

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19370064  
 研究課題名（和文） クロロフィル *d* 導入による低エネルギー新型光合成の作成  
 : 光合成原理の解明  
 研究課題名（英文） Production of a new low energy photosynthesis with chlorophyll *d*:  
 Understanding of principal of photosynthesis  
 研究代表者  
 伊藤 繁 (ITO SHIGERU )  
 名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
 研究者番号：40108634

研究成果の概要： クロロフィル *d* をもつ新発見の光合成生物 *Acaryochloris marina* の光合成系の反応中心複合体及び光捕集系タンパク質の機能と構造その遺伝子をを検討した。クロロフィル *d* 合成系の原因遺伝子は未特定におわったが、クロロフィル *d* を使う光合成系の特性を明らかにした。多様な生物の光合成系の比較研究を行い、光合成光反応系の構築原理を検討した。新規の光センサータンパク質についても研究した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光合成、酸素発生、クロロフィル、電子移動、光生物

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 地上植物はみな緑色である。これは緑を反射し青と赤の光を吸収するクロロフィル *a* (Chl*a*) が反応中心色素蛋白複合体 (RC) 内で太陽光のエネルギーを吸収し、電子の流れに変換利用するからである。赤、黄、青色などの水中藻類やシアノバクテリアも RC には Chl*a* が必須で、Chl*b* などの補助色素は単に光を吸収し、エネルギーを Chl*a* に渡すアン

テナとしてのみ働く。光化学系 I (PSI) では P700、光化学系 II (PSII) では P680 と呼ばれる RC 内部の Chl*a* の 2 量体は 700–680nm の赤色光のエネルギー (1.8eV) で励起され電子をだし、PS II は電子受容体キノンを、PS I は NADP を還元する。酸素発生には Chl*a* の吸収する光子エネルギーが絶対必要だと考えられていた。

(2) しかし、宮下ら ('96 Nature 383, 402) は南太平洋パラオの海産動物ホヤに共生す

る新型の単細胞性シアノバクテリア＝アカリオクロリスを採取し、これが720-740nmの近赤外光(1.7eV以下の光子エネルギー)を吸収する新色素クロロフィル *d* (Ch1*d*) を主要色素として酸素発生光合成をする事を示した (Miyachi ら *Z. Naturforsch C* 52, 636, '97 など)。しかし、同時に Ch1 *a* を5%程度持つので、Ch1 *d* はアンテナとして光を集めるのみかもしれないと推定した。この考えはPS II については主張されつづけた (Mimuro et al. *FEBS Lett* 556, 95, '04, *Biochimica Biophysica Acta* 1412, 37, '99, 1456, 27, '00)。

(3)我々は (Hu et al. *PNAS*, 95, 1319, '98) この生物の PS I 反応中心を単離し、光を集めるだけでなく、RC 内でも Ch1*d* の2量体 (P740 と命名した) が740 nm 光を利用して電子移動に働くことを示し、酸素発生光合成系で初めて Ch1*a* 以外の RC クロロフィルの存在を示した。P740 の性質 (Mino et al. *Chem. Phys. Lett* 411, 262, '05) を ENDOR で示した。(4)光化学系 II では、色素や蛍光寿命測定など (Akiyama et al., *Anal. Sci* 17, 205, '01) から Ch1*a* の2量体 (P680) が働くと主張された。一方我々 (Itoh et al. in *Proc. Int. Cong. S6-028*, '98, Itoh et al., *J. Photosc.* 9, 70, '02) は膜系での電子移動測定から P680 は存在せず、Ch1*d* の2量体 (P725 と命名) が働くと主張した。論争は続いている。アカリオクロリスの新種も日本近海 (Murakami, Miyashita, Mimuro ら *Science*, 303, 1633, '05) や内陸塩湖でも次々発見され (Miller et al. *PNAS* 102, 850, '05) 激しい競争下で研究が進められた。

