

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14551

研究課題名(和文) テイラーメイドペプチドタグを融合した光化学系I複合体のエネルギー生産装置への応用

研究課題名(英文) Application of energy conversion apparatus consisting of photosystem I complex fused with tailor-made peptide tag

研究代表者

高橋 裕一郎 (Takahashi, Yuichiro)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授

研究者番号：50183447

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)：光照射下で光合成タンパク質に電力を生成させる葉緑体電池のプロトタイプの実験を進めた。金電極に親和性をもつペプチドタグをバイオパニング法により作成し、それを融合させた光化学系Iタンパク質を発現する葉緑体形質転換体を緑藻クラミドモナスを用いて作出した。タグを融合した光化学系I複合体を単離し、金電極に配向させて結合させることに成功した。人工的電子供与体存在下で光照射したところ、タグを融合しない野生型の光化学系I複合体はほとんど電力を発生しなかったが、タグを融合した複合体は電力を発生した。葉緑体電池の作製にペプチドタグを融合させる本手法は有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We have developed a chloroplast battery cell which consists of photosynthetic proteins bound to an electrode and produces electricity under illumination. Peptide tags (Au-tags), which have an affinity to gold electrodes, have been screened by the bio-panning method using T7 bacteriophage. We genetically fused the resulting tags to one of the photosystem I (PSI) reaction center proteins and expressed it in the chloroplast of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. The PSI complex containing an Ag-tag was purified and was bound to the electrode, resulting in the chloroplast battery cell. We measured electricity of the chloroplast battery cells with wild-type and Au-tag fused PSI complexes in the presence of artificial electron donors under illumination. It was found that only the chloroplast battery cell of Au-tagged PSI complex exhibited electricity. In conclusion, our strategy to use affinity peptide tag to bind PSI complex on the electrode is effective and useful.

研究分野：植物生理学

キーワード：光合成 光化学系I 葉緑体形質転換 葉緑体電池 アフィニティータグ

1. 研究開始当初の背景

光合成の光化学系は多数の光合成色素とサブユニットを含む複合体を形成し、光を捕集するアンテナと光化学反応を引き起こす反応中心から構成され、量子収率1の高効率で光エネルギーを酸化還元エネルギーへ変換する。光化学系複合体が引き起こす光化学反応から直接電力を取り出す葉緑体電池、光化学系複合体が生成する還元力を利用した水素発生装置の研究はこれまでに活発に行われてきた。しかし、複合体を無機素材へ向きを揃えて結合させることは難しく、高効率の葉緑体電池や水素発生装置は実現していない。従って、無機素材に光化学系複合体を効率的に配向させる基盤技術の開発がブレークスルーには必要である。

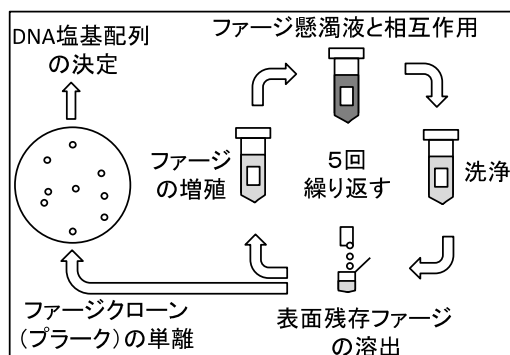
2. 研究の目的

光合成電子伝達系の光化学系は、光を利用して電子伝達反応を駆動し、CO₂ から炭水化物を生成する時に必要なエネルギーを供給する。光化学系は多数の光合成色素とタンパク質サブユニットを含む複合体を形成し、光エネルギーを酸化還元エネルギーへ変換する。この複合体を電極素材(金)に配向させて結合できれば、葉緑体太陽電池や葉緑体水素発生装置を製作することができる。本研究では、(1)ファージディスプレイ法により目的の無機素材に親和性をもつペプチドタグを単離し、(2)緑藻クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)の光化学系I複合体に遺伝子工学的にタグを融合させ、(3)タグ融合光化学系I複合体を金電極上に配列させた葉緑体太陽電池および金ナノ粒子上に配列させた葉緑体水素発生装置を作成するための基盤的技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 金親和性ペプチドタグの作出

本研究では、安定で強い還元力を生成する光化学系I複合体を無機素材に配向させて結合させるため、テイラーメイドのペプチドタグを複合体タンパク質に融合させるシステムを開発する。方法として確立しているファージディスプレイ法により、目的の無機素材で



