

平成22年 5月28日現在

研究種目：学術創成研究

研究期間：2005~2009

課題番号：17GS0314

研究課題名（和文） 地球環境を支える光合成酸素発生系の解明-反応機構、獲得、継承

研究課題名（英文） Analyses of the photosynthetic oxygen evolving system that sustains the global environment - Reaction mechanisms, acquisition and succession processes

研究代表者 三室 守 (MIMURO MAMORU)

京都大学・大学院人間環境学研究科・教授

研究者番号：40142004

研究成果の概要（和文）：地球環境を支える根幹の反応である光合成酸素発生系について、反応機構、獲得、継承の3点から解析を行った。獲得過程として、光合成細菌からシアノバクテリアへの変遷に伴って最も重要な変化であった光合成色素の置換とその後のタンパク質の最適化過程を解析した。反応機構として、マンガンクラスターの配位子となるアミノ酸の置換などの分子生物学的手法とFTIRに代表される分光学を結合し、解析した。継承過程として、シアノバクテリアの遺伝子が葉緑体に移行する際に満たすべき要件等について解析した。5年間の研究により多くの研究成果を得ることができ、世界の光合成酸素発生系に大きな足跡を残す研究となった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the photosynthetic oxygen-evolving system that sustains the global environments. Our main targets for analysis of reaction mechanisms, acquisition and succession processes. As for acquisition processes, we investigated the change of photosynthetic pigments and following optimization processes of protein complexes. This process was a typical succession from anoxygenic photosynthetic bacteria to cyanobacteria. On the reaction mechanism, we changed a ligand to Mn cluster and other amino acids that were supposed to be involved to reaction processes, and found that binding of water molecules to a specific Mn atom. We further found the proton release cycle. On the succession processes, we studied the requisites for transfer of cyanobacterial genes to chloroplast genes. By the five-year study, we published many papers that would be a milestone for study of the photosynthetic oxygen-evolving system in the world.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	101,500,000	30,450,000	131,950,000
18年度	88,800,000	26,640,000	115,440,000
19年度	85,100,000	25,530,000	110,630,000
20年度	79,300,000	23,790,000	103,090,000
21年度	79,600,000	23,880,000	103,480,000
総計	434,300,000	130,290,000	564,590,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：酸素発生、光合成、葉緑体、進化中間体

## 1. 研究開始当初の背景

光合成酸素発生系は、エネルギー獲得に必須の「電子」の供給源であり、エネルギー生産の根幹をなす反応である。27億年前にシアノバクテリア（ラン藻）によって初めて獲得・構築された酸素発生系は、最終的には陸上植物の葉緑体へと受け継がれ、地球環境とあらゆる生命活動を支えてきた。酸素発生系の解明は光合成の基本問題として、長年にわたって国内外の多数の研究グループにより解析が続けられていた。研究開始当時、国内外の3グループから示された酸素発生系を含む光化学系 II 反応中心複合体の結晶構造を基にし、解析の進展が予想されたが、従来にはない実験系の開発や発想の転換が伴わなければ、進展は限定されたものと考えられた。

## 2. 研究の目的

酸素発生系は+1.0Vを越える極めて高い酸化電位のもとで、複数の安定な中間体を必要とする特異な電子移動系である。酸素発生系の全容解明には、(1) 反応系を構成する要素の「獲得」段階、(2) 光化学反応と電気化学反応が融合した「反応機構」、さらに (3) 細胞内共生によるシアノバクテリアから葉緑体型酸素発生系への「継承」・発展段階、の解析が必須である。酸素発生系の解析は、単に部品の改良などに留まらず、非酸素型光合成システムから酸素発生型光合成システムへの転換、すなわち「システムの形質転換」過程の解明を目指すものでもある。

