

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07732

研究課題名(和文)シアノバクテリアの光合成乾燥耐性機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on the mechanism of drought tolerance of photosynthetic machineries in cyanobacteria

研究代表者

水澤 直樹 (Mizusawa, Naoki)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：80342856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シアノバクテリアの一種であるAnabaenaは乾燥耐性をもつ。本研究では、乾燥に強いAnabaenaと乾燥に弱いSynechocystisの光合成の乾燥耐性を比較検討することで、Anabaenaの乾燥耐性の仕組みを解明することを目的とした。光合成装置のひとつ光化学系IIは環境ストレスに感受性が高いことが知られる。Anabaenaの光化学系IIはSynechocystisより乾燥ストレスまたは高張ストレスに対し、その活性がより容易に低下しやすいことを明らかにした。光化学系IIは活性酸素の生成源でもあるため、活性酸素の発生を抑えるためにAnabaenaでは光化学系IIの活性を低下させるのかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

砂漠の緑を回復する方策として、乾燥に強い植物の開発が注目されている。砂漠緑化の過程では土の表面に乾燥に強いシアノバクテリアがマットを形成し、土壌を改善する。乾燥耐性植物を作出する上で、シアノバクテリアの乾燥耐性機構の解明が欠かせない。しかし、乾燥下では光合成の測定が難しいこと、シアノバクテリアから光合成装置を単離することが難しいため、シアノバクテリアにおける光合成乾燥耐性の研究が遅れていた。本研究では、乾燥処理を近似する手法として高濃度ソルビトール処理を導入した。このことで、光合成測定や光合成装置の単離が飛躍的に簡易化し、乾燥耐性の研究推進が可能になった点は大きな学術的社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We examined mechanism of the drought tolerance of Anabaena by comparing the tolerance of photosynthetic machineries of Anabaena with those of Synechocystis. Photosystem II, one of photosynthetic machineries, is known as a primary target to photooxidative damage by various environmental stress. It was found unexpectedly that in Anabaena photosystem II is inactivated more easily by drought treatment or hypertonic treatment of cells than that in Synechocystis. Since photosystem II is also a source of production of active oxygen species, Anabaena may reduce the activity of photosystem II in order to suppress the production of harmful active oxygen species.

研究分野：光合成生物学

キーワード：シアノバクテリア 光合成 光化学系II 光化学系II 乾燥ストレス 高張ストレス ソルビトール

## 1. 研究開始当初の背景

近年の温暖化・緑地破壊などに伴い、世界規模の陸地砂漠化が深刻化している。砂漠の緑を回復する方策として、乾燥に強い植物の開発が注目されている。砂漠緑化の過程では土の表面に乾燥に強いシアノバクテリアがマットを形成し、水分の蒸発を抑え土壌を改善することが知られる。例えば、乾燥耐性を示す代表的な陸棲シアノバクテリアであるイシクラゲ *Nostoc commune* は、年単位にわたって乾燥状態で保存できる。申請者は乾燥耐性植物開発の出発点として、シアノバクテリアを用いて光合成の乾燥耐性機構を解明することが有用であると考えた。通常の陸上植物では乾燥処理に伴い光合成装置は変性し不可逆的に失活する。一方、興味深いことに、イシクラゲは乾燥状態で一時的に光合成活性を失うが、吸水するとタンパク質の新規合成を必要とせず光合成活性を回復する。光合成明反応では、光化学系Ⅱで水の酸化とプラストキノンの還元を行い、光化学系Ⅰで、光化学系Ⅱから得た電子を使って NADP<sup>+</sup>の還元を行う。佐藤らはイシクラゲ乾燥細胞の吸水過程で、光化学系Ⅱとともに速やかに活性を回復することを見出した (Satoh et al. 2002)。しかし、イシクラゲは形質転換系が確立されておらず、生化学的に光合成装置を単離することも困難であるため、光合成の乾燥耐性機構の研究は停滞していた。

一方、申請者は水棲シアノバクテリアの *Anabaena* sp. PCC 7120 (以後 *Anabaena*) と *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以後 *Synechocystis*) を用いて、光合成の環境ストレス耐性の研究を開始していた。これらシアノバクテリアは全ゲノム塩基配列が解明されており形質転換系も確立されている。in vivo で *Anabaena* と *Synechocystis* の光合成装置を乾燥ストレスに曝したところ、*Anabaena* のみがイシクラゲと同様に乾燥・再湿潤に伴う光合成の可逆的な失活・回復を示すことを確認した。

