

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570040

研究課題名(和文) 紅色光合成細菌の光合成電子伝達網の全容解明と計画的改変

研究課題名(英文) Detailed analysis and genetic modification on photosynthetic electron transfer network in purple photosynthetic bacteria

研究代表者

永島 賢治 (NAGASHIMA KENJI)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：80264589

研究成果の概要(和文)：紅色光合成細菌ルブリバクス・ゲラチノーサスにおいて光合成反応中心複合体への電子供与体として働きうるタンパク質が、少なくとも5種類あることを明らかにした。5番目に見つかったものは単ヘムの水溶性チトクロム *c* で、ゲノム解析の結果からは亜硝酸還元で主に働く NirM と同定された。光合成と亜硝酸還元の電子供与体が系統進化的に関連していることと、この NirM の大量発現株を光合成培養することで高い亜硝酸還元活性が得られることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It has been clarified that the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, has, at least, five electron carrier proteins potentially working as electron donors to the photochemical reaction center complex. One of them, the most recently found, was a mono-heme cytochrome *c*, which was identified as NirM included in the nitrite reduction pathway, based on the genome analysis on this bacterium. This shows that electron carriers included in photosynthesis and nitrite reduction are phylogenetically related. It has been also shown that a mutant strain synthesizing a large amount of NirM acquires a high ability in nitrite consumption under the photosynthetic growth conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

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：光合成、細菌、電子伝達、チトクロム、亜硝酸還元、ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

光合成電子伝達反応は、反応中心複合体に含まれる特別なクロロフィル二量体が光励起され電子を放出することにより始まる。電子を放出したクロロフィルは速やかに他の電子供与体から電子を受け取り、次の光化学反応に備える。シアノバクテリアや葉緑体の

反応中心複合体では水を電子供与体として用いるが、紅色光合成細菌の反応中心複合体は多様な電子伝達タンパクから電子を受け取る。

光合成細菌で最も良く研究されてきた電子供与体はチトクロム *c<sub>2</sub>* である。このチトクロムは *c* 型ヘムを1つ結合した分子量1万前

後の水溶性のタンパクで、同様な構造・機能を持つものとしてチトクロム  $\alpha_8$  も知られている。近年、イタリアのグループによってチトクロム以外に HiPIP (高電位鉄-イオウタンパク : High-Potential Iron Sulfur Protein) も反応中心への電子供与体として働くことが報告され、電子供与体の多様性とそれぞれの生理的役割の違いに注目が集まるようになっていた。報告者らのグループは紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* において 2 種類のチトクロム  $\alpha_8$  と 1 種類の HiPIP が反応中心への電子供与体として機能することを明らかにし、一連の遺伝子欠損株の作製を通じ、中でも HiPIP が主要な供与体でチトクロム  $\alpha_8$  は補助的に働くことを明らかにしていた。その後、これまで生理機能がよく分かっていなかったチトクロム  $\alpha_4$  (2-ヘム型で分子量 25,000 程度の c 型チトクロム) もまた反応中心への電子供与体として働くことを見いだしていた。

しかしながら、これら 4 つの電子供与体全てを欠損した株を作成しても光合成能は失われなかったため、まだ未知の供与体があるものと推測された。そこで報告者は全ての電子供与体とそれを含む電子伝達経路を網羅的に調べるべく、独立法人製品評価機構 (NITE) との共同研究で *R. gelatinosus* の全ゲノム解析に着手した。一方で申請者は平成 16 年度科学研究費補助金・基盤研究(C)「光合成初期反応におけるチトクロム間およびチトクロム内の電子伝達機構の研究」および平成 18 年度同補助金・基盤研究(C)「細菌型光合成の初期反応における電子供与体の多様性とダイナミクス」により *R. gelatinosus* など紅色光合成細菌を使った電子伝達反応機構解明のための基礎研究も進めていた。その結果、チトクロム  $\alpha_8$  と HiPIP が反応中心表面の異なる荷電アミノ酸を認識し結合場所を見分けることをモデル化するとともに、反応中心結合チトクロムのヘム近傍アミノ酸に対する変異導入により、ヘムの中点電位 (電子親和性) を広い範囲で段階的に変えることに成功していた。こうした変異はタンパク内部での電子伝達速度の大幅な変化を引き起こした。これらの研究から報告者が得た感触は、電子伝達反応は人為的な改変が可能であるということであった。

## 2. 研究の目的

紅色細菌の反応中心に対する電子供与体として、本研究開始時点までに 4 種類のタンパクを同定したが、まだ未知のものが存在することは明白であった。本研究では平行して進行中であった *R. gelatinosus* 全ゲノム情報解読の研究成果を活用して、こうした未知の電子供与体を推測し、遺伝子欠損株の作成を通じて潜在的な電子供与体の全てを同定す