ファージディスプレイ法による
テイラーメイドのペプチドタグの単離法

ある金に親和性をもつ6アミノ酸から構成されるペプチドタグを単離する。得られたペプチドタグの金電極への結合の有効性を調べるため、タグを融合したモデルタンパク質酵素を大腸菌に発現させ、金電極に結合した酵素活性を測定した。

(2) ペプチドタグを融合した光化学系I複合体を発現する葉緑体形質転換体の作出

(1)で得られたタグを緑藻クラミドモナスの葉緑体遺伝子にコードされた光化学系Iサブユニット(PsaB)に遺伝子工学的手法を用いて融合する。psaB遺伝子とその隣接領域を含む葉緑体DNA断片をクローン化し、psaB遺伝子の下流に薬剤耐性カセット(aadA cassette)を挿入し、形質転換体をスペクチノマイシン存在下で選抜できるようにした。パーティクルガンで形質転換ベクターをクラミドモナス葉緑体に導入し、得られた形質転換体の全DNAをコロニーPCRで増幅し、目的の形質転換型のDNAを持つかどうかを調べた。

(3) タグを融合した光化学系I複合体

形質転換体の光化学系I複合体の蓄積量は、光化学系Iに対する抗体を用いた全タンパク質のウェスタン分析により調べた。光化学系Iの活性は、形質転換体が光合成的に生育するかどうか、蛍光の誘導期現象の測定、ジョリオ型分光光度計によるP700光酸化活性の測定、などにより解析した。

(4) 光化学系I複合体の単離

細胞からチラコイド膜を単離し、それを温和な界面活性剤であるドデシルマルトシドで可溶化し、ショ糖密度勾配超遠心法により、光化学系I複合体を精製した。

(5) 葉緑体電池の作製

1cm四方の金の薄い板に単離した光化学系I複合体標品を加えることにより結合させ、その後、金板を軽く洗浄した。結合した光化学系I複合体の量は反射型分光光度計により測定した。電力の発生を測定するときには、光化学系Iの電子供与体であるDCIPとアスコルビン酸ナトリウムを添加した。

4. 研究成果

(1) 金親和性ペプチドタグの単離

T7ファージライブラリーを用いたバイオパニングにより、電極素材である金プレートに高い親和性を示すペプチド類を14種類(Au1~14)単離した。単離した候補ペプチドを、モデルタンパク質である超好熱菌由来エステラーゼ(Esterase)に融合し、吸着後のエステラーゼ残存活性を測定することで金親和性タグを評価した。その結果、飽和吸着量および吸着後の残存活性が最も高かったAu3を金親和性タグとし、その後の葉緑体電池の創製に使用した。また、得られた

ペプチドの中で金ナノ粒子に親和性が最も高かったのは Au10 であった。このペプチドは水素発生装置の創製に使用した。

(2)光化学系 I 複合体のペプチドタグ融合部位の決定

光化学系 I 複合体は多数のサブユニットから構成されているが、ペプチドタグを融合する部位は葉緑体遺伝子にコードされている 4 つのサブユニット (PsaA, PsaB, PsaC および PsaJ) に限定される。それはクラミドモナスの葉緑体ゲノムは相同組換え活性があるため、部位特異的形質転換が可能であるが、核ゲノムは相同組換え活性が弱く、部位特異的形質転換が実質的には不可能であるからである。ペプチドは N 末端もしくは C 末端に融合するか、あるいはストロマおよびルーメン側に露出した部位に置き換えるのが適当であると判断された。そこで、膜貫通領域をもつ PsaA と PsaB の N 末端および C 末端に Au3 タグを融合する形質転換ベクターを作成した。さらに PsaJ は C 末端に Au3 タグを融合するベクターを作成した。一方、光化学系 I 複合体はルーメン側に平坦な構造を持つので、PsaA および PsaB の膜貫通ヘリックス間の親水領域に Au3 タグを置き換えるベクターも 4 種類作成した。これらのベクターでクラミドモナスを形質転換したところ、PsaB の N 末に Au3 タグを融合したものの以外は十分な光化学系 I 複合体の蓄積は認められなかった。ただし、PsaJ の場合は、光化学系 I 複合体は蓄積したが、PsaJ は存在しなかった。ペプチドタグを PsaJ の C 末端に融合すると光化学系 I 複合体へのアセンブリーがうまくいかなかったためであると考えられる。