具体的には以下の課題を設定した。獲得は、「酸素発生を可能とする反応系の構築のための諸要素の獲得過程」と定義し、色素の獲得、反応中心タンパク質の改変とサブユニットの増加を解析した。反応機構は、「酸素発生機構の解明と障害回避機構の獲得」と定義し、水分解過程における中間体の安定化機構、水分解反応に付随する酸素障害の回避機構を具体的な課題とした。継承は、「色素系の多様化と一次共生による葉緑体の成立過程の解明」と定義し、色素系の多様化、遺伝子の核移行決定要因の究明、葉緑体遺伝子発現系の成立、を目指した。

## 3. 研究の方法

それぞれの課題には、それに適した材料、方法を用いることが肝要であり、独自の方法を採用した。全般的な特徴として、シアノバクテリアの多様性を重用し、通常、解析にはあまり使われることのない種、*Gloeobacter violaceus* や *Acaryochloris marina* などを用いた。さらに、進化過程の一部を再現した「進化における中間的酸素発生系」を分子遺伝学的手法によって作製し、それについての解析

を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 酸素発生系の獲得過程

酸素発生系の獲得に関して、光合成細菌からシアノバクテリアへの変遷に伴う最も重要な変化であった光合成色素の置換とその後のタンパク質の最適化を、シアノバクテリアにジビニルクロロフィル a (DV-Chl a) を合成させ、その後の変化をたどることで解析した。

*Synechocystis* sp. PCC 6803 のビニル基還元酵素 (DVR) を、バイオインフォーマティクス的手法を用いて同定し、次にこの酵素を機能なくすることで、*Synechocystis* に DV-Chl a を合成させた。その表現型の特徴は、弱光下での生育は対照と同程度であるが、強光下では、色素が褪色することであった (Fig. 1)。同時に PS II 反応中心複合体からの遅延蛍光が観測されなかった。反応中心タンパク質には、色素の変化に対応できない欠損が残ったままであると考えられた。褪色の原因として一重項酸素の関与が考えられたので、MV-Chl a, DV-Chl a について、アセトン中での一重項酸素の発生率を、新たに開発したレーザー分光装置で測定すると、後者が約 20%、高いことが判明した。同様に、PS II 複合体でも解析を行うと、DV-Chl a を持つ PS II での発生量が多いことが判明した。したがって、色素が変わってもタンパク質の最適化が行われていないことが原因であることが考えられた。

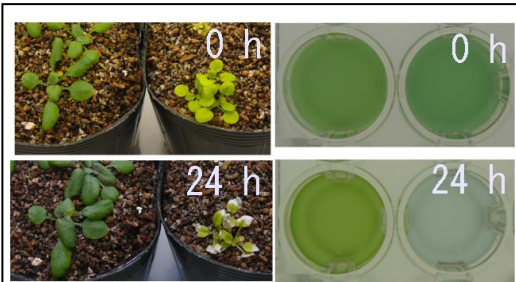


Fig.1 ジビニル型クロロフィルを持った *Arabidopsis thaliana* (左) と *Synechocystis* sp. PCC 6803 (右) の強光への応答。低照度下で育てた後、強光下 (*Arabidopsis* 1000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , *Synechocystis* 500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で 24 時間育てたもの。

そこで、PS II の最も主要な構成成分である D1 タンパク質について、*Prochlorococcus* spp. と *Synechocystis* において異なるアミノ酸を、*Synechocystis* について特異的に変化させ、その効果を検討した。その結果、強光耐性を獲得したことが判明した。これは、耐性に直接かかわる要因は見同定ながら、タンパク質の最適化が重要であることを端的に示している。

