

令和 2 年 11 月 20 日現在

機関番号：82675

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19431

研究課題名(和文)極域光合成生物の適応戦略とその多様性の解明-新規光応答プロセスの探索-

研究課題名(英文)Adaptation strategy in photosynthetic organisms to ambient light condition in Antarctica

研究代表者

小杉 真貴子(Kosugi, Makiko)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・アストロバイオロジーセンター・特任研究員)

研究者番号：00612326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：南極の陸上環境に大きな群落を形成するナンキョクカワノリに見つかった新規の光応答プロセスを解明するために、生理学的実験手法による解析と生育微気象環境の通年モニタリングを実施した。新規のアンテナタンパク質(LHC710)を同定し、LHC710が近赤外線による一連の光合成反応を可視光と同等の効率で可能としていることを明らかにした。生育環境下において、LHC710は可視光が少なく近赤外線の割合が多いコロニーの内部で発現していることから、コロニー内部の光合成効率を上げることで群落全体の光合成生産量を増加させ、本種の南極環境下における生育優位性に寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酷な環境に生きる生物の適応戦略を明らかにすることは、地球上に成り立つ生命現象の柔軟性と限界を理解する上で重要である。本課題で明らかになった近赤外線利用の光合成メカニズムは可視光より低いエネルギーで酸素発生型光合成を駆動できることから、真核の光合成生物ではこれまでに知られていない新しい励起エネルギー移動反応を含む可能性がある。近赤外線吸収を担うタンパク質の同定と構造解析により、光合成色素間の量子化学的反応の詳細に迫る足掛かりを作ることができた。応用面では、可視光が少なく近赤外線が卓越する林床やバイオリアクターにおける光合成生産への利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed physiological experiments and micro-meteorological observation analysis to reveal the novel light response process in *Prasiola crispa* which is a dominant species of green algae in terrestrial condition of Antarctica. We identified the light-harvesting-chlorophyll-binding-protein, LHC710, as a novel red-shifted chlorophylls binding protein, and assigned the amino acid sequence and clarified the spectroscopic features. The LHC710 enables to utilize of far-red light energy to charge separation in photosystem II (PSII) and to perform a series of photosynthesis inside colony where visible light is limited rather than far-red light.

研究分野：植物生理

キーワード：光合成 極域科学 適応戦略 近赤外線 緑藻 励起エネルギー移動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

南極の陸上環境は極度の低温と乾燥に晒された極限環境である。そこには藻類、蘚苔類、地衣類といった光合成生物の中の限られた種と、それを利用する微生物という閉鎖的なコミュニティが成り立っている。彼らは何故このような極限環境で生育することが可能なのか？その生理生態を明らかにすることは、南極生態系への理解だけでなく、地球環境と生物進化の関係を理解する上でも重要である。極域における光合成生物の生理生態学的な適応戦略について生理学の実験手法と生育環境の通年微気象モニタリングにより明らかにすることを目指してきた^{1,2,3)}。その過程で、気生緑藻ナンキョクカワノリ (*Prasiola crispa*) に一般的な光合成生物には見られない顕著な近赤外線吸収帯が存在すること、光環境によって吸収量が増減することを発見した。本研究課題では、この近赤外線吸収成分 (LHC710) の生理学的な機能と分子機構を解明し、極域における生存戦略への寄与を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

ナンキョクカワノリに発見された新規の近赤外線吸収成分 (LHC710) の分子機構と生理学的機能を解明し、生育環境下での有用性を明らかにする。光合成生物の極限環境への適応様式の一部を「分子機構」-「生理学的特性」-「生態」という3つの事象を繋ぐ形で解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 長波長成分 (LHC710) の生理学的特徴づけ

近赤外線吸収成分による光合成活性の寄与を明らかにするため、2つの実験を行った。一つ目に、基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを利用し、550 nm から 750 nm の間で単色光照射に対する光合成活性の波長依存性を酸素電極により測定した。二つ目に、遠赤色光 (>700 nm) と可視光 (620 nm) 照射に対する光化学系 I (系 I) 反応中心の酸化還元活性を測定し、系 I の酸化量と系 II の励起による再還元の程度を比較した。分光学的特性を調べるため、吸収スペクトルと蛍光の発光および励起スペクトルを常温と液体窒素温度 (-197°C) で測定した。

