

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14492

研究課題名(和文)光従属栄養育成能を付与した好熱性シアノバクテリア作製による光合成研究基盤の構築

研究課題名(英文) Engineered Thermosynechococcus elongatus mutant growing under photoheterotrophic conditions

研究代表者

杉浦 美羽 (Sugiura, Miwa)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：80312255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：光合成によるエネルギー変換および水の酸化は非常に効率的であり、これらの分子機構を理解することは、学術的な重要性のみならず、エネルギー問題解決に応用する上でも非常に重要な課題である。光合成の初発反応を担う光化学系II複合体の構造や機能の理解はこの15年で大きく進んだが、水の酸化や電子伝達制御など、分子機構の不明な点が多い。その大きな原因の1つが、研究に適した好熱性シアノバクテリアに光合成機能を大きく変える変異を導入すると、致死するという問題であった。本研究では、光合成機能を失っても外から取り込んだ炭素源を使って生育できる好熱性シアノバクテリアを作製することに成功し、光合成研究の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Energy conversion and water oxidation in photosynthesis are quite efficiently performed in plants and cyanobacteria. Understanding about these molecular mechanisms based on the molecular structure must be important subject not only from scientific point of view but also from the view point of new energy creation. Especially understanding relationship between molecular structure and function of Photosystem II, which plays initial reaction of photosynthetic electron transfer and water oxidation, is one of the most important subject. Although analyses of site-directed mutants are quite powerful approaches, we have not obtained important mutants of thermophilic cyanobacterial because of loss of photosynthetic function by mutations. For solution of these serious problems, in this study, we established new genetic engineering system of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus*.

研究分野：生物物理学

キーワード：光合成 光化学系II 好熱性シアノバクテリア 光従属生用成長

### 1. 研究開始当初の背景

光化学系 II は光合成の初発反応を担う膜タンパク質複合体で、水の酸化と光によるコファクター間の電荷分離、および、電子伝達反応を効率良く同期する。水の酸化機能は光化学系 II のみが持つため、これらの反応機構の解明は重要な課題であり、長年多くの研究者が取り組んできた。2000年以降、1) 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を材料にすることによって解析に有利な熱安定な試料を得られるようになったこと (Sugiura & Inoue, 1999)、2) *T. elongatus* の遺伝子組換えが可能になり、機能に関わると推測する部分の構造を変えた試料を作製して解析が可能になったこと (Sugiura ら, 2000)、3) 光化学系 II の分子構造が明らかにされたこと (Umena ら, 2011) により、水の酸化反応の全体像や電子伝達キャリアの還元電位と構造の関係などが分かってきた。しかし、これらの詳細を分子レベルで調べるために、例えば、特定の反応速度を遅くしたり、還元電位を大きく変えることを目的としてアミノ酸置換を施すと、*T. elongatus* は光合成でエネルギー変換できずに致死するために、試料が得られないという深刻な問題があった。従って、研究開始当初は、他の方法でエネルギーを得て生育できる組換え体を作製して光合成研究基盤を作ることは、非常に重要、かつ、緊急を要する課題であった。

### 2. 研究の目的

光化学系 II は光合成の初発反応を担う膜タンパク質複合体で、水の酸化と光によるコファクター間の電荷分離、および、電子伝達反応を効率良く同期する。水の酸化機能は光化学系 II のみが持つため、これらの反応機構の解明は重要な課題であり、長年多くの研究者が取り組んできた。2000年以降、1) 好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を材料にすることによって解析に有利な熱安定な試料を得られるようになったこと (Sugiura & Inoue, 1999)、2) *T. elongatus* の遺伝子組換えが可能になり、機能に関わると推測する部分の構造を変えた試料を作製して解析が可能になったこと (Sugiura ら, 2000)、3) 光化学系 II の分子構造が明らかにされたこと (Umena ら, 2011) により、水の酸化反応の全体像や電子伝達キャリアの還元電位と構造の関係などが分かってきた。しかし、これらの詳細を分子レベルで調べるために、例えば、特定の反応速度を遅くしたり、還元電位を大きく変えることを目的としてアミノ酸置換を施すと、*T. elongatus* は光合成でエネルギー変換できずに致死するために、試料が得られないという深刻な問題がある。

そこで本研究では、遺伝子組換えによ

って *T. elongatus* に細胞外から炭素源としての糖を取り込む機能を付与し、光合成以外の解糖系などでエネルギー代謝することによって、光従属栄養的に生育可能な組換え体を作製して光合成研究基盤を作ることを目的とした (図 1)。

