

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07112

研究課題名(和文) 光化学系2複合体の構築過程の解明

研究課題名(英文) Assemblage process of photosystem II complex

研究代表者

菓子野 康浩 (Kashino, Yasuhiro)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：20221872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：光の力を使って水を分解して酸素を発生する光化学系IIの構築過程の解明に取り組んだ。光照射によって光化学系IIの構築が開始されるモヤシのような独自のシアノバクテリアを用い、構築の過程のみに関与することが見出された複数のタンパク質の中でもとくに3種類が安定的な系IIの構築にとくに重要であることが判明した。また、そのような構築の過程のみに関与するタンパク質が欠失しても機能が代替され、構築の仕組みが極めて柔軟であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Photosystem II (PSII) is a multi-protein complex containing ~20 membrane proteins that converts water to oxygen. Assembling process of PSII was investigated in this work using a uniquely developed strain that starts accumulation of PSII upon light illumination. Among several proteins that were found to be responsible for only assembling process, three proteins were especially important for the stable accumulation of functional PSII. Further, it was revealed that the assemblage machinery was very flexible such that inactivation of individual gene responsible for the assemblage of PSII was complemented by some unknown mechanism.

研究分野：光合成学

キーワード：光化学系II タンパク質複合体の構築 クロロフィル合成 シアノバクテリア

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光化学系IIは光エネルギーにより駆動され、水を分解し、酸素を発生するとともに還元力を持った電子を生み出す。その反応の場である系II複合体は、15種類以上の膜タンパク質と3-5種類の膜表面タンパク質、さらに36分子のクロロフィルや4原子のマンガン、1原子のカルシウム等のコファクターから構成される膜タンパク質複合体であり、機能的構造体とされる二量体の分子量は約500,000にもなる(Umena et al. *Nature* [2011])。単量体構造のほぼ中央に、光により電荷分離を起こす反応中心が位置する。その反応中心を構造的に支えるのはD1/D2と呼ばれるふたつの反応中心タンパク質である。光は系II反応の駆動力として必須であるが、反応中心タンパク質のひとつ、D1タンパク質は光により容易に損傷することが知られている。その代謝速度は非常に速く、約3時間である。D1タンパク質が損傷すると、系II複合体は単量体に解体され、D1を入れ替えた後に再び二量体化し、機能を回復すると考えられている(Aro et al. *J Exp Bot* [2004]、Komenda et al. *J Biol Chem* [2006]等)。このように、系II複合体の機能的構造が解明され、損傷を受けたときの修復過程についても研究が進められている。しかし、系II複合体が構築される仕組み、その構築過程に関わるタンパク質とその役割など、系II複合体の構築過程のほとんどはまだ不明である。そこで、本研究代表者は、系II複合体の秩序だったライフサイクルの全貌を明らかにすることを目的として、増殖速度の速いシアノバクテリアを用い、研究を続けてきた。系IIの構築最初期の姿を捉えるためには、その未成熟段階の複合体を精製し、解析する必要がある。しかし、そのような複合体は、生体内にはごくわずかしが含まれず、精製が困難である。そこで、モヤシにヒントを得て、「モヤシ化」シアノバクテリア(ここではMYS株と記す)を作出し、解析する方法を考案した。そして、光照射により系II複合体の構築を計画的に誘導することに成功し、構築の初期段階にある複合体を精製することができた。系IIの反応中心複合体は、D1/D2/PsbI/PsbE/PsbFの5種のサブユニットで構成されるので、まずこれらが反応中心クロロフィル等を配位しつつ集合するというシナリオが当然考えられる。しかし、MYS株を使うことにより、PsbE/PsbFが会合する前にPsbHが結合することが判明した。さらに、そのD1/D2/PsbI/PsbHには、SII1398やSIr0399タンパク質等、約10種の機能未知タンパク質が結合していることが見出された。これらの機能未知タンパク質は、系II構築の初期段階で足場や構築補助役として働いている可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

研究代表者によるこのような研究に基づき、新規に見出している約10種類の機能未知タンパク質の機能解析などを通して、系IIが水分解・酸素発生反応という機能を発揮するまでの成熟過程を解明することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、葉緑体の祖先とされるシアノバクテリアの一種、常温性の*Synechocystis* sp. PCC 6803を用いた。細胞の定常状態では、系II複合体の大部分は正常であり、構築途中の系II複合体は非常に少ない。細胞内に多量に含まれる成熟型系II複合体による影響を避けて、構築途中の系II複合体の構成成分解析を実施するだけの量を精製するために、モヤシにヒントを得て光照射によりクロロフィルの合成を始めるMYS株を作出しておいた。*Synechocystis* 6083はグルコースを使って従属栄養的に、つまり光照射なしで培養し増殖させることができる。1週間以上暗所で培養して細胞数が増加した後、光を照射することでクロロフィルの合成が開始され、それにより系IIの構築も開始されることを確認済みである。本研究では、この株を用いた。