(2) *Acaryochloris marina* を用いた酸素発生系の解析

Chl *d* を主要な色素とするシアノバクテリア *A. marina* MBIC 11017 は、Chl *d* が Chl *a* に比べて小さな光エネルギーしか獲得できない。したがって酸素発生型光合成系を解析する際に、色素置換という大きな摂動と解することができる、そこで、この種について、光化学複合体を新たに単離する方法を考案し、光化学反応中心でのスペシャルペアの同定を行った。その結果、二つの光化学系ともに、スペシャルペアは Chl *d* であることを証明した (PS II は P713, PS I は P740)。PS II については2分子の Chl *a* が必ず存在すること、それが遅延蛍光の起源となっていること、また、第一電子受容体は Pheophytin *a* (Phe *a*) であること、PS I については、スペシャルペアの酸化還元電位が +430 mV であり、Chl *a* のスペシャルペア (P700) と同じ電位であること、などの新事実が明らかとなった。

次に、酸素発生に必要な酸化還元電位の測定を行った。PS II の第一電子受容体である Phe *a* の電位を直接測定し、それを基にスペシャルペアの酸化還元電位を見積もった。Phe *a* の電位は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では  $-536 \pm 8$  mV、*A. marina* では  $-477 \pm 24$  mV と測定され、小さなエネルギーしか獲得できない *A. marina* では、電位が高かった。この測定値を基にすると、スペシャルペアの酸化還元電位は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 では 1.20 V、*A. marina* では 1.19 V となり、酸素発生に必要な電位は、色素種には独立に一定の電位が必要であることが判明した (Fig. 2)。

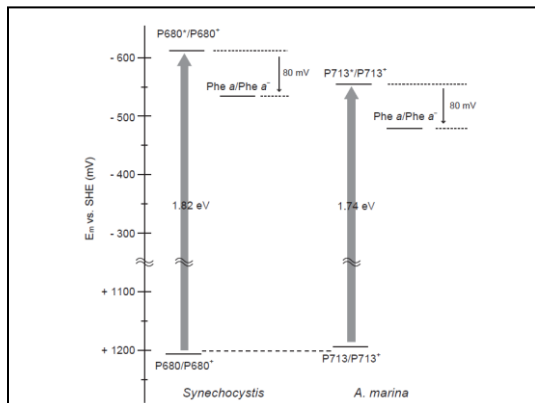


Fig.2 異なるクロロフィルをスペシャルペアに用いる2種のシアノバクテリアにおけるエネルギー図  
*Synechocystis* はクロロフィル *a* を、*A. marina* はクロロフィル *d* をそれぞれスペシャルペアのクロロフィルとして利用している。

この事実は、酸素発生という極めて精緻な反応系では、反応系の構築に統一性があり、変化させることのできない要因があること、を端的に示している。

(3) フーリエ変換赤外分光 (FTIR) 法による反応機構の解析

光合成酸素発生反応の分子機構を FTIR 法を用いて解析し、そのプロトン放出過程、マンガクスターの配位子構造、表在性タンパク質の役割などを明らかにした。

クロロフィル二量体の高い酸化還元電位の発現機構を考察した。その結果、電荷の非局在化により約 140 mV 電位が降下することが示された。このことから、光化学系 II は P680<sup>+</sup> 上の電荷を局在化させることにより、水の酸化を可能にする高い電位を獲得したことが示された。

マンガクスターの配位子の候補である CP43-Glu354 について、その部位特異的変異体 CP43-Glu354Gln を FTIR 法により解析した。その結果、CP43-Glu354 は S<sub>1</sub> 状態において2つのマンガク原子を架橋しており、S<sub>2</sub> 状態では、そのうちのどちらか片方へのキレート構造に変化することを明らかにした。また、CP43-Glu354 の変異によって基質水分子の構造が変化することが観測され、CP43-Glu354 が配位するマンガク原子のどちらかに結合して存在していることを示した (Fig. 3)。