(5)我々はこの生物の光合成機能、光合成タンパク質の遺伝子、構造、物性を研究した結果、タンパク質部分は他のシアノバクテリアと75-95%の高い相同性を示した (Uzumaki ら '06, *publ* に登録)。したがって、Ch1*d* 合成系を導入すれば、他のシアノバクテリアのRCタンパク質のCh1*a*結合部位にうまく結合し、機能を発揮すると予想する。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では Ch1*d* の合成遺伝子をさぐり、これを他のシアノバクテリアや植物に導入する事を目的とした。これにより、遠赤色光でも光合成が可能な植物を作り出せると期待される。このためには Ch1*d* 合成酵素を決定し、さらに RC タンパク質の一部も変える必要がある。これができれば新植物を作り出せる。

(2)Ch1*d* だけでなく、異なる色素をもつ光合成系も研究することで、光合成における色素

の選択律(光合成原理)をも明らかにする。(3)このために、遺伝子面での研究と、高度なレーザ超高速分光、電子スピン共鳴、単分子イメージング分光などの光合成機能解析方法を組み合わせて、多様な光合成系を解析することも進める。Ch1*d* 合成系を同定できなくとも、多様な光合成系での色素利用の機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

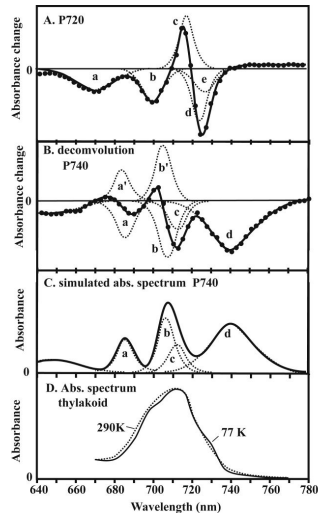
(1)アカリオクロリスのクロロフィル *d* 合成変異株の作製。Ch1*d*はCh1*a*と構造的に1カ所だけ異なる。Ch1*a*の側鎖ビニル基CH<sub>2</sub>CH-がフォルミル基HCO-になっている。HC=O-の2重結合がクロリン環のπ電子系を非対称に拡大し、30nm以上長波長にQ<sub>y</sub>吸収帯をのぼす。構造は650nmを吸収するクロロフィル*b*と、CH<sub>3</sub>COの結合位置が逆側なので効果が逆に出ている。この酵素と光合成タンパク質遺伝子のクローニングと *Synechocystis* PCCC6803への導入を行う。(2)レーザ超高速分光、電子スピン共鳴、単分子イメージング分光などの光合成機能解析方法を組み合わせて、多様な光合成系を解析する。

## 4. 研究成果

(1)クロロフィル *d* をもち近赤外光を利用して酸素発生をする *Acarochloris marina* の光合成系の反応中心複合体及び光捕集系タンパク質の機能と構造の関係を検討した。*A. marin* の光捕集系と反応中心タンパク質複合体の構造、電子移動反応の機構を検討した。タンパク質遺伝子のクローニング、DNA ライブラリーの作製、strain の多様性の確認、この遺伝子の利用系の検討を進めた。残念ながら Ch1*d* 合成系の原因遺伝子は特定できなかった。

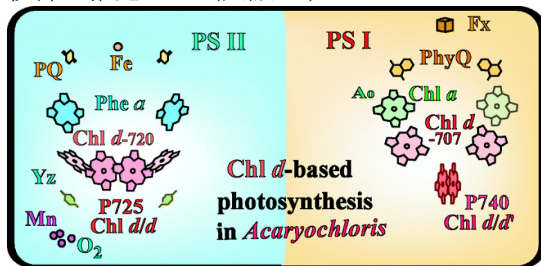
(2)この生物より精製した膜系および、PS II, PS I 反応中心複合体表品でのレーザ分光と極低温でのエネルギー移動の測定、遅延蛍光の測定をおこなった。この結果両方の反応中心の電子供与体にはともに Ch1*d* が使われている事を確認した。レーザ閃光照射にともなう反応中心中核部に存在するクロロフィルの吸収波長、電子供与体クロロフィルの酸化に伴う吸収帯のシフトを明らかにした。下図1に示したようにPSIIは725nm, PSIは740nmに吸収極大をもつ酸化還元差スペクトルを示した。これらのスペクトルではさらに短波