ることをまず第一段目の目標とした。これら複数ある電子供与体がそれぞれどのような経路で電子を得ているかを逐一明らかにすることを第 2 段目の目標とし、欠損株・野生株の様々な培地組成における光合成生育実験やタンパク合成量の測定など生理・生化学実験と、閃光照射後の電子伝達を追う時間分解分光実験を両輪として研究を進めた。さらにはその部分経路を遺伝子操作により欠落、減衰あるいは増強し、特定のエネルギー代謝産物の過剰蓄積や消費など、光エネルギーによって駆動される人工的な代謝経路の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

- (1) 紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* において既知の 4 種類の電子伝達タンパクの多重欠損株およびその変異回復株を中心に、ペリプラズム画分より水溶性電子伝達タンパク、特に c 型チトクロムを中心に精製し、光合成膜標品との再構成実験や、時間分解閃光照射実験により反応性を評価する。また、光化学反応中心複合体への電子供与体が明白になっていない緑色繊維状光合成細菌 *Roseiflexus castenholzii* についても野生株を用いて同様の実験を行い、電子伝達タンパクの多様性を評価する。*R. castenholzii* では銅タンパクであるオーラシアニンがその候補として考えられているが、まだ確証がない。
- (2) 独立行政法人製品評価技術基盤機構と共同で *R. gelatinosus* の全ゲノム情報の解析を進め、水溶性電子伝達タンパクのホモログの検索、およびこれらに電子を供給することが予想される膜結合性電子伝達タンパク (有機酸の分解および窒素・硫黄代謝に働く酵素群を想定) を選定する。選定された遺伝子について欠損変異株を作成し、様々な培地での生育を調べることを通じてその生理機能を明らかにする。変異株の作成欠損株の作成は、標的領域を欠落させた自殺プラスミドをエレクトロポレーション法または大腸菌からの接合伝達により導入することで行う。プラスミド上には枯草菌由来の Sac 遺伝子 (ショ糖存在下で細胞致死を誘発) を組み込んでおき、相同組み替えの 2 段階選択により欠損株を得る。欠損株の最終的な確認は PCR 法とその増幅産物の塩基配列決定により行う。
- (3) 分光測定による機能評価生理試験と平行して、あるいはその結果に基づき変異株の生細胞を用いた定常光照射および閃光照射実験を行い、特定の基質からの電子の流れを追求する。反応は主にチトクロムの酸化還元に伴う吸収変化を分

光光度計を用いて検出する。当該研究室保有のミリ秒単位までの測定が可能な装置に加え、フランス原子力庁カダラッシュ研究所の Andre Vermeglio 博士および生物物理化学研究所 (CNRS/IBPC) の Jean Alric 博士の管理する、レーザーを利用したマイクロ/ナノ秒単位の時間分解分光装置も利用する。

#### 4. 研究成果

*Rubrivivax gelatinosus* IL144 株は光合成反応中心への電子伝達体タンパクとして HiPIP、チトクロム  $c_4$ 、高電位型および低電位型チトクロム  $c_8$  を持つことがすでに明らかとなっているが、これら4つの電子伝達タンパクの遺伝子を欠落させた株から新たに水溶性でモノヘムのチトクロム  $c$  を見いだした。このチトクロム  $c$  の遺伝子を分析したところ、タンパクの一時構造はチトクロム  $c_8$  に類似していたものの、ゲノム情報と照らし合わせたところ、亜硝酸還元酵素への電子伝達をすることで知られるチトクロムである NirM と同定された。再構成実験と閃光照射実験によりこの NirM が光合成反応中心へ電子を伝達することも確認されたことから、*Rvi. gelatinosus* の NirM は亜硝酸還元経路と光合成電子伝達経路の両方で働くことが推測された。しかし *Rvi. gelatinosus* は他の  $\beta$ -プロテオバクテリアの光合成細菌と同様、亜硝酸還元能を持たないとされていた。そこでこのことの真偽を確かめ、さらには一般的な硝酸呼吸 (脱窒) の能力を持つか否かを調べるため、ゲノム解析情報を精査した。その結果、完全な脱窒反応 ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) の第1段階である硝酸還元 ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) 酵素遺伝子は見つからず、培養実験からも認められなかった。しかし亜硝酸の完全還元に必要な亜硝酸還元 ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) 酵素、一酸化窒素還元 ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) 酵素、亜酸化窒素還元 ( $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) 酵素の遺伝子が見いだされ、亜硝酸呼吸による生育も確認された。これら酵素遺伝子の系統解析からは、*Rvi. gelatinosus* には光合成遺伝子群を獲得する以前からこれらの遺伝子群が存在していたことが考えられた。他の脱窒菌での研究では、脱窒関連遺伝子群は種や系統によって4段階の脱窒反応を担う酵素群の内一つないし数種を進化の過程で失うことがしばしば起こることが報告されている。従って、*Rvi. gelatinosus* IL144 株の祖先株はかつて完全な脱窒を行っていたことと、完全な脱窒を行える *Rvi. gelatinosus* の系統の存在が示唆された。また、HiPIP、チトクロム  $c_4$ 、高電位型および低電位型チトクロム  $c_8$  を欠損させた複合変異株  $\Delta$  IHL4 において、光合成生育速度が復活する変異株 ( $\Delta$  IHL4-spd) が高頻度で得られるが、これらの株では NirM を