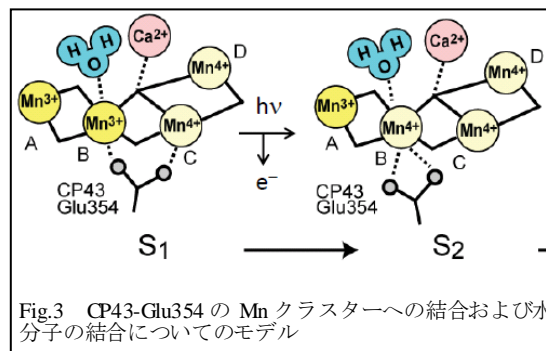


Fig.3 CP43-Glu354 の Mn クラスタへの結合および水分子の結合についてのモデル

光合成水分分解反応のプロトン放出過程について解析を行った。Mes 緩衝剤とその同位体置換体を用いて、水分分解系から放出されるプロトンに FTIR 法により検出する手法を新たに開発し、S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>, S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>, S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub> 遷移に対して 1:0:1:2 であることが示した。

Ca<sup>2+</sup> を除去、または Sr<sup>2+</sup> に置換した光化学系 II を用いて FTIR 解析を行った結果、Ca<sup>2+</sup> はカルボキシル配位子を介して Mn クラスタと直接的に相互作用し、酸素発生反応に関与していることを示した。

植物の光保護作用の一つである、光化学系 II の副次的ホール移動反応を FTIR 法を用いて調べ、クロロフィル Z の直接的酸化経路の存在を明らかにした。

(4) 渦鞭毛藻の D1/D2 タンパク質のアミノ酸配列の特異性

2 種の渦鞭毛藻、*Symbiodinium* sp. と *Alexandrium tamrense* について cDNA の配列をもとに D1 タンパク質の一次構造を決定し、

他の生物群のアミノ酸配列と比較した。その結果、*Synechocystis* sp. PCC 6803 と渦鞭毛藻の D1 タンパク質の間でのアミノ酸変異率は 24-26% であった。*Synechocystis* sp. PCC 6803 と他のラン藻の間で 13-14%、一次共生藻との間で 14%、二次共生藻の間で 14-16% なので、アミノ酸変異率は倍増している。これは、渦鞭毛藻以外の酸素発生光合成生物では厳密に保存されている部位に渦鞭毛藻固有の変異があることを意味する。渦鞭毛藻特異的なアミノ酸変異は合計 23 箇所見いだされた。これらの変異はタンパク質全体に散在しているが、D-E ループと N 末端領域には多くの変異が見いだされた。タンパク質の二次構造にどのように反映しているかを確かめるためハイドロパシープロットで解析したところ、D-E ループと N 末端領域において渦鞭毛藻特有に疎水度が大きく増加していることが示された。また好熱性ラン藻の結晶構造をもとにしたホモロジーモデリングも D-E ループの構造変異を示唆した。以上の結果は、同じ紅藻由来の葉緑体をもつ珪藻、褐藻、クリプト藻では全く見られない。これらの結果は、D1 タンパク質の代謝回転や D2 タンパク質と表在性タンパク質との相互作用などに影響を与えている可能性を示唆している。

#### (5) Transit Peptide (TP) の獲得過程の予測

(a) バクテリアに由来するタンパク質遺伝子は N 末伸長配列を持つ

TP は N 末端が伸長する形で獲得されている。まず、細胞内共生菌から核に転移した遺伝子が、どのような配列を獲得しているかを知るために、データベースを用いた配列解析を行った。シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケ、シソンの 3 種に共通して存在する