長側にも吸収変化がみられる。これはP近傍のChldの応答として確認される。このスペクトルの解析から、反応中心でのクロフィルの関係を議論した。(図1、PSII(A)とPSI(B)の



示す吸収変化。BにはPSI反応中心のクロフィル吸収帯のシミュレーション結果も示す。Dは膜全体の吸収スペクトル)。

(3)以下のクロフィル配置をPSII, PSI中核部で推定した(文献10)



(4)Acidiphilium rubrumの反応中心(文献11):この細菌は、他の光合成生物のもたないZn-バクテリオクロフィルaをもつ。この反応中心とアンテナ色素タンパク質を精製し、励起エネルギー移動と電子移動過程をフェムト秒領域まで測定した。結果はZn-バクテリオクロフィルaでも高速にエネルギーと電子移動を示した。

(5)緑色硫黄細菌Chlorobium tepidum(文献2)とヘリオバクテリア(文献5)のホモダイマー型反応中心:これらの最も古い細菌群のもつ光化学系Iの祖先型ホモダイマー型反応中心内の電子移動経路を探った。反応中心に結合したPscDがエネルギー移動効率の向上に働くことを示した。阪大、大岡らが作成したシトクロムの除去変異株を利用して電子移動反応経路を明らかにした。

(6)緑色無硫黄光合成細菌Chloroflexus aurantiacusのもつ巨大アンテナ色素複合体クロソームの蛍光の、1分子測定を温度4Kで行い(文献13)、分子構造の揺らぎが励起エネルギー移動に重要な役割を果たすことを示した。偏光単分子顕微分光により、この巨大複体内での色素配向角を明らかにし

た。

(7)シアノバクテリアSynechocystis PCC 6803で、膜の少量脂質成分フォスファチジルグリセロール(PG)を遺伝子操作で欠失させると光化学系IIの電子受容体キノンQBの機能がとまることを示し、この脂質のキノン反応での役割を明らかにした(文献7)。さらに脂質再構成に伴い、構造中にみられる2分子のPGに対応した2段階の回復が起こることを明らかになった。

(8)好熱性紅色光合成細菌Thermochromatium tepidumと好熱性シアノバクテリアThermosynechococcus elongatusの光合成反応中心とアンテナタンパク質を精製し、2,6,8,10nmと異なるサイズの内径をもつシリカ細孔内に導入した(トヨタ自動車株式会社、トヨタ中央研究所との共同研究)人工環境下でうまく機能させることに成功した(論文準備中)。

(9)新たに発見されたシアノバクテリアの青色センサーBLUF(PixD)の反応機構を部位特異的アミノ酸変異タンパク質を用いて検討した(文献4)。2種の間体を同定し、好熱性と常温性のタンパク質の構造と機能の違いを明らかにした(文献15)。さらに新型の赤色-緑色2状態をとる光センサータンパク質AnPixJの光反応中間体4種を時間分解分光法で同定した。(文献3)

(10)珊瑚の共生渦鞭毛藻Symbiodiniumの離脱による白化現象の原因を、温度耐性の異なる2種のSymbiodiniumの違いの研究から、光化学系IIのアンテナタンパク質の温度耐性の違いがこの違いをもたらすことを明らかにした(文献1)

(11)ChldとZnバクテリオクロフィル関連の合成化合物の超高速反応をレーザー分光で検出した(文献9、14)。植物の光化学系Iでの極低温励起エネルギー移動機構と電荷分離状態の検討をおこなった(文献6)。珪藻のPSIでの10Kでの高速エネルギー移動経路を決めた(文献8)

(12)酸素発生系ではたらくMn-4原子の近傍の水素イオンの位置をENDOR法で探り、そのうちのひとつが反応中間状態と密接な関係がある事(おそらく反応基質となっている)を明らかにしたと(文献12)