系II構築初期の複合体であるD1/D2/PsbI/PsbHに結合していることが見出された機能未知タンパク質(SIr0172、SII1398、SIr1128、SII1099、SIr0399、SII1390、SIr0013、SIr0483、SIr0073、SII1106、SIr0670、SIr1739)について、それぞれの遺伝子の欠失変異体を作成した。これらの株を用いて、遺伝子の欠損が増殖特性に与える影響や、光化学系IIの蓄積量に与える影響を解析した。系II複合体の蓄積量は、主に液体窒素温度での蛍光スペクトルにより評価した。光合成活性は、パルス強度変調蛍光法を用いて光合成曲線を測定し、最大電子伝達速度(ETR<sub>max</sub>)で評価した。また、それぞれのタンパク質のC末端にHistidine-tagを融合した変異株を作成した。それらの変異株を生理的条件下で培養し、あるいは暗所で培養した後短時間の光照射の後に、細胞から膜を調製して界面活性剤で可溶化した後、アフィニティークロマトグラムによりHistidine-tag融合タンパク質を精製した。電気泳動等により組成解析を行った。

### 4. 研究成果

上記の新規機能未知タンパク質の遺伝子破壊のためのコンストラクトプラスミドを作製し、形質転換を進めた。細胞内にはゲノムが10コピー含まれているので、欠失変異体を作成するためには全てのゲノム上の対象遺伝子を破壊しなくてはならない。SII1099については、野生株でも完全変異化に至ることができなかったため、系IIの構築あるいは生存に必須の

因子である可能性が高いと考えられる。その他の破壊株について増殖特性を測定すると、初期倍加時間は概ね誤差の範囲で顕著な遅延は観察されなかった。その中でSlr0172は、共発現ネットワーク解析で系Iの生合成に関わるBtpAとの関連が示されているタンパク質であるが、その欠損株 ( $\Delta$ Slr0172株) の増殖速度が野生株に比べて遅く、また、最大細胞密度が野生株に比べて小さかった (図1)。しかし、増殖曲線を730 nmでの濁度で評価すると $\Delta$ Slr0172株は野生株と遜色のない増殖を示す結果となり (図2)、細胞密度での評価と異なった。 $\Delta$ Slr0172株は、野生株に比べて細胞が顕著に大きかったため、濁度では野生株と同様の増殖速度で増殖するように観察されたものと考えられる。細胞の大きさが通常細胞よりも大きくなった原因については、現在

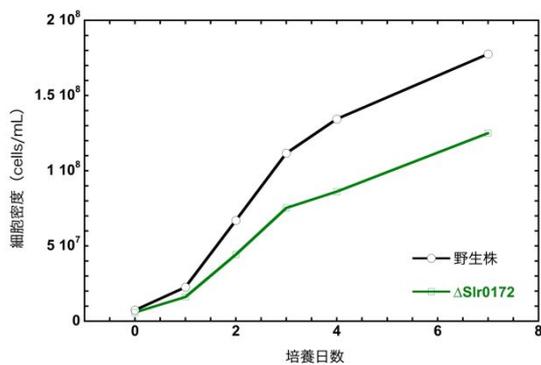


図1. 細胞密度で評価した細胞の増殖

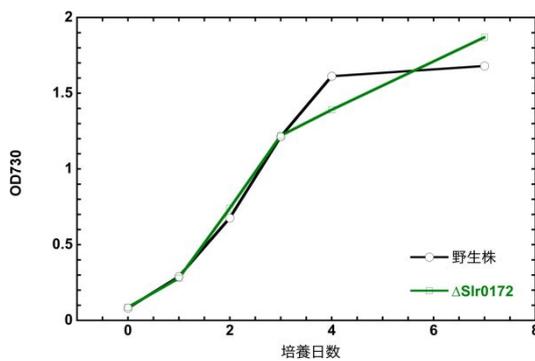


図2. 濁度で評価した細胞の増殖

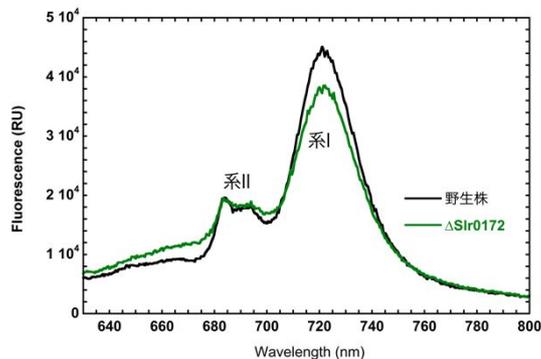


図3. 蛍光スペクトルで評価した系IIの蓄積量。

までのところ不明である。一方、培養5日目の細胞内の系IIの蓄積量を調べると、系Iよりもやや多い結果となった (図3)。Slr0172タンパク質が機能しないことで、系II構築・蓄積過程の調節に何らかの障害が起こった可能性が考えられる。