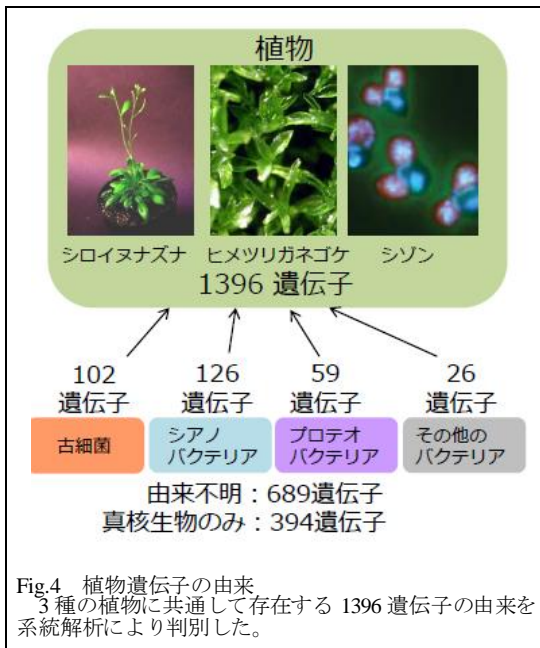


Fig.4 植物遺伝子の由来  
3種の植物に共通して存在する 1396 遺伝子の由来を系統解析により判別した。

1396 遺伝子を双方向 BLAST により抜き出し、それぞれのタンパク質がバクテリアおよび古細菌のどちらに由来するかを系統樹解析により判別した (Fig. 4)。その結果、明らかにバクテリアに由来すると推定された 211 遺伝子の多くはシアノバクテリア (126 遺伝子) やプロテオバクテリア (59 遺伝子) に由来し、細胞内共生菌から核ゲノムに転移したと考えられた。そして、このような遺伝子は、植物に特異的に、N 末端が数十アミノ酸の伸長が起きていることが示された (Fig. 5A)。一方、もともと核ゲノムに存在していた可能性が高いと考えられる古細菌に由来する 102 遺伝子では、そのような傾向は認められなかった (Fig. 5B)。

またバクテリアに由来する遺伝子産物の多くは、葉緑体もしくはミトコンドリアに局在する傾向があることが示された (Fig. 5A)。このことから葉緑体やミトコンドリアから核に移行した遺伝子は数十アミノ酸を移行シグナルとして N 末端に獲得したもののみが現在に引き継がれたと考えられる。

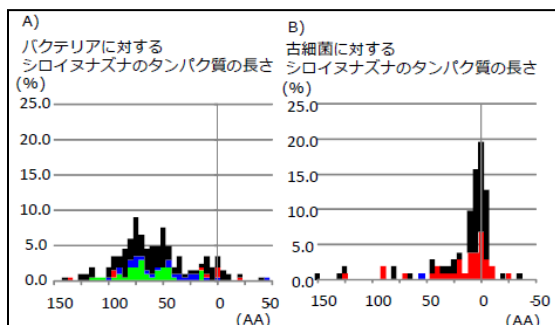
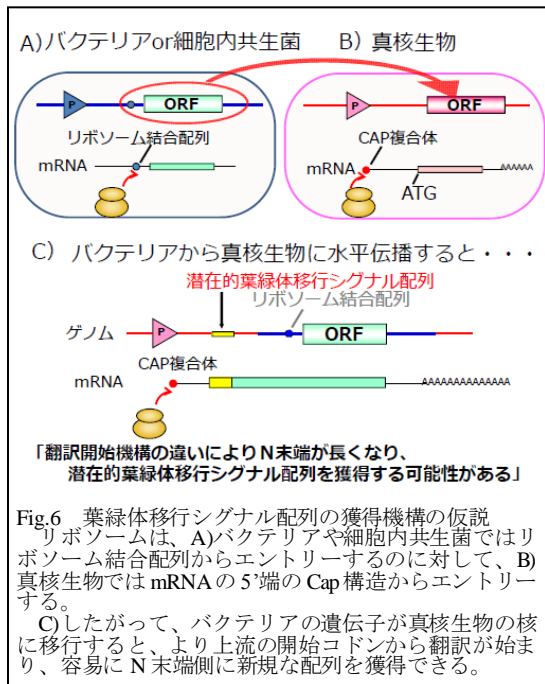