(2) LHC710 タンパク質の単離と同定および構造解析

培養株を用いて LHC710 の発現条件を明らかにし、発現過程における RNA-seq 解析を行った。ナンキョクカワノリから葉緑体チラコイド膜を単離し、密度勾配遠心法と陰イオンカラムにより LHC710 を精製した。LHC710 の分子量とサブユニット構成を電気泳動法により分析した。精製した LHC710 をペプチダーゼ処理により断片化した後、ペプチド鎖の N 末端アミノ酸シーケンスで解析した。得られた内部配列を全て含む配列を RNA-seq で得られたコンティグ配列、およびトランスクリプトーム解析のコンティグ配列⁴⁾ から解析し、全アミノ酸配列を推定した。得られた配列を用いて系統解析を行った。さらにタンパク質構造解析のため、クライオ電顕ネットワークを利用し高エネルギー加速器研究機構のクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica (Thermo Fisher Scientific) による LHC710 の単粒子解析を行った。

(3) 東南極地域のリュッツホルム湾に位置するラングホブデのナンキョクカワノリ生育地に無人微気象観測装置を設置し、1年間のモニタリング観測を行った。観測項目は、温度、湿度、光合成有効放射、紫外線放射、4波長光センサー、カワノリ群落内温度である。1分毎に測定し、10分間の平均値を記録した。また、群落の様子を定点カメラで1時間ごとに記録した。第60次日本南極地域観測隊活動時の2018年12月に設置し、

2020年1月にデータ回収を実施した。

4. 研究成果

(1) 長波長成分 (成分 710) の生理学的特徴づけ⁵⁾

南極で採集したナンキョクカワノリは通常の緑藻と同じく 680 nm 付近にクロロフィル a の吸収帯 (Qy バンド) を持つと共に 705 nm 付近に長波長クロロフィルによる吸収の肩を示した (図 1)。この長波長クロロフィルは常温の蛍光発光スペクトルにおいて 713 nm に顕著な発光帯を示した。大型スペクトログラフを用いた光合成活性の

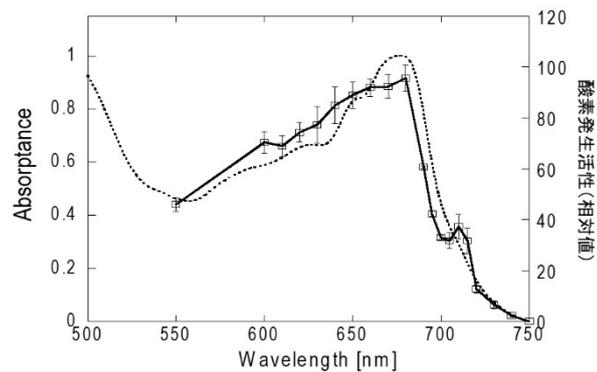


図1. 酸素発生活性の活性スペクトル(実線)と吸光度スペクトル(破線)

波長依存性の測定から、光合成による酸素発生の活性スペクトルにおいて 705 nm 付近に明確なピークが見られること、更に活性スペクトルと吸収率スペクトルが綺麗に重なることが分かった (図 1)。この結果は、705 nm 付近に吸収を持つ長波長クロロフィルが吸収した近赤外線エネルギーが、可視光と同じ効率で水分解を担う系 II を励起することを示している。系 I 反応中心 P700 の酸化還元測定においても、740 nm に放射極大を持つ近赤外線 LED の照射で系 II から系 I への直線的電子伝達による P700 の再還元反応が観測された。更に、系 I の励起に対する系 II 励起の比率が近赤外線と可視光 (620 nm LED) とで等しいことから、系 I と系 II の励起バランスが等しく保たれていることが示唆された。系 II 反応中心が一般的な緑藻と同じである場合、反応中心の励起は 680 nm に相当するエネルギーが必要であるため、遠赤色光による励起は大きなアップヒル型の励起エネルギー移動を伴うことが示唆された。一般的な長波長クロロフィルの機能として、過剰な光エネルギーの散逸 (クエンチング) に寄与することが知られている。LHC710 の発現量が異なるナンキョクカワノリで蛍光発光の光強度依存性を測定したところ、蛍光強度は LHC710 を発現している方がかえって強いことから、クエンチャーとしての役割は低いと考えられた。