一方、光化学系 I 複合体のストロマ側に結合する PsaC の N 末端もしくは C 末端はストロマ側に露出しておらず、ペプチドタグを融合する適当な場所が容易には見つからなかった。このサブユニットは最終電子受容体である 2 つの鉄硫黄中心 F_A と F_B を結合するため、このサブユニットにペプチドタグを融合することは葉緑体電池や水素発生装置を創生する上で有利であると考えられる。そこで、ストロマ側に露出した部位の Au3 の 6 残基のアミノ酸を置き換えるようにペプチドタグを融合する場所を 3 種類試みた。その内の 1 箇所が光化学系 I 複合体の活性と蓄積に大きな影響を与えないことが分かった。

(3)ペプチドタグを融合した光化学系 I 複合体の安定性と活性

すでに述べたように PsaB と PsaC にペプチドタグを挿入もしくは置換する部位を見出した。全細胞タンパク質のウェスタン分析を光化学系 I サブユニットに対する抗体を用いて行くと、ペプチドタグの融合により光化学系 I 複合体の蓄積量は野生型のそれとほとんど変わらなかった。また、チラコイド膜を温和な界面活性剤で可溶化して単離した光化学

系 I 複合体標品のサブユニット組成および光化学活性を解析したところ、野生型の標品とほとんど差が認められないことが明らかになった。さらに、単離した光化学系 I 複合体標品の P700 光酸化活性の熱安定性を調べた。その結果、PsaC にペプチドタグを融合すると、野生型の光化学系 I 複合体に比べると安定性が少し低下することが分かった。しかし、室温では長時間活性が保持され、一週間後でも約 6 割の活性が保持された。したがって、葉緑体電池の特性を調べる上で熱安定性には全く問題がないことが分かった。

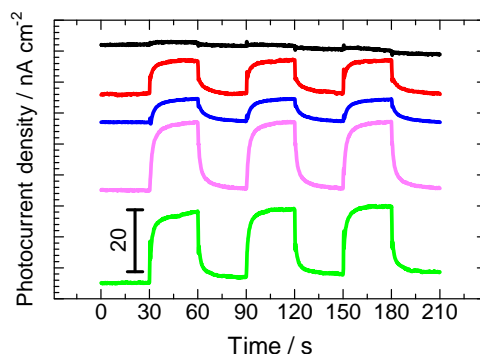
(4)金電極への光化学系 I 複合体の結合

ショ糖密度勾配超遠心法により単離した光化学系 I 複合体標品からショ糖を除き、金電極への結合を調べた。光化学系 I 複合体の結合量を電極の吸収スペクトルを測定することにより求めた結果から、PsaB と PsaC にタグを融合したいずれの光化学系 I 複合体も電極表面に隙間なく一重に結合すると結論された。しかし、ペプチドタグを融合していない野生型の光化学系 I 複合体の金電極への結合量も同様であった。したがって、金はタグを融合していないタンパク質もよく結合する性質があると言える。重要な問題は、ペプチドタグを融合した光化学系 I 複合体が同じ配向を向いて金電極に結合しているかどうかである。

一方、金ナノ粒子に光化学系 I 複合体を結合させるため、Au10 タグを融合した光化学系 I 複合体を発現する形質転換体も作出した。Au3 の場合と同様に PsaB の N 末端に Au10 を挿入した形質転換体と PsaC のストロマ側に露出した領域を Au10 と置換した形質転換体を作成した。いずれの形質転換体の光化学系 I 複合体の蓄積や光化学反応活性も正常であった。金ナノ粒子懸濁液に塩 (10%NaCl) を添加すると凝集するが、粒子にタンパク質が結合すると塩添加に伴う凝集は起こらなくなる。この現象を利用して、化学系 I 複合体が金ナノ粒子に結合するかどうかを調べた。その結果、直径が 10nm と 100nm の金ナノ粒子に Au10 を融合した光化学系 I 複合体は結合することが分かった。

(5)葉緑体電池による電力発生の測定

金電極に結合させた光化学系 I 複合体が人口的電子供与体である DCIP とアスコルビン酸



ナトリウムが存在下で光照射した時に発生する微細な電流を測定した(下図)。

野生型光化学系Ⅰ複合体(黒線)は光を照射してもほとんど電流が流れなかった。金電極に光化学系Ⅰ複合体は十分に結合していたにもかかわらず電流が流れなかったのは、結合の向きがランダムであったためであると考えられる。それに反して、Au₃をPsaBのN末端に融合した光化学系Ⅰ複合体(赤線)では、光照射に伴う電流の発生が観測された。Au₃をPsaCに融合した光化学系Ⅰ複合体(青線)も光照射に伴う電流の発生が観測されたが、電流の量は少なかった。以上の結果は、ペプチドタグは光化学系Ⅰ複合体を金電極に結合させる効果は認められなかったが、配向を揃えて結合させる効果はあることを示している。葉緑体電池の場合、光化学系Ⅰ複合体を電極に結合させる時に配向を揃えない限り電力を取り出すことは不可能なので、ペプチドタグを融合させる本研究の手法は有効であると言える。