Fig.5 シロイヌナズナタンパク質の由来と、N 末端の長さ、及び細胞内局在との関連

A) バクテリアに由来するシロイヌナズナのタンパク質が、バクテリアのタンパク質に対して、どのぐらい長くなっているかを示したヒストグラム。B) 古細菌に由来するシロイヌナズナのタンパク質が、古細菌のタンパク質に対して、どのぐらい長くなっているかを示したヒストグラム。ヒストグラム内の緑は葉緑体局在タンパク質、青はミトコンドリア局在タンパク質、赤はオルガネラに局在しないもの、黒は局在不明を示す。

このように、遺伝子上流に別の ORF が融合できた原動力として、バクテリアと真核生物の翻訳開始機構の違いが考えられる。バクテリアでは mRNA 上のリボソーム結合配列を利用して翻訳を開始するのに対し、真核生物では mRNA の最初の AUG から翻訳を開始するため、核に転移した遺伝子は容易に N 末端側に新たな配列を融合させて利用することができたと考えられる (Fig. 6)。つまり、バクテリア型から真核生物型への翻訳開始機構の変化が、核移行した遺伝子の TP 獲得要因の一つであると考えられた。



## 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 125 件)

代表的な論文

1. S.I. Allakhverdiev, T. Tomo, Y. Shimada, H. Kindo, R. Nagao, V.V. Klimov, and M. Mimuro (2010) Redox potential of pheophytin *a* in photosystem II of two cyanobacterial species having different chlorophyll species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3924-3929.
2. Y. Horie, H. Ito, M. Kusaba, R. Tanaka, and A. Tanaka (2009) Participation of chlorophyll *b* reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complexes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 284, 17449-17456.
3. M. Tomita, K. Ifuku, F. Sato, and T. Noguchi (2009) FTIR evidence that the PsbP extrinsic protein induces protein conformational changes around the oxygen-evolving Mn cluster in photosystem II. *Biochemistry*, 48, 6318-6325.
4. H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi (2009) Monitoring proton release during photosynthetic water oxidation in photosystem II by means of isotope-edited infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 7849-7857.
5. S. Iida, A. Kobiyama, T. Ogata, and A. Murakami (2009) Identification of transcribed and persistent variants of the

*psbA* gene carried by plastid minicircles in a dinoflagellate. *Curr. Genet.*, 55, 583-591.

6. M. Odahara, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, and Y. Sekine (2009) Suppression of repeat-mediated gross mitochondrial genome rearrangements by RecA in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 21, 1182-1194.
7. S. Imamura, Y. Kanesaki, M. Ohnuma, T. Inouye, Y. Sekine, T. Fujiwara, T. Kuroiwa, and K. Tanaka (2009) R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12548-12553.
8. W.D. Swingley, M. Chen, P.C. Cheung, A.L. Conrad, L.C. Dejesa, J. Hao, B.M. Honchak, L.E. Karbach, A. Kurdoglu, S. Lahiri, S.D. Mastrian, H. Miyashita, L. Page, P. Ramakrishna, S. Satoh, W.M. Sattley, Y. Shimada, H.L. Taylor, T. Tomo, T. Tsuchiya, Zi T. Wang, J. Raymond, M. Mimuro, R.E. Blankenship, and J.W. Touchman (2008) Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll *d*-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2005-2010.
9. H. Ito, M. Yokono, R. Tanaka, and A. Tanaka (2008) Identification of a novel vinyl reductase gene essential for the biosynthesis of monovinyl chlorophyll in *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.*, 283, 9002-9011.
10. H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi (2008) Monitoring water reactions during the S-state cycle of the photosynthetic water-oxidizing center: Detection of the DOD bending vibrations by means of Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 47, 11024-11030.
11. S. Iida, A. Kobiyama, T. Ogata, and A. Murakami (2008) The D1 and D2 proteins of dinoflagellates: unusually accumulated mutations which influence on PSII photoreaction. *Photosynth. Res.*, 98, 415-425.
12. T. Tomo, T. Okubo, S. Akimoto, M. Yokono, H. Miyashita, T. Tsuchiya, T. Noguchi, and M. Mimuro (2007) Identification of the special pair of photosystem II in the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 7283-7288.
13. R. Tanaka, and A. Tanaka (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58, 321-346.