(2) LHC710 の分光学的特性

精製した LHC710 は 707 nm に顕著な吸収帯を持ち、吸収スペクトルから結合しているクロロフィルのうちの約 3 割が長波長フォームであることが示唆された (図 2)。青色光励起の蛍光発光スペクトルは細胞と同様に 713 nm に顕著な発光ピークを持ち、液体窒素温度では 730 nm より長波長側にシフトした。2 種類の長波長吸収型のクロロフィルが存在する可能性がある。680 nm における蛍光発光の励起スペクトルを測定すると、吸収スペクトルと同様に 705 nm 付近に長波長クロロフィルの肩が見られたことから、アップヒル型の励起エネルギー移動が LHC710 内で起きていることが示唆された (図 4)。

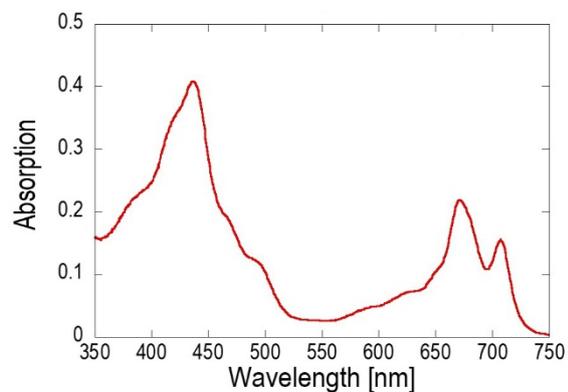


図2. ナンキョクカワノリから精製したLHC710の吸収スペクトル

(3) LHC710 の同定

ナンキョクカワノリ培養株を用いてLHC710の発現が誘導される条件を検索した結果、赤色 LED で誘導されることが分かった。そこで、LHC710 発現誘導過程における RNA-seq 解析を行い、発現過程で増加する m-RNA のコンティグ配列を得た。精製した LHC710 をペプチダーゼ処理で断片化したペプチドの N 末端アミノ酸解析を行い、3 か所の内部アミノ酸配列を得ることに成功した。この3つの配列を全て含む配列を、既に発表されているナンキョクカワノリのトランスクリプトーム解析データから検索し、該当するコンティグ配列が見つかった。このコンティグ配列は RNA-seq 解析で増加した配列との相同性が確認された。この配列を用いて BLAST データベース (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) から検索を行ったところ、LHC710 は真核光合成生物が持つ集光性アンテナタンパク質である LHC ファミリーの一つであることが分かった。特に緑藻の系 I に結合している LHCI に近縁であったが、LHC710 は系 II にエネルギーを渡していることから新規の LHC であることが示唆された。

(4) LHC710 の立体構造解析

クライオ電子顕微鏡による LHC710 の単粒子解析により、高分解能の 3 次元立体構造を得ることに成功した。色素の立体配置から LHC710 の近赤外線吸収に関わる多量体クロロフィルの存在が明らかになった。この多量体クロロフィルは近縁の緑藻 LHCI には存在せず、クロロフィルが配位するアミノ酸の変異によりクロロフィル同士の距離が近づくことで形成されたと推測された。今後構造と機能の関連を詳細に調べていく。

(5) 生育環境における有用性

ナンキョクカワノリの生育環境をモニタリングするため、南極の群生地に通年微気象観測装置を設置した。冬期間は気温が -10°C を下回るため陸上の生物は凍結、乾燥状態で休眠する。夏期間に氷河や積雪から融解水が供給されることで、本格的に活動を開始すると考えられていた。生理学的実験手法によりナンキョクカワノリは -5°C で活性をほぼ失うことが分かっており¹⁾、群落内の温度データから 11 月から 3 月が活動期間であることが推定された。カワノリ群落周辺の光環境は、直射日光が当たる正午から数時間は $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度の光合成有効放射まで上昇するが、開けた環境と比較すると 1 日の平均値は $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 未満と少なかった。紫外線、青色光 (400-500 nm)、緑色光 (500-600 nm)、赤色光 (600-700 nm)、遠赤色光 (700-750 nm) の割合は、晴天時は赤色光の割合が多く、日陰や曇天時は青色光の割合が増した (図 3)。カワノリ群落はシート状の藻体は何層にも重なって形成されており、発達すると 0.5 mm 程度の厚さになる。このコロニーを上層と下層に分離して内部の光環境を測定すると、可視光は上層でほとんど吸収され、下層では近赤外線の割合が非常に大きかった⁶⁾。上層、下層における長波長クロロフィルの量を比較すると、上層では少なく下層で多く発現していることが分かった。このことから、LHC710 が可視光の利用が制限されるコロニー内部の光合成生産量を増加させることで、コロニー全体の発達に貢献していると考えられた⁶⁾ (図 4)。