## 2. 研究の目的

本研究は、乾燥に強い *Anabaena* と乾燥に弱い *Synechocystis* の光合成装置の特性および乾燥耐性を比較検討することで、*Anabaena* 光合成装置の乾燥耐性の仕組みを解明することを目的とする。現在、細胞が乾燥ストレスに曝されたときに光合成装置が受ける影響について知見が不足している。そこでまず、乾燥下での光合成装置の安定性を *Anabaena* と *Synechocystis* で比較し、乾燥処理における光化学反応・電子伝達反応の失活部位を特定する。次に乾燥細胞を再湿潤した際の光合成回復過程を明らかにする。次に、これら細胞への乾燥ストレスの有無、乾燥処理からの回復処理が光化学系複合体に与える影響を、単離した光化学系標品の光合成特性・タンパク質組成を比較することで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) シアノバクテリア細胞からの光化学系複合体の単離

*Anabaena* と *Synechocystis* の細胞各々に、光化学系Ⅱ複合体の構成タンパク質のひとつ CP47 の C 末端に His タグを付与した変異株を予め作製した。これらの細胞を破砕後分画遠心で単離したチラコイド膜を界面活性剤 n-ドデシル-D-マルトシドで可溶化し、可溶性画分から Ni-アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより、光化学系Ⅱ標品を単離した。*Anabaena* については、よりインタクトな標品を単離するために、従来のガラスビーズ法に加えてリゾチーム法も用いて、細胞破砕をおこなった。

同じ細胞懸濁液から光化学系Ⅱに加え光化学系Ⅰ標品も単離する場合、Ni-アフィニティーカラムを素通りした画分(光化学系Ⅱに富む)を限外ろ過で濃縮した後、グリセロール密度勾配遠心により、光化学系Ⅰ標品を単離した。

### (2) シアノバクテリア細胞の乾燥処理または浸透圧ストレス処理に伴う光合成活性の変化

*Anabaena* と *Synechocystis* の細胞をフィルター上に静置し、乾燥処理でおこる脱水に伴う光化学系Ⅱの活性変化をクロロフィル蛍光測定等により解析した。

*Anabaena* と *Synechocystis* の細胞を所定濃度のソルビトールを含む BG-11 培地に懸濁し、弱光下、28°C でインキュベートした。所定の時間毎に酸素電極で活性測定した。

### (3) 光合成活性測定

クラーク型酸素電極 (Oxygraph ハンザテック) を用いて、光合成に依存する酸素発生速度を測定した。人工的電子受容体を添加しない条件で、電子伝達鎖全体活性 (H<sub>2</sub>O→CO<sub>2</sub>) を測定し、人工的電子受容体として 2,5-ジメチルベンゾキノン を添加した条件で、光化学系Ⅱ活性を (H<sub>2</sub>O→DMBQ) 測定した。

### (4) 単離した光化学系標品のタンパク質組成の解析

7.5 M 尿素を含む 18-24% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE でタンパク質を分離した。泳動後、ゲル上のタンパク質バンドをクマシーブリリアントブルー R250 で染色して、可視化した。

## 4. 研究成果

### (1) インタクトな光化学系 標品単離の試み

乾燥ストレス処理した細胞の光合成系の特性を分子レベルで解析するためには、インタクトな光化学系標品を高純度で単離する必要がある。そこで、細胞破砕法として、従来用いていたガラスビーズ処理ではなくリゾチーム処理を用いることにより、*Anabaena* からよりインタクトな光化学系 標品を単離できるか検討した。リゾチーム処理時のリゾチーム濃度、反応時間を詳細に検討した結果、細胞の破砕率はまだ低いものの、ガラスビーズ法で単離したときよりも、酸素発生活性が高い光化学系 標品を単離することが可能になった。この標品は光化学系 コアサブユニットに加え、これまでの結晶構造解析では検出されていないフィコビリソームを構成するフィコビリタンパク質を結合していたことから、従来の精製標品よりも大きな複合体を構成している可能性が示唆された。さらに、リゾチーム法で精製した標品はガラスビーズ法で精製した標品に比較して、光化学系 はより多くが活性型の二量体として存在することが示唆された。