14. A. Soma, A. Onodera, J. Sugahara, A. Kanai, N. Yachie, M. Tomita, F. Kawamura, and Y. Sekine (2007) Permuted tRNA genes expressed via a circular RNA intermediate in *Cyanidioschyzon merolae*. *Science*, 318, 450-453.
15. S. Akimoto, A. Murakami, M. Yokono, K. Koyama, T. Tsuchiya, H. Miyashita, I. Yamazaki, and M. Mimuro (2006) Fluorescence properties of the chlorophyll *d*-dominated cyanobacterium *Acaryochloris* sp. strain Awaji. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 178, 122-129.

上記論文は全て査読あり。

〔学会発表〕(計 264 件)

代表例

1. 飯田聡子、小檜山篤志、緒方武比古、村上明男「ペリディニン型渦鞭毛藻における PSII コアタンパク質の変異性」第 50 回植物生理学会年会(2009 年 3 月 21-24 日・名古屋)
2. 堀孝一、関根靖彦「ゲノムデータに基づくオルガネラ移行シグナル配列の獲得過程の予測」日本進化学会第 10 回東京大会 ワークショップ「ゲノム・トランスクリプトーム情報から植物の進化に迫る」(2008 年 8 月 22-24 日・東京)(招待講演)
3. A. Tanaka, Regulation and function of chlorophyll metabolism. Gordon Research Conferences, Mitochondria & Chloroplasts, Aug. 10-15, 2008, Biddeford, ME (USA)
4. M. Mimuro, T. Tomo, T. Tsuchiya, T. Okubo, T. Noguchi, and S. Akimoto, Components and photochemical reactions in photosystem II of the Chl *d*-dominated cyanobacterium, *Acaryochloris marina*. 7<sup>th</sup> International symposium on tetrapyrrole photoreceptors in photosynthetic organisms, Dec. 9-14, 2007, Kyoto (Japan)
5. H. Suzuki, M. Sugiura, and T. Noguchi, FTIR study on the proton release pattern during water oxidation in photosystem II core complexes from *Thermosynechococcus elongatus*, Photosynthesis 2007, Jul. 22-27, 2007, Glasgow (UK)

〔図書〕(計 17 件)

代表例

1. 三室 守、野口 巧、科学雑誌「ニュートン」 「光合成」特集号の監修、(2008 年 4 月刊行)pp. 14-51
2. N. Wada and M. Mimuro (Eds.) Recent progress of bio/chemiluminescence and fluorescence analysis in photosynthesis. Research Signpost, India, 2005 pp. 127-147.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：アシフルオロフェンに対する耐性を付与する活性を有するプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ及びその遺伝子  
 発明者：田中歩、田中亮一、加登一成、深川尊子  
 権利者：日本曹達株式会社、国立大学法人北海道大学  
 種類：  
 番号：特願 2005-278942  
 取得年月日：平成 17 年 9 月 26 日  
 国内外の別：国内

○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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

三室 守 (MIMURO MAMORU)  
 京都大学・大学院人間環境学研究所・教授  
 研究者番号：40142004

(2)研究分担者

田中 歩 (TANAKA AYUMI)  
 北海道大学・低温科学研究所・教授  
 研究者番号：10197402  
 野口 巧 (NOGUCHI TAKUMI)  
 筑波大学・大学院数理物質科学研究科・准教授  
 研究者番号：60241246  
 村上 明男 (MURAKAMI AKIO)  
 神戸大学・内海環境教育研究センター・准教授  
 研究者番号：50304134  
 関根 靖彦 (SEKINE YASUHIKO)  
 立教大学・理学部・准教授  
 研究者番号：80222074

(3)連携研究者

( )  
 研究者番号：