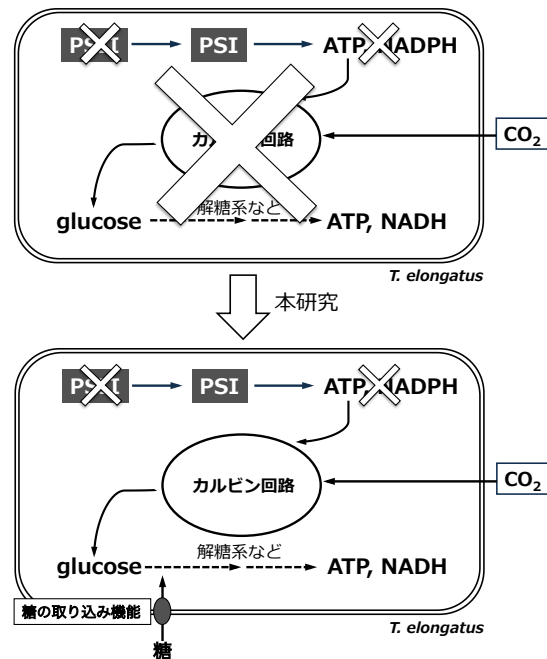


図 1 光化学系 II (PSII) が機能しなくなると、ATP と NADPH を合成できなくなり致死する (上)。本研究では、*T. elongatus* に糖を取り込む機能を付与して PSII を破壊しても生育でき、致死変異を導入しても PSII を得られる研究基盤を構築した (下)。

### 3. 研究の方法

まず、*T. elongatus* で転写可能なプロモーターの下流に、細胞外から糖を取り込む別のバクテリア由来のトランスポーター遺伝子を連結した組換え体を作製した。更に、この組換え体ゲノム DNA から 3 つ存在する光化学系 II の反応中心タンパク質 (D1) 遺伝子を完全にノックアウトして、光合成の初発反応を担う光化学系 II がなくても外から取り込んだ炭素源で生育できる「光従属栄養成長可能な」好熱性ラン藻を作製した。そして、光合成機能に決定的なダメージを引き起こす部位特異的変異を導入した D1 遺伝子を導入して培養し、光化学系 II 複合体の機能を解析した。

### 4. 研究成果

本研究は、大きく分けて、(1) 糖を取り込む機能を付与した好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* 細胞の作製、(2) 糖の取り込み機能を獲得した *T. elongatus* 変異体ゲノムから、3 つの光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 遺伝子をノックアウトした組換え体の作製、(3) (2) について、光化学系 II を構成するサブユニットタンパク質

の分析と光合成機能の評価、(4) (2)の組換え体への本来は致死を引き起こす組換えを施した D1 遺伝子の挿入による組換え体の作製と機能などの評価、の 4 段階で行った。

(1) 糖を取り込む機能を付与した *T. elongatus* 細胞の作製

*T. elongatus* ゲノムには、D1 をコードする遺伝子が 3 つ存在する。このシステムは、最終的に D1 遺伝子に組換えを挿入するため、この最初の段階では、2 つの D1 遺伝子を同時にノックアウトし、その際に、*T. elongatus* が細胞外から糖を取り込んで生育できるように、糖トランスポーター遺伝子を挿入した。組換え体を作製し、これらに光化学系 II の電子伝達を阻害する除草剤を添加して光合成電子伝達を阻害したところ、添加しないものと同様の分裂速度での生育が認められた。つまり、細胞外から糖を取り込んで、解糖系などによってエネルギー合成が可能になり、光合成機能を阻害しても生育できることが分かった。

(2) 3 つの光化学系 II 反応中心タンパク質 D1 遺伝子をノックアウトした組換え体の作製

(1)の組換え体から、更に D1 遺伝子をノックアウトした。D1 タンパク質は光化学系 II の電子伝達コファクターを結合する非常に重要なタンパク質で、これまで、糖を取り込む機能を付与しない細胞では、D1 遺伝子を 3 つともノックアウトすると致死してしまい、組換え体を得ることができなかった。本研究では、糖を取り込んで光合成以外の代謝系でエネルギー合成する組換え体を (1) で作製したので、これから完全に D1 遺伝子を除去した。培地に糖を添加して組換え体を選抜した。組換え体のゲノムを詳細に調べ、最終的に、全ての D1 遺伝子を完全にノックアウトした組換え体を得ることができた。この組換え体は、通常の培地では生育しなかったが、糖を添加した培地では、野生型と殆ど同じ速度で生育した。

(3) 光化学系 II を構成するサブユニットタンパク質の分析と光合成機能の評価

(2) で得られた組換え体の、光化学系 II 複合体タンパク質について調べた。D1 タンパク質は 20 サブユニットから構成される光化学系 II 複合体を構成する 1 つのサブユニットであるが、この組換え体においては、D1 のみならず、他の光化学系 II を構成するタンパク質についても検出されず、D1 をノックアウトすることによって、チラコイド膜上に光化学系 II 複合体が形成できないことが分かった。しかし、細胞のクロロフィルの 2 つの吸収バンド波長がシフトしており、抗体染色等で詳細に調

