

氏名	神保 晴彦
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記号番号	博理工甲第 1091 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Role of translation factor EF-Tu in the response of photosystem II to strong light in the cyanobacterium <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 の光化学系 II の強光応答における翻訳因子 EF-Tu の役割)
論文審査委員	委員長 教授 西山 佳孝 委員 教授 西田 生郎 委員 教授 日原由香子 委員 教授 戸澤 讓

論文の内容の要旨

Photosystem II (PSII) converts light energy to chemical energy as electrons. PSII is particularly sensitive to light and easily inactivated. This phenomenon is referred as photoinhibition. Photoinhibition is one of major factors that reduce the production of biomass in photosynthetic organisms, such as plants and cyanobacteria. Photodamaged PSII is immediately repaired by repair system. When the rate of damage to PSII exceeds the rate of repair of damaged PSII under strong light, photoinhibition becomes apparent. The repair of PSII is particularly sensitive to oxidative stress and the inhibition of repair is associated with oxidative damage to the translational elongation system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Previous study *in vitro* found that EF-Tu, a translation factor that delivers aminoacyl-tRNA to the ribosome, is inactivated by reactive oxygen species (ROS) via oxidation of Cys82, a single cysteine residue. However, the molecular mechanism of the inhibition of translational elongation remains to be clarified. In the present study, the physiological role of the oxidation of EF-Tu was examined in *Synechocystis*. Monitoring of the redox state of EF-Tu *in vivo* revealed that, under strong light, EF-Tu was rapidly oxidized to yield oxidized monomers. In this study, a transformant of *Synechocystis* that expressed mutated EF-Tu in which Cys82 had been replaced by a serine residue was generated. Under strong light at $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the synthesis *de novo* of proteins that are required for the repair of PSII, such as the D1 protein, was enhanced and photoinhibition of PSII was alleviated in the transformant. However, photodamage to PSII, as measured in the presence of lincomycin, was unaffected, suggesting that the expression of mutated EF-Tu might enhance the repair of PSII. The alleviation of photoinhibition by mutation of EF-Tu did not, however, alter cell growth under strong light, perhaps as a result of enhanced production of ROS. These observations suggest that the oxidation of EF-Tu under strong light might inhibit the repair of PSII, with the resultant stimulation of photoinhibition.

When photosynthetic organisms acclimate to strong light, PSII becomes more tolerant to strong light. It was reported that the strong-light acclimation enhances the repair of PSII in *Arabidopsis thaliana*. However, the molecular mechanisms responsible for the enhancement of the repair of PSII remains unknown. In the present study, the effects on

photoinhibition of PSII of growth under light at 10, 70, and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were examined in *Synechocystis*. Cells that had been grown under strong light at 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ enhanced the repair of PSII in *Synechocystis* without any effects on photodamage to PSII. In the acclimated cells, the synthesis *de novo* of the D1 protein was enhanced under strong light. In addition, levels of EF-Tu increased. There was a strong correlation between the levels of EF-Tu and the repair of PSII. Thus, acclimation to strong light might increase the level of EF-Tu, with the resultant enhancement of the repair of PSII.

論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、論文発表会を平成 30 年 2 月 21 日に開催し、論文内容の審査を行った。審査結果を以下に要約する。

光合成の光化学系 II は強光に対する感受性が高く、強光下で容易に失活する。この現象は光阻害と呼ばれ、強光下における光合成生物の生育阻害の要因となっている。これまでに強光下で発生する活性酸素は、光化学系 II の修復に必要なタンパク質の新規合成を阻害し、光阻害を促進させることが明らかになっている。また、*in vitro* の研究から、タンパク質合成系の構成成分である翻訳因子 EF-G や EF-Tu が酸化傷害を受けやすいことが示唆されている。しかし、これらの翻訳因子の酸化傷害と強光下におけるタンパク質合成阻害の関係は不明である。本論文では、翻訳因子 EF-Tu に着目し、強光下で EF-Tu が酸化されることや、EF-Tu の酸化標的システイン残基をセリンに改変した EF-Tu (C82S) をシアノバクテリアで発現させると、光化学系 II の強光耐性が増大することを明らかにし、EF-Tu の酸化傷害が光化学系 II の修復阻害を促進することを示している。以上の発見を踏まえ、本論文では EF-Tu を介したタンパク質合成制御と光合成の修復の関係について最新の知見をまとめている。