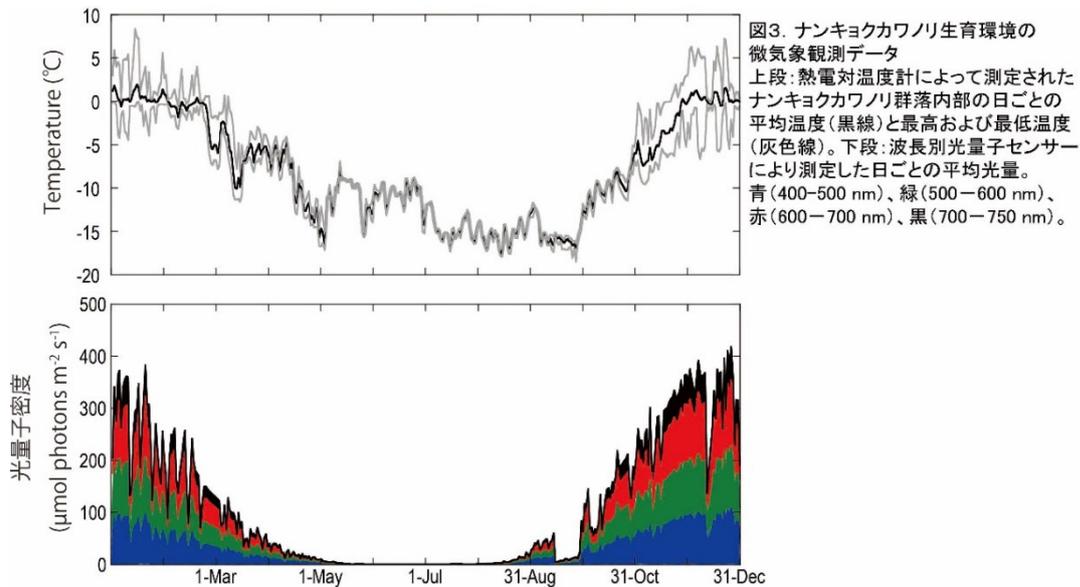


図3. ナンキョクカワリ生育環境の微気象観測データ
 上段: 熱電対温度計によって測定されたナンキョクカワリ群落内部の日ごとの平均温度(黒線)と最高および最低温度(灰色線)。下段: 波長別光量子センサーにより測定した日ごとの平均光量。青(400-500 nm)、緑(500-600 nm)、赤(600-700 nm)、黒(700-750 nm)。