(13)多様な光合成系の研究から、光合成機能の本質的な部分はきわめて柔軟な可塑性をもち、これに特殊最適化した部分が加わることで多様な光合成生物がうまれてきたことが理解される。

(14)この結果を活用してシリカナノ構造体と耐熱性光合成反応中心タンパク質を組み

合わせた酸素発生型人工光合成系（一部トヨタ自との共同研究）の検討もすすめた。本研究の主要課題ではないが、世間の関心も高く、バイオガソリンの発売に合わせて企画された「車のこれから」というNHKラジオ特集番組中で報道された。

#### 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 15件)

- ① Heat stress causes inhibition of the *de novo* synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. Takahashi, S., Whitney, S. Itoh, S. Maruyama, T., Badger, M. *Proc. Natl. Acad. Science, USA* (2008) 105, 4203-4208 査読有り
- ② Parallel electron donation pathways to cytochrome *cz* in the type I homodimeric photosynthetic reaction center complex of *Chlorobium tepidum*. Tsukatani, Y., Azai, C., Kondo, T., Itoh, S., Oh-oka, H. *Biochim. Biophys. Acta* 1777 (2008) 1211–1217. 査読有り
- ③ A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion. Narikawa, R., Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S. and Ikeuchi, M. *J. Mol. Biol.* (2008) 380, 844-855. 査読有り
- ④ Photoreactions of Tyr8- and Gln50-mutated BLUF domains of the PixD protein of *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: photoconversion at low temperature without Tyr8. Fukushima Y, Murai Y, Okajima K, Ikeuchi M, Itoh, S. *Biochemistry* (2008) 47,660-9. 査読有り
- ⑤ An electron spin-polarized signal of the P800+A1(Q)- state in the homodimeric reaction center core complex of *Heliobacterium modesticaldum*. Miyamoto, R, Mino, H., Kondo, T, Itoh, S., Oh-Oka, H. *Biochemistry* (2008)47,4386-93. 査読有り
- ⑥ Temperature-dependent energy gap of the primary charge separation in photosystem I: study of delayed fluorescence at 77-268 K. Shibata, Y., Akai, S., Kasahara, T., Ikegami, I., Itoh, S. *J Phys Chem B.* (2008) 112,6695-6702. 査読有り
- ⑦ Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II in a

*cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. Laczkó-Dobos H, Ughy B, Tóth SZ., Komenda J., Zsiros O, Domonkos I, Párducz A, Bogos B, Komura M, Itoh, S. Gombos Z. *Biochim Biophys Acta* (2008) 1777,1184-94. 査読有り

- ⑧ Photosystem I complexes associated with fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. Ikeda Y, Komura M, Watanabe M, Minami C, Koike H, Itoh, S. Kashino, Y., Satoh, K. *Biochim Biophys Acta.* (2008) 1777, 351-61. 査読有り
- ⑨ Covalently linked zinc chlorophyll dimers as a model of a chlorophyllous pair in photosynthetic reaction centers. Tamiaki, H., Kazuhiro Fukai, H., Shimazu, H., Nishide, K., Shibata, Y., Itoh, S. and Kunieda M. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, 7, 1231–1237. 査読有り
- ⑩ Function of chlorophyll *d* in reaction centers of photosystems I and II of the oxygenic photosynthesis of *Acaryochloris marina*, Itoh, S., Mino, H., Itoh, K., Shigenaga, T., Uzumaki, T. and Iwaki, M. *Biochemistry* (2007) 46, 12473-12481. 査読有り
- ⑪ Energy and electron transfer in the photosynthetic reaction center complex of *Acidiphilium rubrum* containing Zn-bacteriochlorophyll *a* studied by femtosecond up-conversion spectroscopy, Tomi, T., Shibata, Y., Ikeda, Y., Taniguchi, S., Chosrowjan, H., Mataga, N., Shimada, K. and Itoh, S.\* *Biochim. Biophys. Acta* (2007) 1767, 22-30. 査読有り
- ⑫ Protons bound to the Mn cluster in photosystem II oxygen evolving complex detected by proton matrix ENDOR, Yamada, H., Mino, H. and Itoh, S. *Biochim. Biophys. Acta* (2007) 1767, 197-203. 査読有り
- ⑬ Polarized fluorescence of aggregated bacteriochlorophyll *c* and baseplate bacteriochlorophyll *a* in single chlorosomes isolated from *Chloroflexus aurantiacus*, Shibata, Y., Saga, Y., Tamiaki, H. and Itoh, S. *Biochemistry* (2007) 46, 7062-7068. 査読有り
- ⑭ Excited-state dynamics of normal and doubly N-confused type hexaphyrin