### (2) *Anabaena* と *Synechocystis* から単離した光化学系 標品の環境ストレス耐性の比較

環境ストレス耐性実験として、乾燥ストレス実験に比べ実験系がより確立している酸素発生の高温耐性について、*Anabaena* と *Synechocystis* から単離した光化学系 標品間で比較した。*Anabaena* 光化学系 標品は *Synechocystis* よりも少し低い温度で酸素発生の高温失活がおこった。一般に表在性タンパク質 PsbO の解離と酸素発生の失活は相関があると考えられているが、*Synechocystis* では高温失活の過程で表在性タンパク質 PsbO が解離したが、*Anabaena* では PsbO の解離がみられなかった。*Anabaena* では光化学系 への PsbO の結合様式が *Synechocystis* とは異なる可能性が示唆された。

### (3) 同じ細胞培養液から光化学系 標品と光化学系 標品を迅速に同時精製する方法の確立

乾燥ストレス等の処理が光化学系の光合成特性に与える効果を分子レベルで解析するためには、ストレス処理した細胞と処理しない細胞から光化学系 と光化学系 標品を単離する必要がある。そこで、CP47 の C 末端に His タグを付加した *Synechocystis* 変異株から光化学系 と光化学系 を簡便に同時精製する方法を確立することを試みた。細胞を破砕したのち、分画遠心によりチラコイド膜を単離した。チラコイド膜を界面活性剤 n-ドデシル-β-D-マルトシドで可溶化したのち、Ni カラムクロマトグラフィーで、まず光化学系 標品を単離した。カラムを素通りした光化学系 に富む画分を濃縮しグリセロール密度勾配超遠心により分画したところ、光化学系 の三量体と単量体を単離することができた。本法で、単離した光化学系 と光化学系 標品のサブユニット組成を SDS-PAGE で解析したところ、過去の知見とほぼ同じであったことから、他の方法に劣らない精製度をもつ光化学系 と光化学系 標品を同時に単離できたと考えられる。

### (4) シアノバクテリア細胞の乾燥または浸透圧ストレスに伴う光合成活性の変化

*Anabaena* と *Synechocystis* の細胞をフィルター上に静置し、乾燥処理でおこる脱水に伴う光化学系 の活性変化を解析した。私達はこれまで光化学系 の活性指標としては光化学系 から発生する酸素発生活性を用いてきたが、乾燥細胞で酸素発生を測定することが困難であった。クロロフィル蛍光の Fv/Fm と呼ばれるパラメーターは間接的な方法ではあるが、光化学系 の活性をよく反映することが知られ、このパラメーターは乾燥細胞でも測定が可能である。そこで、この実験では Fv/Fm を指標として光化学系 の活性変化を調べることにした。*Anabaena* が *Synechocystis* に比較して、Fv/Fm は乾燥ストレスでより容易に低下することがわかった。しかしながら、フィルターの乾燥状態を毎回同じように保つのが困難であり、実験の再現性を得るのが難しかった。乾燥ストレスは高張ストレスに伴う脱水現象で近似できることが知られている。そこで、次に乾燥処理の代わりに細胞毒性をもたない細胞膜を通過しない浸透圧調整剤であるソルビトールを用いて高張処理ストレスに曝したときの光合成活性の変化を調べることにした。ソルビトール存在下では光化学系 の活性指標となる酸素発生速度を容易に測定することが可能である。乾燥処理と同様に、高張処理においても *Anabaena* が *Synechocystis* に比較して、光化学系 (活性の指標となる Fv/Fm および酸素発生活性) がより容易に低下することがわかった。

### (5) ソルビトール高張処理が *Anabaena* と *Synechocystis* の光合成電子伝達に与える影響

*Anabaena* と *Synechocystis* の高張ストレスによる光合成系の障害部位が光化学系 のみに存在するかを細胞レベルで解析した。*Anabaena* と *Synechocystis* を 0 M-2 M ソルビトールを含む BG-11 培地とインキュベートし、酸素発生活性の経時変化を 2,5-ジメチルベンゾキノン存在下 ( $H_2O \rightarrow DMBQ$ ; 光化学系 活性) と非存在下 ( $H_2O \rightarrow CO_2$ ; 光合成電子伝達全体活性) で測定した。*Synechocystis* では高張処理で光化学系 の電子伝達はあまり失活せず、光化学系 を含むその下流の電子伝達が不可逆に失活したが、*Anabaena* では高張処理で光化学系 とその下流の電子伝達の両者が不可逆に失活した。*Anabaena* が乾燥耐性を示す理由として、光化学系 反応を積極的に低下させ、光化学系 の還元側もしくはその下流で活性酸素の生成を抑えている可能性が示唆された。通常の SDS-PAGE 解析では高張処理の有無で光化学系のサブユニット

