

氏名	KOLLIMALAI SAKTHIVEL		
博士の専攻分野の名称	博士（学術）		
学位記号番号	博理工甲第 720 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 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 small heat shock protein from cyanobacteria under oxidative stress conditions (酸化ストレス下におけるシアノバクテリア低分子量熱ショックタンパク質の役割)		
論文審査委員	委員長	准教授	仲本 準
	委員	教授	大西 純一
	委員	教授	円谷 陽一
	委員	准教授	金子 康子

## 論文の内容の要旨

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes that have been used as model organisms for detailed molecular analysis of oxygenic photosynthesis. Recent DNA microarray analysis showed that the small heat shock protein (sHsp) HspA is most highly expressed among major heat shock proteins under peroxide stress. However, it is not known whether it plays a role under oxidative stress. Oxidative stress is generated as a result of incomplete reduction of oxygen during photosynthesis, and thus it is important for a photosynthetic organism to protect itself against the stress. In my present study, hydrogen peroxide, one of reactive oxidative species was used in order to understand what kind of effects it exerts on cells and photosynthetic apparatus, and to evaluate the role of HspA in cyanobacteria under the oxidative stress.

### Effect of hydrogen peroxide on the *Synechococcus elongatus* strain ECT and ECT16-1

HspA has been shown to bind and prevent aggregation of denatured proteins *in vitro*. In this study, I showed that HspA plays a protective role under oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain ECT16-1, which constitutively expresses HspA. Compared with the reference strain ECT, which does not constitutively express HspA, ECT16-1 showed much better growth and viability in the presence of hydrogen peroxide. Under the peroxide stress, pigments such as chlorophyll, carotenoids, and phycocyanins were continuously reduced in ECT, but in ECT16-1 they decreased only during the first 24 h of stress; thereafter no further reduction was observed. These results indicate that HspA protects cells and photosynthetic apparatus under the stress directly or indirectly.

### Stabilization of phycocyanins by HspA in the presence of hydrogen peroxide

*In vivo* phenotype studies showed that decrease in the cellular phycocyanin level was suppressed in ECT16-1. In order to study the effect of hydrogen peroxide on the components of phycobilisome (PBS), I analyzed proteins from stressed cells by SDS-PAGE. Phycocyanin  $\alpha$ , phycocyanin  $\beta$  and allophycocyanins were greatly reduced in the

stressed ECT cell, but in the ECT16-1 the level of these proteins was constant until the end of the 72 h stress period, after a moderate reduction during the first 24 h period. Non-pigmented linker polypeptides of PBS were more rapidly lost in ECT than in ECT16-1, and became absent after 72 h in ECT cells. *In vitro* studies with purified HspA and phycocyanins further proved that HspA protects phycocyanins in the presence of hydrogen peroxide.

#### **Stabilization of photosystem I (PSI) and PSII by HspA in the presence of hydrogen peroxide**

Phenotype studies described above showed that decrease in the cellular chlorophyll level was suppressed in ECT16-1. The results indicate that degradation of photosystems is suppressed in the strain since chlorophylls are mostly present in PSI and PSII. The level of PSI and PSII isolated/separated from the peroxide-stressed ECT by sucrose density gradient centrifugation and blue native-PAGE appeared to be more reduced than that from the stressed ECT16-1. When purified PSI was incubated in the presence of hydrogen peroxide at 30°C, it was degraded and a degradation product of PsaB was detected by Western blot analysis. *In vitro* studies with purified HspA,  $\alpha$ -crystallin, other heat shock proteins and PSI showed that HspA and  $\alpha$ -crystallin, a eukaryotic sHsp, protect PSI in the presence of hydrogen peroxide.

#### **Conclusion**

All my above *in vivo* and *in vitro* experiments showed that the target proteins/complexes such as phycocyanin, PSI and PSII are protected by the small heat shock protein HspA in cyanobacterial cells under peroxide stress.

## 論文の審査結果の要旨

当学位論文審査委員会は、2009年2月18日に埼玉大学理学部3号館で論文発表会を公開で開催した。発表会には学位論文審査委員会委員のみならず、分子生物学コース後期課程担当教員も多数出席し活発な質疑応答に加わった。以下に論文審査結果を要約する。

シアノバクテリア(ラン藻あるいは藍色細菌ともよばれる)は、高等植物と同様に二種の光化学系からなる光合成電子伝達系をもち、光エネルギーを用いて水を分解して還元力を得る酸素発生型の光合成を行う原核生物である。強光、高温・低温やその他のストレス条件下で、光エネルギーの吸収量が光合成系で消費されるエネルギーの量を上回る(光エネルギー過剰状態になる)と、過剰な光エネルギーにより、光化学系Iや光化学系IIにおいて、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素や一重項酸素が生成する。光強度や温度の変化は避けがたく、シアノバクテリアは、これらの活性酸素によって引き起こされる酸化ストレスに抗するために種々の防御機構を獲得し、多様な環境に適応し地球上に広く分布するようになったのではないかと考えられる。防御機構としては、活性酸素消去系や過剰な還元力の消去系などが詳細に解析されているが、酸化ストレス下におけるタンパク質損傷の抑制や損傷を受けたタンパク質の修復も重要である。米国のShermanら(2004)はDNAマイクロアレイを用いた転写産物の網羅的解析により、過酸化水素存在下で、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の種々の分子シャペロン遺伝子が誘導されることを明らかにした。これらの分子シャペロンの中でも低分子量熱ショックタンパク質(sHsp)の発現が最も著しく誘導された。分子シャペロンは、ストレス条件下ではその発現レベルが増大し、変性タンパク質の凝集を抑制したり、天然構造への巻き戻しを促す。従って、sHspは、シアノバクテリアが酸化ストレスに対する耐性を獲得する上で重要な役割を果たしているのではないかと考えられるが、酸化ストレス耐性に果たすsHspの生理的役割の重要性の評価やsHspが防御する標的タンパク質(複合体)に関する報告はない。なお、sHspは生物界に普遍的に存在するHspであるが、Hsp60やHsp70に比べるとその生理機能に関して最も「なぞの多い」Hspである。

