

好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* における環状電子伝達に関する成分の解析

生命科学専攻 植物生理学研究室 美野 晴香

Analysis of components involved in cyclic electron transport in *Thermosynechococcus vulcanus*.

目的と背景

ラン藻や葉緑体は、炭素固定活性反応も含め、様々な代謝経路において、光合成電子伝達で合成された ATP を主なエネルギー源として使用している。酸素発生型の光合成を行う生物では、そのチラコイド膜に主に 2 つの電子伝達経路を持っており、電子伝達によって形成されたチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を利用して ATP 合成を行う。電子伝達経路の 1 つは、PS II により H₂O を分解して O₂ を生じる際に奪った電子を NADP⁺ に伝達する直線状電子伝達 (非循環的電子伝達系) であり、NADPH が生成される。この NADPH は CO₂ を還元する反応 (炭酸固定反応) に使われる。もう 1 つは PS I 周辺の環状電子伝達 (循環的電子伝達系) であり、PS I から放出された電子が再び PS I に戻ることで、還元物質の生成無しにプロトン濃度勾配を形成し、追加の ATP を合成する経路である (Bendall and Manasse, 1995)。

ラン藻は PS II に比べ PS I が多く、環状電子伝達が活発に行われている。環状電子伝達の経路は大きく分けて 2 つあるとされている。1 つは PS I の P₇₀₀ からの電子が FQR (ferredoxin-quinone reductase) を通って再び PS I に戻る経路であり、もう 1 つは電子が FNR を通り NADP⁺ を還元した後それが直接、もしくはトランスヒドロゲナーゼにより NADH に変化されてから NDH (NAD(P)H Dehydrogenase) を通って PS I に戻る経路である。しかし、これらの環状電子伝達経路を構成するタンパク質については不明な点が多い。

本研究では、環状電子伝達に関わる成分の探索を行うために、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* のチラコイド膜を用いて 1) Native-PAGE と活性染色による NAD(P)H 酸化活性を持つタンパク質の探索および、2) P₇₀₀ の再還元測定による環状電子伝達に必要な成分の探索を行った。

結果

1) NAD(P)H 酸化活性を持つタンパク質の探索

環状電子伝達反応の経路は未だ不明な点が多いが、少なくとも膜結合タンパク質が関与しているのは明らかであり (Ogawa, 1991)、それは NAD(P)H 酸化活性を持つことが予想されている。このため、チラコイド膜または界面活性剤により大まかに分画した膜画分についてジアフォラーゼ活性を指標に、その分布および基質特異性について検討した。膜画分については、チラコイド膜を LDAO 処理により可溶化し、さらに遠心分離することで重い成分が含まれる画分 (1) と、軽い成分が含まれる画分 (2) に分けて活性を測定した。

・ Native-PAGE と活性染色

チラコイド膜、画分 (1)、画分 (2) を Native-PAGE で分離後、活性染色を行った (Ooyabu et al, 2008)。緑色のバンドが 3 つ分離して来たが、クロロフィルタンパク質複合体が分離する位置に見られた。これらの活性は、LDAO 処理で膜を分画した際、軽い画分である、画分 (2) に分離されてきた。この画分において活性の高い画分は PS I の緑色のバンドであり、NADPH に対して特異性が高かった。したがって、NADPH 酸化活性を持つタンパク質は PS I 複合体に結合して超分子複合体を形成している、もしくはそれと同じくらいの分子量を持っていると考えられる。

・ SDS-PAGE

各画分において NAD(P)H 酸化活性を持つバンドが確認できたため、Native-PAGE で分離した複合体を SDS-PAGE で二次元に展開し、各バンドの成分の同定を行った。その結果、チラコイド膜でジアフォラーゼ活性が見られたバンドには PS I, PS II 複合体を構成する成分が検出されてきた。これらのサブユニットが活性を持つとは思えず、染色されなかった未検出のタンパク質が残っている可能性がある。しかし、画分(2)における PS II 複合体のバンドでは、分子量 10 kDa 以下にスポットが検出でき、これらのタンパク質が NAD(P)H 酸化活性を持っている可能性が考えられる。

2) 環状電子伝達に必要な成分の探索

ラン藻の環状電子伝達は NDH もしくは FQR が膜成分として機能しているとされているが、それ以外に未知の可溶性成分も必要である。未同定成分を解明していくため、細胞破碎後のチラコイド膜精製過程で得られる可溶性画分をチラコイド膜画分に添加することで環状電子伝達反応を再構成することを試みた。さらにその画分を分画して有効な成分を絞り込んでいった。

・ 環状電子伝達の再構成

チラコイド膜のみの試料に光を照射すると P₇₀₀ は酸化されるが、光照射をやめた後の再還元は非常に遅かった。この測定で用いたチラコイド膜は、浸透圧ショックで比較的温和な条件で調製したチラコイド膜を更にビーズで粉碎し、PS II からの電子で P₇₀₀⁺ が還元されないようにしたものである。このようなチラコイド膜に可溶性画分を加えたところ、P₇₀₀⁺ の再還元速度は著しく速くなった。したがって溶性画分に環状電子伝達に必要な成分が含まれており、それが PS I から出た電子を再び P₇₀₀⁺ に戻していると考えられる。

・ 再構成する成分の探索

未知の成分を含む可溶性画分を硫酸アンモニウムによる塩析で分画し、一番活性の高かった 65% 硫酸上清画分をさらに疎水性クロマトグラフィーで分画したところ、30% 飽和硫酸で溶出して来る画分に P₇₀₀⁺ の再還元を促進する成分が含まれていることが分かった。これらの画分について、SDS-PAGE によりそのタンパク質の組成を調べた。その結果から 28 kDa と 7.1 kDa のタンパク質が環状電子伝達活性を促進する成分である可能性が高いことが分かった。

考察

本研究では、NAD(P)H 酸化活性を持つタンパク質、および環状電子伝達の再構成に関わる成分の探索を行った。

T. vulcanus のチラコイド膜、およびその膜を可溶化して分けた画分を Native-PAGE 後に活性染色したところ、膜結合性の NAD(P)H 酸化活性を持つタンパク質が検出された。これは異なる分子量を持つ複数の分子種が存在しており、軽い画分に PS I とともに濃縮されていた。今後、これらのタンパク質の同定を進めていく必要がある。

また、チラコイド膜に可溶性画分(上清)を添加することによって、環状電子伝達活性が促進された。可溶性画分を分画して有効成分を絞り込んだところ、環状電子伝達活性を促進する成分は 28 kDa もしくは 7.2 kDa のタンパク質であることが分かった。今後、これらのタンパク質の同定を進めていくことで、環状電子伝達経路を構成するタンパク質の同定に繋がるものと考えられる。

参考文献

- ・ Bendall, DS., Manasse, RS. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1229: 23-38
- ・ Ogawa, T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88; 4275-4278.
- ・ Ooyabu, J., Ohtsuka, M., Kashino, Y., Koike, H and Satoh, K. (2008) *Biosci. Biotech. Biochem.* 72; 3180-3188