組成に差はみられなかった。今後は *Anabaena* と *Synechocystis* の光化学系 のサブユニット組成についても、ストレス処理で変化するかどうかを解析する必要がある。

#### (6)まとめと今後の展望

研究当初は乾燥に強い *Anabaena* は *Synechocystis* に比べ、光化学系 が乾燥ストレスもしくは高張ストレスに耐性をもつことを予想していたが、結果は逆で、*Anabaena* の光化学系 はこれらのストレスに対し、より容易に失活しやすいことが明らかにされた。光化学系 は環境ストレス下では活性酸素を生成する特性をもつため、活性酸素の発生を抑えるために *Anabaena* では光化学系 の活性を低下させるのかもしれない。これまでの国内外の研究では、光化学系の安定性を持たせることで環境ストレスに強くなるとの考えに基づいて研究が進められていた。本研究で得られた結果は光化学系 の活性をむしろ積極的に低下させることで、ストレス耐性を高めるという従来の考え方と正反対なもので大変興味深い。乾燥ストレスだけでなく、環境ストレス耐性植物を開発するために考慮しなければいけない重要な発見であると考えられる。

一度光化学系 の活性を低下させた細胞が、その後再湿潤状態もしくは等張条件に戻したときに活性を回復する仕組みの解明までは時間が足りずおこなうことができなかった。これについては、今後の研究で明らかにしていきたいと考えている。意外なことに、*Synechocystis* では、高張ストレス下で光化学系 では無く、光化学系 を含む光化学系 の下流の活性が先に低下する可能性が示唆された。光化学系 が本当に高張ストレスで失活するかどうかについても、今後明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菅原佑斗, 藤田勇二, 松原真由, 遠藤嘉一郎, 篠田稔行, 鞆達也, 沈建仁, 石井麻子, 神保晴彦, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロール(PG714)と相互作用するD1-R140をLeuまたはTyrに置換したSynechocystis sp. PCC 6803変異株の光合成特性
3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原佑斗, 藤田勇二, 松原真由, 遠藤嘉一郎, 篠田稔行, 鞆達也, 沈建仁, 石井麻子, 神保晴彦, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロールと相互作用するPSII反応中心蛋白質の部位特異的のアミノ酸置換がPSIIに与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原佑斗, 篠田稔行, 遠藤嘉一郎, 鞆達也, 沈建仁, 神保晴彦, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロール (PG714)と相互作用するD1-R140 および T231の部位特異的置換がPSIIの機能に与える影響
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Endo, N. Mizusawa, K. Kobayashi, H.-A. Chu, J.-R. Shen, H. Wada
2. 発表標題 Effect of Site-Directed Mutagenesis of Amino-Acid Residues Interacting with a Phosphatidylglycerol on the Function of Photosystem II
3. 学会等名 1st Summer School of the Malopolska Centre of Biotechnology Jagiellonian University (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中路彩花, 青田匡弘, 片山光徳, 篠田稔行, 遠藤嘉一郎, 石井麻子, 鞆達也, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 リゾチーム処理またはガラスビーズ処理で破碎した細胞から単離した <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 光化学系II複合体の比較
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田勇二, 松原真由, 菅原悠斗, 遠藤嘉一郎, 篠田稔行, 鞆達也, 沈建仁, 石井麻子, 小林康一, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロール (PG714)と相互作用するD1-R140 および D2-T231 の光化学系II複合体における役割
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田勇二, 遠藤嘉一郎, 沈建仁, 石井麻子, 小林康一, 和田元, 水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロール (PG714) と相互作用するD2-T231への部位特異的変異がPSIIに与える影響
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中路彩花, 藤田勇二, 石井麻子, 水澤直樹
2. 発表標題 トレハロースが光化学系 II の構造と機能に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松原真由、菅原佑斗、遠藤嘉一郎、沈建仁、石井麻子、小林康一、和田元、水澤直樹
2. 発表標題 ホスファチジルグリセロール分子と相互作用するD1-R140への部位特異的変異が光化学系の機能に与える影響
3. 学会等名 日本植物学会第81回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

法政大学学術研究データベース <a href="http://kenkyu-web.i.hosei.ac.jp/Profiles/28/0002762/profile.html">http://kenkyu-web.i.hosei.ac.jp/Profiles/28/0002762/profile.html</a>
---

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考