べたところ、クロロフィル結合タンパク質 CP43' が大量に発現していたことが分かった。次に光合成機能の評価するために、水の酸化機能を測定したところ、酸素の発生は全く認められず、光合成の初発反応である水の酸化機能を失っていることが分かった。また、光化学系 II の電子伝達の一部である  $Q_A$  から  $Q_B$  への電子移動を調べたところ、電子移動は認められず、 $Q_A$  の存在を示す吸収極大も得られなかった。更に、もう一方の光合成タンパク質複合体である光化学系 I について調べたところ、野生型と同じレベルで存在しており、 $P_{700}^+$  の還元を捉えることができた。以上のことより、本研究によって、D1 タンパク質を失ったことにより光化学系 II 複合体のない光合成機能を失った組換え体を作製することに成功した。

(4) 本来は致死を引き起こす組換えを施した D1 遺伝子の挿入による組換え体の作製と評価

(3) の組換え体に D1 遺伝子を挿入したところ、本来の光化学系 II 複合体を作ることが分かった。更に、光化学系 II 複合体の精製と機能解析による研究基盤の完成かどうかの評価をするために、電子伝達コファクターである D1 の 161 番目の Tyr を Phe に変えた組換え体を作製した。組換え体が得られ、光化学系 II のタンパク質は認められたものの、水の酸化活性は失っていた。以上のことから、本研究によって、*T. elongatus* に糖を取り込む機能を付与し、「機能を失った光化学系 II 複合体を得られる」新しい組換え系が成功した。この系は、今後の光合成研究を大きく発展させていくことになるかと期待できる。

現在は、この系を用いて、更に組換え体を得ることのできなかった、光化学系 II のコファクターの酸化還元電位を大きく変えた組換え体を作製し、これらを使って、光合成機能と構造との関係について、詳細に研究しているところである。

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 4 件)

1. Motomura, T., Suga, M., Hienerwadel, R., Nakagawa, A., Lai, T.-L., Nitschke, W., Sugiura, M., Boussac, A. and Shen, J.-R.

Crystal structure and redox properties of a novel cyanobacterial heme-protein with a His/Cys heme axial ligation and a per-arnt-sim (PAS)-like domain, *J. Biol.*

- Chem.* (2017) *in press* (査読あり)
2. Sugiura, M., Ozaki, Y., Rappaport F., and Boussac A., *Corrigendum* to “Influence of Histidine-198 of the D1 subunit on the properties of the primary electron donor, P<sub>680</sub>, of Photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*”, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2016) 1857, 1943-1948 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbabi.2016.09.012
  3. Boussac, A., Rutherford, A.W, and Sugiura, M., Electron transfer pathways from the S<sub>2</sub>-states to the S<sub>3</sub>-states either after a Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> or a Cl<sup>-</sup>/I<sup>-</sup> exchange in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus*., *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2015) 1847, 576-585 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbabi.2014.11.009
  4. Sugiura, M., Nakamura, M., Koyama, K., and Boussac, A., Assembly of oxygen-evolving Photosystem II efficiently occurs with the apo-Cytb<sub>559</sub> alone but the holo-Cytb<sub>559</sub> increases the recovery rate of a functional enzyme upon photo-inhibition. *Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)*, (2015) 1847, 276-285 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.bbabi.2014.11.009

[学会発表] (計 5 件)

1. Miwa Sugiura, Molecular function and structure of Photosystem II in photosynthetic electron transfer, Solar Fuel Material –Maltiscale and Bioinspired Approach in Catalyst- (23-24, February, 2017, Seoul National University, Korea) 招待講演
2. Miwa Sugiura, Role of D1-Pro173 of Photosystem II in Water Oxidation, 7<sup>th</sup> International Conference Photosynthesis Research for Sustainability-2016 (19 – 25,

- June, 2016, Pushchino, Russia) 招待講演
3. Miwa Sugiura, Molecular structure relating to rate of water oxidation and electrontransfer in Photosystem II, The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (15-18, November, 2015, Taipei, Taiwan) 招待講演
4. Miwa Sugiura, Effects of Structural Modification around Tyr<sub>Z</sub> and D1-His190 on Proton-coupled Electron Transfer in Photosystem II, International Symposium 2015- Protonation Dynamics in Redox Proteins (16-19, September, 2015, Freie Universität Berlin, Germany) 招待講演
5. Miwa Sugiura, Engineered *Thermosynechococcus elongatus* mutant growing under photoheterotrophic conditions, Gordon Research Conference: Photosynthesis: The Dynamics and Regulation of Photosynthesis: From the Origin of Biocatalysis to Innovative Solar Conversion (28 June - 3 July, 2015, Boston, U.S.A.) 招待講演

[図書] (計 1 件)

1. 杉浦 美羽, 光合成のエネルギー変換と物質変換 ～人工光合成をめざして光合成研究を支える研究手法「部位特異的変異導入による光化学系の分子構造と機能の解析」、化学同人 (2015) pp.266-274

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 美羽 (SUGIURA Miwa)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・  
准教授

研究者番号：80312255

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

Fabrice Rappaport

フランス国立科学研究所 IBPC 研究員

Alain Boussac

フランス国立科学研究所 CEA/Saclay

主席研究員