Sakthivel氏は、シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 とそのsHsp構成的発現株を実験材料にして、シアノバクテリアの(過酸化水素存在下で引き起こされる)酸化ストレス耐性獲得に果たすsHspの役割を検証し、sHspがフィコビリソームや光化学系などの光合成装置の損傷を抑制することを明らかにした。学位論文の概要は以下の通りである。

序論では、集光性超分子フィコビリソーム、光化学系、主要分子シャペロン、sHsp、酸化ストレス等に関する論文が詳しく紹介されている。

最初にSakthivel氏は、我々の研究室で構築されたHspA(シアノバクテリアのsHsp)を構成的に発現する変異株(ECT16-1株)を用いて、この株が過酸化水素により引き起こされるストレスに対する抵抗性を示すかどうかを評価した結果を報告している。ECT16-1株は *Synechococcus vulcanus* のsHspをコードする *hspA* 遺伝子を構成的発現ベクターにクローニングして、PCC7942株に導入したものである。対照株として、ベクターのみを導入したECT株が用いられた。各株を過酸化水素存在下で培養し、生育と生存率に加え、細胞の吸収スペクトルを経時的に解析することによりクロロフィル、フィコシアニン、カロテノイド等の(細胞当たりの)光合成色素量を分光学的に解析した。その結果、ECT株が生育せず、3日後の生存率も3%まで減少した1mM過酸化水素存在下で、ECT16-1株は生育し、その生存率の減少も29%に留まった。また、ECT株の光合成色素はすべて著しく減少したのに対して、ECT16-1株ではこのような減少はほとんど生じなかった。Sakthivel氏は再現性等を調べるために、1mM以外の種々の過酸化水素濃度下でも、ECT16-1株のストレス耐性が増大していることを確認した。HspAの発現によりECT16-1株における他の主要分子

シャペロンの発現は影響を受けていなかったことから、上記のストレス耐性の獲得は HspA の構成的発現の直接的な結果であることが示唆された。また、上記の結果は、HspA が細胞防御のためにフィコシアニンや光化学系色素タンパク質複合体の損傷を防いでいることを示唆するものである。

次章では、HspA がフィコシアニンの安定性を増大させることを *in vivo* と *in vitro* の両面から示した結果について述べている。まず、細胞抽出液中のタンパク質を SDS-PAGE で解析することにより、過酸化水素処理した ECT 株では、フィコシアニンに加え、アロフィコシアニン、リンカーポリペプチドなどのフィコビリソームを構成するタンパク質が減少することを明らかにした。これは、フィコビリソーム超分子が、過酸化水素存在下で不安定化し、分解されることを示すものである。これに対して、ECT16-1 株ではこのようなフィコビリソーム構成タンパク質の分解はほとんど生じなかった。Sakthivel 氏は、PCC7942 株の HspA とフィコシアニンをカラムクロマトグラフィー等により精製し、過酸化水素処理によりフィコシアニンの光吸収が減少することと、この減少を HspA が抑制することを明らかにした。

最後に、HspA が光化学系 I や光化学系 II の安定性に及ぼす影響を *in vivo* と *in vitro* の両面から解析した結果を報告している。まず、ショ糖密度勾配遠心法や blue-native PAGE など、過酸化水素存在下で、ECT16-1 株に比べて ECT 株では光化学系 I や光化学系 II 複合体が減少していることを示唆する結果を得た。界面活性剤で可溶化した光化学系 I を銅をキレートした樹脂を用いて精製した。この光化学系 I を用いて、過酸化水素存在下でクロフィルの光吸収が減少する条件をまずもとめ、この条件下では、光化学系 I 反応中心を構成する PsaA/PsaB サブユニットが分解すること、この分解を HspA や真核生物の sHsp の一つであり詳しく解析されている  $\alpha$ -クリスタリンなどが抑制することを明らかにした。光化学系 II に関する結果の一部については、論文審査委員会委員の一人から削除・改訂すべき箇所が指摘されたので、指摘に従って改訂された。

上述のとおり本論文は学術的に新規で有意義な研究結果を含んでいる。これらの一部は既に国際誌に掲載あるいは採択されている。どちらの論文においても Sakthivel 氏が第一著者である。以上のことから、本学位論文審査会は、本論文を博士(学術)の学位を授与するに値するものと判断し、合格とした。