Nature.47 : 55-60
- 3) Endo et al. (2015) Photosynthesis Research.126 : 385 - 97