derivatives studied by time-resolved fluorescence measurements, Ryu, J-H., Ito, F., Nagamura, T., Nakamura, K., Furuta, H., Shibata, Y. and Itoh, S., *Chem. Phys. Lett.* (2007) 443, 274-279. 査読有り

⑮ Two intermediate states *I* and *J* trapped at low temperature in the photocycles of two BLUF domain proteins of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, Fukushima, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M. and Itoh, S., *Photochem. Photobiol.* (2007) 83, 112-121. 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

国際会議・招待講演

① S. Itoh, K Sugiura, K Satoh and M. Komura. Fluorescence Studies of single cells of Cyanobacteria and Lichen. 4th Asia Oceania Conference of photobiology, Baranasi, India, 2008 Nov 24-26

② S. Itoh, K. Sugiura, S. Keisuke, Y. Shibata and M. Komura Picosecond and confocal fluorescence studies of chlorophylls in cyanobacteria, lichen and higher plant at 4 K and room temperature International Conference "Photosynthesis in the Global Perspective" Nov. 27-29, 2008 Devi Ahilya Univ. Indore, Madhya Pradesh, India

③ H. Mino The S-state dependence of the location and affinity of the protons bound to the manganese cluster in photosystem II International Conference "Photosynthesis in the Global Perspective" Nov. 27-29, 2008 Devi Ahilya Univ. Indore, Madhya Pradesh, India

国際会議・一般講演 (口頭発表)

④ H. Mino, H. Nagai, Y. Fukushima, K. Okajima, M. Ikeuchi and S. Itoh Pulsed EPR Study of the Light-induced Radicals in a Blue Light Sensor Protein TePixD. Asia Pacific EPR Society - EPR Symposium 2008, 2008 July 13-18, Cairns Convention Centre, Cairns, Australia,

⑤ C. Kamidaki, I. Oda, S. Ishizaka, T. Noji, D. Fujita, T. Kajino, Y. Fukushima, T. Sekitoh and S. Itoh. Chlorophyll-Proteins Inside Silica Mesoporous Material ; Function of Bacterial Light Harvesting-II Complex and Photosystem I Reaction Center Complex, IUMRS-ICA2008, 2008, Dec 09-13, Nagoya congress center, Nagoya,

国内会議・招待講演

⑥ 伊藤繁

「PSI・II反応中心のシリカナノポア内への導入とクロロフィルやキノンの置換」第46回日本生物部理学会大会 2008年12月5日付(福岡)

国内会議・一般講演

⑦ 富田祐介、青木俊、野地智康、上滝千尋、宇津巻竜也、神哲郎、成川礼、池内昌彦、梶野勉、伊藤繁 光センサータンパク質 AnPixJ のシリカメソ多孔体内への導入 生物物理学会中部支部講演会 (名古屋大学) 2009年3月21-23日

⑧ 上滝千尋、石坂壮二、野地智康、梶野 勉、福嶋 喜章、関藤 武士、伊藤 繁、シリカメソ多孔体への光合成膜タンパク質光化学系 I の導入とその機能の評価。第50回日本植物生理学会年会 (名大) 2009年3月21-23日

⑨ 富田祐介、青木俊、野地智康、上滝千尋、宇津巻竜也、神哲郎、成川礼、池内昌彦、梶野勉、伊藤繁、光センサータンパク質 AnPixJ のシリカメソ多孔体内への導入、第50回日本植物生理学会年会 (名大) 2009年3月21-23日

