The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Molecular Biological Studies of the Photosynthetic Electron Transfer Pathway in Green Sulfur Bacteria : An analysis of the electron donor side on the reaction center and a new approach to elucidate its symmetric pathway |
| Author(s) | Azai, Chihiro |
| Citation | 大阪大学, 2010, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/24883 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【2】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 浅　井　智　広（あざ い ち ひろ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（理　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２４１２３　号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 22 年 6 月 15 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第４条第１項該当<br>理学研究科生物科学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Molecular biological studies of the photosynthetic electron transfer pathway in green sulfur bacteria<br>（緑色硫黄細菌の光合成電子伝達経路に関する分子生物学的研究） |
| 論 文 審 査 委 員 | （主査）<br>教　授　福山　恵一<br>（副査）<br>教　授　長谷　俊治　　准教授　荒田　敏昭　　准教授　大岡　宏造 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

緑色硫黄細菌は、酸素非発生型光合成によって生育する絶対嫌気性の独立栄養細菌である。近年、好熱性の緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum* (*Cba.*) *tepidum* において全ゲノム配列と相同組換えによる形質転換法が確立されたことで、その光合成系の分子生物学的な解析が可能となってきた。本研究では、未だ謎の多い緑色硫黄細菌の光合成電子伝達経路の解明を目指し、分子生物学的な研究を行った。

**_in vivo_ における硫黄化合物から RC までの電子伝達経路の解析**

緑色硫黄細菌では、光合成初期反応によって光酸化した光合成反応中心（RC）は、最終的には硫黄化合物を酸化して得られる電子で再還元される。これまで還元型硫黄化合物の酸化経路と RC の再還元経路は個別に調べられてきたため、硫黄化合物から RC までの *in vivo* での電子の流れは明らかとはなっていなかった。そこで、*Cba. tepidum* において、可溶性の電子伝達体であるシトクロム（cyt）*c*-554/555 の欠失株、$S_2O_3^{2-}$の酸化に関与する SoxB の欠失株、およびその二重欠失株を作製し、電子伝達経路と硫黄酸化経路の関係性を解析した。

cyt *c*-554/555 欠失株から調製した光合成膜と精製 cyt *c*-554/555 をもちいた *in vitro* 再構成系の閃光照射実験から、cyt *bc* 複合体と cyt *c*-554/555 は RC への電子供与体としてそれぞれ独立して機能していることがわかった。一方、各変異株の生長速度と硫黄化合物の利用能力を調べた結果、cyt *c*-554/555 は主にチオ硫酸を酸化して得られる電子を、cyt *bc* 複合体は硫化物からの電子を伝達していることがわかった。以上の結果から、RC への 2 つの電子供与体はそれぞれ異なる硫黄化合物の酸化経路と結びつくことが明らかとなった。

**RC コアタンパク質への部位特異的変異導入法の構築**

緑色硫黄細菌の RC は、コアタンパク質がホモダイマー構造というユニークな特徴をもつ。その RC 内には完全に対称な 2 つの電子伝達経路が存在すると考えられており、RC における電子移動の非対称性を研究する良いモデルである。そのため、部位特異的変異体 RC の解析といった詳細な電子移動反応の解析が望まれているが、生育に必須である RC コアタンパク質（PscA）への変異導入に成功例はない。そこで、相同組換えに必須な *recA* 遺伝子のコーディング領域に変異 *pscA* 遺伝子を組み込むことで、変異遺伝子の安定な保持と *pscA* 遺伝子の偽二倍体化を同時に行う方法を考案した。

変異 *pscA* 遺伝子のモデルとして N 末端に His タグ配列を付加した *pscA* 遺伝子の導入することで、この戦略の有効性を検証した。その結果、*pscA* 遺伝子の安定な偽二倍体化と、アフィニティクロマトグラフィーによる RC 標品精製の簡便化に成功した。この RC 標品は必要な電子伝達成分をすべて保持し、安定な電荷分離活性を示した。一方、トリプシン限定分解産物の LC-MS/MS 分析から、得られた RC 標品にはタグなしと His タグ付きの PscA からなるヘテロダイマー型 RC が含まれていることがわかった。このことは、ホモダイマー型 RC を人為的にヘテロダイマー化させることが可能であることを意味する。*pscA* 遺伝子の偽二倍体化法は、緑色硫黄細菌の RC への部位特異的変異導入法として極めて有効であり、RC における非対称な電子移動反応の原理を解析するための強力なツールとなることが期待される。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

緑色イオウ細菌は光合成電子伝達系への電子の供給源として還元イオウ化合物を利用する光合成細菌である。研究の歴史そのものは古いが、標品調製の困難さから断片的な報告しかなく、光合成電子伝達系に関する知見は希薄である。

浅井智広の学位論文は３章から構成される。第１章では可溶性シトクロム*c*-554の欠失株から膜標品を調製し、反応中心への電子供与経路にはシトクロム*bc*複合体とシトクロム*c*-554からの２つの独立した経路が存在することを試験管内再構成実験により明確に示した。従来の考えとは異なる新しい経路の存在を明らかにした意義は大きい。また第２章ではチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）酸化に関わる多成分酵素系Soxの構成成分であるSoxB欠失株を作成し、可溶性シトクロム*c*-554がチオ硫酸酸化経路から反応中心への電子供与体として機能していることを証明した。微生物のイオウ代謝経路およびイオウ酸化機構に関する研究は大きく立ち遅れている領域であり、彼の研究成果は多成分酵素系Soxの反応機構を解明していく手がかりを与えた。第３章では反応中心の電子移動機構に関する閉塞した研究状況を打破し、対称的電子移動経路を新たな切り口で研究していくための実験系を報告した。具体的には変異致死となるコアタンパク遺伝子*pscA*の偽二倍体化という手法を考案し、Hisタグを付加した*pscA*遺伝子を*recA*遺伝子座に挿入した。対称的反応経路を非対称化させることも可能となる新規な実験系の提案であり、今後、光エネルギー変換の研究分野において大きなブレークスルーとなることが期待される成果である。

以上、本審査委員会は、浅井智広の博士課程における業績は緑色イオウ細菌の光合成電子伝達経路の研究を大きく発展させることに寄与するのみならず、植物光合成系の複雑な制御機構と進化的成立過程を明らかにしていく上で高く評価できると判断した。よって本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。