また、Slr1739の欠損株 ( $\Delta$ Slr1739) も増殖特性に若干の影響が見られた (図4)。 $\Delta$ Slr1739と野生株の光合成電子伝達活性を測定比較してみると、いずれも培養後期には活性が低下したが、 $\Delta$ Slr1739の方が早い段階から活性の低下が見られた (図5)。系IIは頻繁に修復が行われる複合体なので、系IIの構築と修復に共通の仕組みに障害が起こっているか、系IIの構造が不安定になっている可能性が考えられる。そして、培養後期の高温条件では増殖が困難な場合が見出されたことと

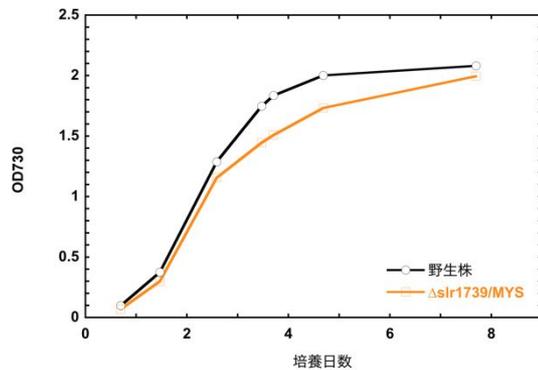


図4.  $\Delta$ Slr1739株の増殖

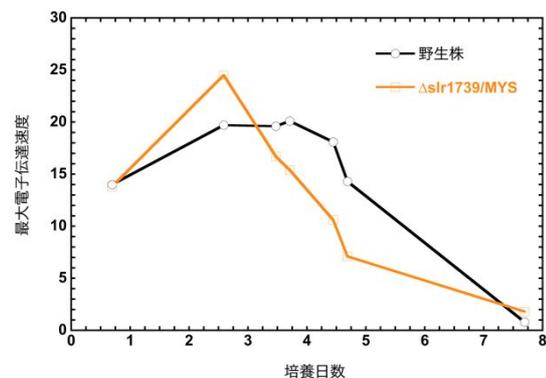


図5.  $\Delta$ Slr1739株の増殖過程での活性変化

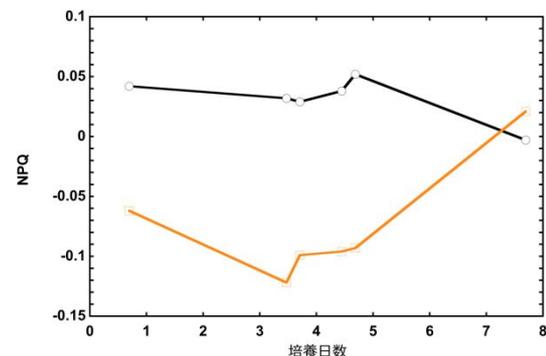


図6. 光化学系の保護機構活性 (NPQ) の増殖過程での変化。

合わせて考えると、Slr1739が機能しなくても正常な系IIが構築されるものの、安定的な系IIの構築には不可欠であることが示唆された。さらに、光化学系を強光から保護する機能の活性の指標となるNPQ (non-photochemical quenching) は、培養初期から極めて小さな値となった(図6)。これは、保護機構あるいは系IIの機能そのものの一部が健全には機能しておらず、系IIの構造が不安定になっていることと関連があると考えられる。

また、光合成色素結合タンパク質の精製を進める過程で、界面活性剤 dedecyl-D-maltoside (-DDM) を用いて膜タンパク質を可溶化すると、従来用いた -DDM に比べ、より健全に複合体を精製することが可能になる場合もあることが分かってきた。そのため、すでに作出したHis-tag融合変異株を用い、-DDMによる可溶化を行い、構築初期にある系II複合体の精製条件の検討をおこなった。しかし、この場合、明瞭なアドバンテージは認められなかったため、データの比較性を考慮し、-DDMを用いて解析をすることにした。さらに、タンパク質の網羅的解析には等電点電気泳動を用いた二次元電気泳動が多用されるが、一般に用いられる等電点電気泳動では系II複合体のような膜タンパク質が分離されない。そこで、構築過程にある系II複合体を構成するタンパク質の網羅的解析のために、DNAのような巨大分子の分離にも使われるアガロースを用いた等電点電気泳動の改良に取り組み、膜タンパク質を分離するための目安となる条件を絞り込むことができた。