⑩ 小村理行、三宅博之、山岸篤史、柴田穰、岩崎郁子、山本好和、伊藤繁、極低温フェムト-ピコ秒時間分解蛍光測定による乾燥地衣類光化学系 II の高速励起エネルギー消光過程の解析。第50回日本植物生理学会年会 (名古屋大学) 2009年3月21-23日

⑪ 山岸篤史、池田洋平、小池裕幸、佐藤和彦、小村理行、柴田穰、伊藤繁。珪藻の光化学系 I アンテナコア超分子複合体上での超高速励起エネルギー移動。第50回日本植物生理学会年会 (名古屋大学) 2009年3月21-23日

⑫ 柴田 穰、山岸 篤史、小村 理行、伊藤繁 極低温での光化学系 I 反応中心の超高速エネルギー捕集過程の解析、第50回日本植物生理学会年会 (名古屋大学) 2009年3月21-23日

⑬ 山岸篤史、池田洋平、小池裕幸、佐藤和彦、小村理行、柴田穰、伊藤繁 極低温時間分解蛍光測定による中心目珪藻 *Chaetoceros gracilllis* の光化学系 I 超分子複体内のエ

エネルギー移動の解析 日本生物物理学会第 46 回年会 (福岡国際会議場) 2008 年 12 月 3-5 日

⑭近藤徹, 松岡昌弘, 浅井智広, 吉岡哲記, 三野広幸, 大岡宏造, 伊藤繁

対称型光合成反応中心タンパク質複合体内で機能する電子伝達体の配位構造, 日本生物物理学会第 46 回年会 (福岡国際会議場) 2008 年 12 月 3-5 日

⑮山川壽伯, Md Rafiqul Islam, 佐藤和彦, 小池裕幸, 伊藤繁

ジビニルクロロフィルを持つシアノバクテリア変異体 PS I、PS II の分光的解析, 日本植物学会第 72 回年会 (高知大学) 2008 年 9 月 25-27 日

⑯三野広幸・長井浩子

新型光合成反応中心シアノバクテリア *Acaryochloris marina* の光化学系 I の機能と電子移動反応, 第 47 回電子スピンスイエンズ学会年会 (九州大学) 2008 年 10 月 1-3 日

⑰小村理行, 佐藤圭介, 伊藤繁, 岩崎郁子, 山本好和

地衣類内共生シアノバクテリアのレーザー共焦点顕微鏡解析 I: 地衣 4 種における地衣組織内分布と色素系比較, 第 7 回日本地衣学会 (秋田県立大学) 2008 年 7 月 5-6 日

⑱佐藤圭介, 小村理行, 岩崎郁子, 山本好和, 伊藤繁

地衣類内共生シアノバクテリアのレーザー共焦点顕微鏡解析 I: 秋田県高尾山と田沢湖で採集したモミジツメゴケ内部と単離培養した *Nostoc* の色素比較, 第 7 回日本地衣学会 (秋田県立大学) 2008 年 7 月 5-6 日

⑲山川壽伯, 中西弘充, 宮本幸一良, 林田信明, 小村理行, 伊藤繁

ジビニルクロロフィルを持つシロイヌナズ

ナ変異体 *pcb2* の光合成能と熱耐性。第 8 回光合成研究会シンポジウム (名古屋大学) 2008 年 5 月 25-26 日

[図書] (計 2 件)

①伊藤繁 (共著) 光合成研究法 日本光合成研究会 編、低温化学、北大低温研 2008 総頁数 679

②伊藤繁 (共著) 生物物理学ハンドブック、日本生物物理学会編、朝倉書店 2007 総頁数 680

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/index2.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 繁 (ITO SHIGERU)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 40108634

### (2) 研究分担者

三野 広幸 (MINO HIROYUKI)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 70300902

### (2) 研究分担者

宇津巻 竜也 (UDUMAKI TATSUYA)

名古屋大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号: 60402418

### (2) 研究分担者

石浦 正寛 (ISHIURA MASAHIRO)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号: 20132370