含む亜硝酸還元酵素遺伝子群 (*nir* オペロン) が大量発現していることが、精製タンパクの解析や RT-PCR による亜硝酸還元酵素遺伝子の発現解析、亜硝酸還元活性の測定などから推定された。培養実験にて、 $\Delta$  IHL4-spd 株だけでなく、亜硝酸の培地への添加によって *nir* オペロンの発現が誘導された  $\Delta$  IHL4 株においても光合成生育速度が復活した。これは NirM が亜硝酸還元酵素だけではなく光化学反応中心複合体へも電子を供与しているためと考えられた。興味深いことは  $\Delta$  IHL4-spd 株が光を照射した光合成培養条件で野生株に比べ非常に高い亜硝酸還元能を示したことで、これは生物の持つ光エネルギー代謝を人為的に改変出来たことを示す。細菌を利用した窒素酸化物 ( $\text{NO}_x$ ) の処理に活用できるかもしれない。

緑色繊維状細菌 *Roseiflexus castenholzii* からは1種類のオーラシアニン (銅タンパク) が見いだされ、その遺伝子を大腸菌で発現させ大量精製することに成功した。銅を含まないアポタンパクとして得られたが、0.25 mM 硫酸銅存在下で自発的に銅イオンを取り込み、特有の吸収スペクトルと EPR スペクトルおよび酸化還元中点電位を示した。しかしながらこの精製オーラシアニンを *R. castenholzii* 光合成膜および精製した反応中心に大量に加えて閃光照射実験を行っても電子伝達は観察されなかった。*R. castenholzii* でのオーラシアニン合成量がかなり低いことと考えると、このタンパクが光合成電子伝達に含まれていない可能性が高くなった。

#### 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3件)

- ① Nagashima S, Shimada K, Verméglio A, Nagashima KVP (2011) The cytochrome  $c_8$  involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in *Rubrivivax gelatinosus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 189-196 査読あり
- ② Tsukatani Y, Nakayama N, Shimada K, Mino H, Itoh S, Matsuura K, Hanada S, Nagashima KVP (2009) Characterization of a blue-copper protein, auracyanin, of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Roseiflexus castenholzii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 490, 57-62 査読あり
- ③ Ohmine M, Matsuura K, Shimada K, Alric J, Vermeglio A, Nagashima KVP (2009) Cytochrome  $c_4$  can be involved in the photosynthetic electron transfer system in

the purple bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*.  
Biochemistry 48, 9132-9139 査読あり

[学会発表] (計7件)

- ① 近藤政晴、原田香織、永島咲子、永島賢治、橋本秀樹、出羽毅久、南後守 (2011. 3) 光合成のアンテナ系-反応中心複合体のITO基板上への組織化と光電流応答. 第91回 日本化学会年会 (横浜)
- ② 永島賢治 (2011. 3) 光合成で駆動する新しい生物代謝: 細菌への遺伝子操作による試み. 第91回 日本化学会年会 (横浜)
- ③ 中山陽介、JEAN ALRIC、嶋田敬三、永島賢治 (2010. 3) 紅色光合成細菌の光化学反応中心結合型チトクロム $c$ に含まれる低電位ヘムの機能解明のための実験系の確立. 第51回日本植物生理学会年会(熊本)
- ④ 永島咲子、嶋田敬三、永島賢治 (2009. 3) 紅色光合成細菌*Rubrivivax gelatinosus*のイソ型高電位チトクロム $c_8$ の光合成電子伝達への寄与及び同遺伝子周辺領域のDNA解析. 第50回日本植物生理学会年会 (名古屋)

[図書] (計3件)

- ① 永島賢治(2010)光合成細菌 一研究材料としての魅力一. 光合成研究 20, pp78
- ② 永島賢治(2009)3章 単離・精製・活性測定: 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量: c. シトクロム. 低温科学 vol.67「光合成研究法」pp223-225
- ③ 永島賢治(2009)4章 分光測定: 4. 酸化還元滴定. 低温科学 vol.67「光合成研究法」pp545-550

[その他]

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/celene/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永島 賢治 (NAGASHIMA KENJI)

首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 80264589