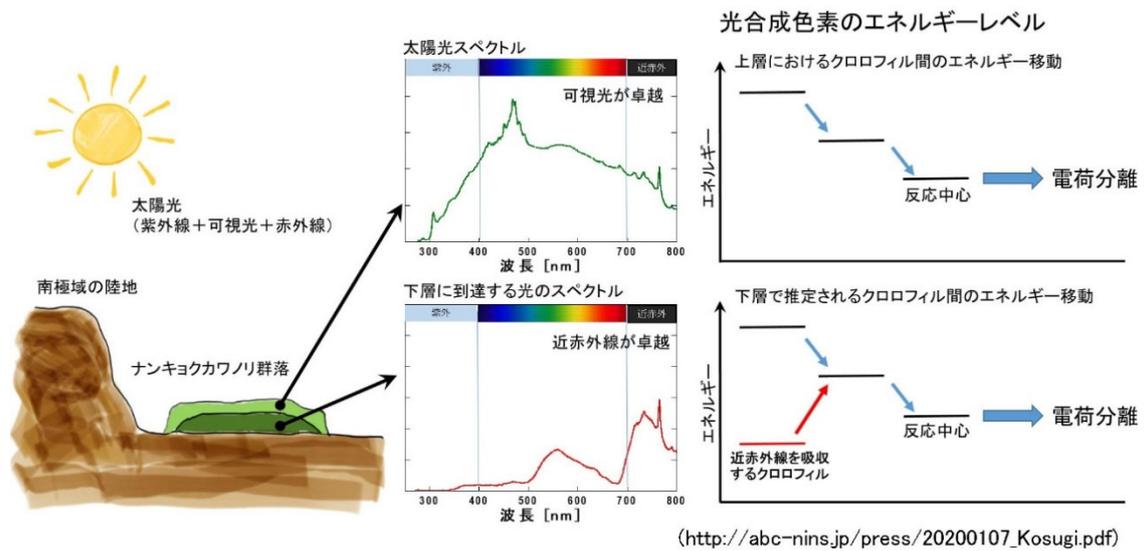


図4. 南極の露岩に生育するナンキョクカワリ群落の表層と内部における光環境の違いと、本研究で推定された下層における光合成生産を促進する光利用プロセス
 (http://abc-nins.jp/press/20200107_Kosugi.pdf)

<引用文献>

¹Kosugi et al. (2010) Comparative study on the photosynthetic properties of *Prasiola* (chlorophyceae) and *Nostoc* (cyanophyceae) from Antarctic and non-Antarctic sites, *J. Phycol.* 46: 466-476, ²Kosugi et al. (2013) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts, *Plant & cell physiol.* 54 (8):1316-25, ³Kosugi et al. (2018) A comparative study of wavelength-dependent photoinhibition of drought tolerant photosynthetic organisms in Antarctica and the potential risks of photodamage in the habitat. *Ann. of Bot.*, doi: 10.1093/aob/mcy139, ⁴Carvalho et al. (2018) De novo Assembly and Annotation of the Antarctic Alga *Prasiola crispa* Transcriptome, *Front. Mol. Biosci.* doi: 10.3389/fmolb.2017.00089, ⁵Kosugi et al. (2020) Red-shifted chlorophyll a bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, *Prasiola crispa*, harvested in Antarctica. *Biochim. Biophys. Acta* Doi:10.1016/j.bbabi.2019.1481, ⁶小杉 他 (2020) 南極露岩域に生育するナンキョクカワリの光合成適応戦略, 光合成研究 30巻 19-25

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Makiko Kosugi, Shin-Ichiro Ozawa, Yuichiro Takahashi, Yasuhiro Kamei, Shigeru Itoh, Sakae Kudoh, Yasuhiro Kashino and Hiroyuki Koike	4. 巻 1861
2. 論文標題 Red-shifted chlorophyll a bands allow uphill energy transfer to photosystem II reaction centers in an aerial green alga, <i>Prasiola crispa</i> , harvested in Antarctica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2019.1481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小杉真貴子、伊藤美空、小池裕幸	4. 巻 30
2. 論文標題 南極露岩域に生育するナンキョクカワノリの光合成適応戦略	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光合成研究	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Makiko Kosugi
2. 発表標題 Characterization and identification of the red-shifted chlorophyll binding protein of a terrestrial green alga, <i>Prasiola crispa</i> harvested in Antarctica
3. 学会等名 International Conference on Microbial Photosynthesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makiko Kosugi, Shin-ichiro Ozawa, Rika Okamoto, Yurie Kubo, Mitsuolwadata, Yasuhiro Kamei, Sakae Kudoh, Yasuhiro Kashino, Yuichiro Takahashi, Shigeru Itoh, Kojiro Hara and Hiroyuki Koike
2. 発表標題 An Antarctic terrestrial green alga, <i>Prasiolacrispa</i> , has an unique red-shifted chlorophyll binding protein which permits large uphill energy transfer
3. 学会等名 The Ninth Symposium on Polar Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小杉真貴子
2. 発表標題 極域光合成生物の光獲得と防御をめぐる適応戦略とその多様性
3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小杉真貴子, 小澤真一郎, 伊藤美空, 亀井保博, 菓子野康浩, 高橋裕一郎, 伊藤繁, 小池祐幸
2. 発表標題 南極に生育する緑藻, <i>Prasiola crispa</i> に見られる顕著な長波長シフトクロロフィルの生理学的解析
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	原 光二郎 (Hara Kojiro) (10325938)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授 (21401)	
研究 協力者	小池 裕幸 (Koike Hiroyuki)		
研究 協力者	菓子野 康浩 (Kashino Yasuhiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	工藤 栄 (Kudoh Sakae)		
研究協力者	小澤 真一郎 (Ozawa Shin-Ichiro)		
研究協力者	亀井 保博 (Kamei Yasuhiro)		
研究協力者	伊藤 繁 (Itoh Shigeru)		
研究協力者	丸尾 文乃 (Maruo Fumino)		