第 1 章では、本論文の研究背景と目的を述べている。研究背景として、強光による光化学系 II の光阻害のメカニズムを概説している。従来、強光下で発生する活性酸素が光化学系 II に直接損傷を及ぼして、光阻害が起こると考えられてきた。しかし近年、活性酸素が光化学系 II の修復を担うタンパク質合成を阻害して光阻害を促進することが明らかとなっている。これまでに、タンパク質合成で働く翻訳因子 EF-G と EF-Tu が酸化傷害を受けることが *in vitro* の研究で明らかになっている。また、EF-G を改変したシアノバクテリアでは、光化学系 II の光阻害が緩和することが示されている。本論文では、EF-Tu に着目し、EF-Tu の酸化が光化学系 II の光阻害に及ぼす影響を調べ、光化学系 II の修復における EF-Tu の役割を明らかにすることを目的としている。

第 2 章では、強光ストレス下における翻訳因子 EF-Tu の役割を記述している。強光照射した細胞を吸引ろ過法で素早く回収することによって、酸化型 EF-Tu が細胞内に存在することを明らかにした。さらに EF-Tu の標的システイン残基 Cys82 をセリンに改変した EF-Tu (C82S) をシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 で発現させた。EF-Tu (C82S) を発現した株では、光化学系 II の修復が促進し、光化学系 II の強光耐性が増大した。その要因として、D1 タンパク質など光化学系 II の修復に必要なタンパク質の新規合成が強光下で促進していることが明らかになった。したがって、EF-Tu の酸化傷害が光化学系 II の修復阻害を促進することが示唆された。一方、EF-Tu (C82S) を発現させることにより、強光下で活性酸素の発生レベルが上昇することも見られた。すなわち、EF-Tu を改変することによって、光合成の強光耐性は増大するが、一方で酸化ストレスが促進することが示唆された。

第 3 章では、光化学系 II の強光順化と EF-Tu の関係を記述している。光合成生物は強光環境に順化すると、光合成の強光耐性が増大する。*Synechocystis* sp. PCC 6803 を異なる光強度の下で生育させ、1500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光に曝して光化学系 II の強光耐性を解析した。その結果、強光順化した細胞では光化学系 II の光阻害が緩和していた。しかし、リンコマイシンの存在下では光化学系 II の光損傷は影響されなかったため、強光順化は光化学系 II の修復を促進することが示唆された。さらに、強光に順化した株では、D1 タンパク質の新規合成が強光下で著しく促進していることがわかり、強光順化によって強光下におけるタンパク質合成が活性化することが示唆された。さらに、強光順化によって EF-Tu の存在量が増大し、その存在量と光化学系 II の強光耐性との間に高い相関関係があることがわかった。EF-Tu を過剰発現させた

変異株では、強光下で光化学系 II の修復および D1 タンパク質の新規合成が促進し、光阻害が緩和した。以上の結果から、強光順化によって EF-Tu の発現が誘導され、光化学系 II の修復が促進することが示唆された。さらに、ゼアキサンチンやエキネノンなどのカロテノイドを欠損した株で光化学系 II の強光順化を解析したところ、強光順化によって光化学系 II の修復が促進したものの、その促進効果は野生株と比べて小さかった。したがって、カロテノイド量の増大も光化学系 II の強光順化に重要な役割を担っていることが示唆された。

第 4 章では、本研究の総括および今後の展望が述べられている。本研究では、EF-Tu のレドックス状態によって光化学系 II の修復が制御されると結論している。今後の展望として、EF-Tu (C82S) を発現する株において、過剰な活性酸素を活性酸素消去系酵素 SOD やカタラーゼを過剰発現させて酸化ストレスを軽減させ、細胞の強光耐性を向上させることが計画されている。さらに、カロテノイド欠損株を用いて EFTu のレドックス状態を調べ、強光順化におけるカロテノイドと EF-Tu の関係を解明することも必要である。

このように、本研究は光化学系 II の修復制御における EF-Tu の役割を解明したものであり、光合成の修復制御に関して新たな仮説を示した点でも画期的だと考えられる。これらの研究成果は、植物科学の分野で国際的に著名な学術誌 *Plant Physiology* に筆頭著者として論文が受理されている。以上、当学位論文審査委員会は本論文が博士（理学）の学位授与に十分値するものとし、学位論文として合格と判定した。