光化学系Ⅰ複合体を電極に結合させるときに、配向をさらに揃えるために、Au₃タグとPsaBタンパク質の間に6アミノ酸残基からなるスペーサー配列を挿入させた(マゼンダ線)。光照射に伴う電流の発生は、スペーサー配列なしの場合に比べ、2-3倍に増加した。すでに報告されている長いペプチドタグの場合も高い効果が得られ、およそ同程度の電流が発生することが分かった(緑線)。

(6)結論

T7ファージを用いたバイオパニング法により新規に単離した金親和性ペプチドタグ(Au₃)を融合させた光化学系Ⅰ複合体を発現する緑藻クラミドモナス葉緑体形質転換株の作出に成功した。光化学系Ⅰ複合体は葉緑体に安定に蓄積し、光化学活性も野生型と同様であった。ペプチドタグを融合した光化学系Ⅰ複合体を精製し金電極に揃った配向で結合させて葉緑体電池のプロトタイプを創製し、光照射により電力が発生することを証明した。一方、金ナノ粒子に親和性をもつAu₁₀タグを融合した光化学系Ⅰ複合体は金ナノ粒子に結合することが確かめられたが、光照射下での水素発生の測定は今後の課題として残された。

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) Bujaldon, S., Kodama, N., Rappaport, F., Subramanyam, R., de Vitry, C., Takahashi, Y. and Wollman, F.-A. The functional accumulation of antenna proteins in chlorophyll b-less mutants of *Chlamydomonas*. *Molecular Plant* 査読あり 10 (2017) 115-130.
- (2) Wang, L., Yamano, T., Takane, S.,

Niikawa, Y., Toyokawa, C., Ozawa, S., Tokutsu, R., Takahashi, Y., Minagawa, J., Yoshikawa, H. and Fukuzawa, H. Chloroplast-mediated regulation of CO₂-concentrating mechanism by Ca²⁺-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 査読あり 113 (2016) 12586-12591.

- (3) Shimakawa, G., Akimoto, S., Ueno, Y., Wada, A., Shaku, K., Takahashi, Y. and Miyake, C. Diversity in photosynthetic electron transport under CO₂-limiting: the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002 and green alga *Chlamydomonas reinhardtii* drive an O₂-dependent alternative electron flow and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence during CO₂-limited photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 査読あり 130 (2016) 1-13.
- (4) Kato, Y., Ozawa, S., Takahashi, Y., and Sakamoto, W. D1 fragmentation in photosystem II repair caused by photo-damage of a two-step model. *Photosynthesis Research*, 査読あり 144 (2015) 409-419.

[学会発表](計5件)

- (1) Kodama N, Bujaldon S, Wollman F-A and Takahashi Y, Immunochemical characterization of peripheral antenna complexes in BF4 and P71 mutants. 17th International Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Kyoto International Conference Center) 2016年6月26日-7月1日
- (2) 高橋裕一郎 クロロフィル合成の最終反応はどこで起こるか? —ゲラニルゲラニルレダクターゼの働き— 第7回日本光合成学会年会およびシンポジウム(東京理科大学葛飾キャンパス)2016年5月27-28日
- (3) Yoshida K and Takahashi Y Purification of His-tagged PSI complex associating PsaN, PsaO, and LHCIIs by affinity chromatography. 第57回日本植物生理学会年会(岩手大)2016年3月18-20日
- (4) Yuichiro Takahashi. Structure and biogenesis of photosystem I complex. International Symposium on Dynamics and Regulation of Photosynthesis (Nara Kasugano International Forum) 2015年10月29-31日
- (5) Nelaepalli Screedhar, Shin-ichiro Ozawa, Hidenori Matsuzaki, and Yuichiro Takahashi. Biogenesis of

Photosystem I complex. The
German-Japanese Binational Seminar
2015, かんぼの宿熱海, 2015年3月
21-26日

〔図書〕(計0件)

〔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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 裕一郎 (TAKAHASHI, Yuichiro)
岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授
研究者番号：50183447

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

今中洋行 (IMANAKA, Hiroyuki)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号：10379711

近藤正晴

研究者番号：20571219
名古屋工業大学・工学研究科・助教

(4) 研究協力者

()