そして、MYS株を親株としたHis-tag融合変異体の暗所培養細胞からタンパク質の精製を行い、組成の解析を進めた。例えば、Slr0399のC末端にHis-tagを融合させた場合(Slr0399-His/MYS株)、精製後にはそれらのタンパク質以外にも複数のタンパク質が含まれていたため(図7)、それらのタンパク質と複合体を形成していることが示され、他タンパク質との強い相互作用が明らかとなった。また、Slr0172はアミノ酸配列から水溶性タンパク質と予想されるが、膜(タンパク質)に結合して機能しているということも改めて示された。

このように、標的としたタンパク質と膜タンパク質複合体との強い相互作用が認められる反面、たとえば、Slr0399やSlr11398などの欠失変異体( $\Delta$ Slr0399、 $\Delta$ Slr11398)で観察されたように、増殖が野生株と比べて著しく遅くなる例は少なかった。また、液体窒素温度での蛍光スペクトル測定によると、通常培養条件下では成熟型系IIの顕著な低下は認められなかった。そのため、これらタンパク質が機能しない状況下では、現時点ではどのよう

なタンパク質かは不明であるが、未知の他のタンパク質が系IIの構築に関わる機能を代替することが予想された。この他にも、系IIの成熟複合体に含まれる複数のタンパク質との共発現が示唆されるタンパク質も見出されている。

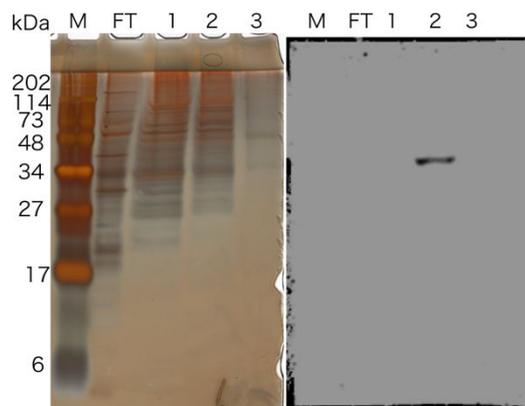


図7. Slr0399-His/MYS株からのHis-tag融合タンパク質の精製。チラコイド膜を-DDMで可溶化し、Niアフィニティークロマトグラムにより精製した。左のパネルは電気泳動後の銀染色画像。右のパネルは、His-tag融合タンパク質を抗His-tag抗体で検出したもの。M, マーカー; FT, フロースルー; 1, 2, 3, 溶出画分。

このように、本研究で構想したMYS株を用いた実験系は、系IIの構築過程にある部分的集合体のタンパク質組成を解析する上で有用な系であることが改めて示された。そして、Slr11099は系IIの構築あるいは生存に必須のタンパク質であると考えられ、Slr0172やSlr1739、Slr0399は、安定的な系IIの構築にとくに重要であることが判明した。一方、系IIの構築に関わるあるタンパク質が何らかの原因で機能できない場合でも、シアノバクテリアでは未知の他のタンパク質が系IIの構築に関わる機能を代替することができ、系IIの構築の仕組みが極めて柔軟であることも明らかとなった。これはやはり、系IIが光エネルギーを生物が利用できる形に変換する非常に重要な反応系であるため、極めて精密な複合体ではあるが、細胞にとって系IIの機能を常に維持することができるような補完的仕組みも備わっていると考えることができる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

1. Makiko Kosugi, Changwoo Lee, Tomonori Misaki, Morifumi Fujita, Yasuhiro Kashino, and Takashi Sugimura (2017) Stereochemical assignment of a unique electron acceptor, polar analogue of vitamin K1 (5'-hydroxyphylloquinone), in Photosystem I, *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 3180-3188.

〔学会発表〕（計 2件）

1. 菓子野康浩、磯部明日香、富家佑妃、井上・菓子野名津子「光化学系IIの構築過程および関与因子」第6回近畿植物学会講演会、2017年
2. 上田和世、黒田洋詩、兒玉なつ美、菓子野康浩、高橋裕一郎「光化学系IIのD1タンパク質上のAsp-61のアミノ酸置換による酸素発生活性への影響の解析」第57回植物生理学会年会、2015年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/cellbio/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菓子野 康浩 (Yasuhiro Kashino)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：20221872