

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05814

研究課題名（和文）シアノバクテリアにおける鉄欠乏ストレス耐性機構の解明

研究課題名（英文）The study on mechanism of iron deficiency-stress tolerance 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：光合成生物にとって、鉄はフェレドキシンやシトクロムなど光合成電子伝達担体のコファクターに含まれる重要な微量元素である。本研究では、鉄欠乏ストレスが光合成に与える影響を明らかにすることを目的とした。シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120の細胞を鉄欠乏条件で培養したところ、増殖が一時的に遅延するがその後回復すること、通常培地での培養ではみられない、クロロフィルのQy帯ピークの位置がシフトしたタンパク質複合体が生成していることが示唆された。このタンパク質複合体を解析するために、同一細胞培養液から光化学系（PS II）標品と光化学系（PS I）標品を同時に精製するシステムを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄欠乏ストレスは光合成生物が最も受けやすい環境ストレスの1つで、その主要ターゲットは光合成である。これまでの先行研究では、光合成反応過程のうち主にPSIIへの影響が解析されてきた。本研究では、同じ細胞培養液から高活性なPS II 標品とPS I 標品を同時精製するシステムを開発することができた。光合成ではPS II とPS I が連動した電子伝達系が動いている。両光化学系の解析が可能になったことで、鉄欠乏環境適応過程でおこる光合成系の変化を包括的にとらえることができるようになったという点で学術的意義が大きい。また、鉄欠乏環境への適応機構を解明することは、鉄欠乏耐性作物の開発にもつながり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：For photosynthetic organisms, iron is an important trace element that is contained in cofactors for photosynthetic electron transport system such as a ferredoxin and cytochromes. The purpose of this study was to clarify the effects of iron-deficiency stress on photosynthetic properties. When cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 cells were cultured under iron-deficient conditions, the growth was temporarily retarded but then gradually restored. During adaptation to iron-deficient conditions, a shift of the chlorophyll Qy absorption band was observed, suggesting that a novel protein complex was generated. In order to analyze this protein complex, we developed a system that simultaneously purifies highly active photosystem II and photosystem I preparations from the same cell culture.

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 鉄欠乏

## 1. 研究開始当初の背景

光合成生物にとって、鉄はフェレドキシンやシトクロムなど電子伝達担体のコファクターに含まれる重要な微量元素であるが、鉄の多くは生物の利用できない水に溶けない酸化型化合物として存在するため、多くの水圏の光合成生物は常に鉄欠乏環境下に曝されている。鉄欠乏条件下では電子伝達系内で活性酸素が生成しやすくなり、活性酸素が原因で光合成装置が損傷をうけ増殖が阻害されると推定されている。それに対抗する手段として、多くのシアノバクテリアは IdiA と IsiA などのタンパク質を誘導し、各々が光化学系 (PSII) または光化学系 (PSI) に結合して何らかの機能を果たしていると推定されている。

IsiA は PSII のコアタンパク質 CP43 と相同性があることから、PSII における機能が想定されていたが、近年、PSI の周囲に 18 量体 IsiA が取り囲んだ IsiA-PSI 超複合体を作ることが明らかにされ、IsiA は PSII ではなくむしろ PSI において集光もしくは過剰なエネルギーを散逸させる役割があると提唱されている。一方、IdiA は鉄を輸送する ABC トランスポーターのホモログであるが、IsiA に比べ知見が少ない。その原因の 1 つは PSII 標品の精製が PSI に比べ困難であることに起因している。

また、鉄欠乏下では鉄を含む電子伝達成分のシトクロムやフェレドキシンなどの FeS タンパク質の機能異常が起こる可能性もあり、IsiA、IdiA に限らず、PSII と PSI に起こる異常を総括的にとらえる実験系が必要であった。近年、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以後 *Synechocystis*) を用いて同じ培養液から PSII と PSI 標品を同時精製する手法を開発しつつあり、この手法が本研究に適用できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では中温性のシアノバクテリア *Synechocystis* と *Anabaena* sp. PCC 7120 (以後 *Anabaena*) を用いて鉄欠乏ストレスが PS<sub>I</sub> と PS<sub>II</sub> を含む光合成系に与える影響を分子レベルに明らかにすることを目的とする。まず、野生株とほぼ同じ特性を有するコントロール株を用いて、鉄欠乏ストレス下に曝したときの光独立栄養増殖や光合成特性 (PS<sub>I</sub> と PS<sub>II</sub>) の変化を明らかにする。光合成特性を解析する際に、同じ細胞培養液から、高活性で高純度の PS<sub>I</sub> 標品と PS<sub>II</sub> 標品を同時に単離精製する必要がある。*Synechocystis* ではすでに確立されつつあるが、本研究では *Synechocystis* に加え *Anabaena* においても同時精製法を確立する。さらに、鉄欠乏への適応に IsiA や IdiA が関与している場合は、これらの遺伝子欠損株を用いて、細胞および精製光化学系標品の光合成特性をコントロール株と各遺伝子欠損株間で比較することにより、鉄欠乏ストレス下での光合成における IdiA と IsiA の役割を分子レベルで明らかにすることができると思われる。

## 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

当研究室では *Anabaena* と *Synechocystis* の細胞各々に、PS<sub>I</sub> 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作製してある。これらの細胞を破碎した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-β-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、粗 PS<sub>I</sub> 標品を単離した。

また、よりインタクトな標品を単離するために、従来のビードビータ (Biospec products 社製) を用いたガラスピース法に加えて FastPrep-24 5G (MP-Biomedicals 社製) という新規ビーズ破碎機も用いて、細胞破碎をおこなった。同じ細胞懸濁液から PS<sub>I</sub> に加え PS<sub>II</sub> 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 (PSI 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、PS<sub>I</sub> 標品を単離した。

### (2) シアノバクテリア細胞の鉄欠乏培地での増殖

*Anabaena* と *Synechocystis* の細胞は、通常 BG-11 液体培地で弱光下、28°C で培養した。BG-11 培地で対数増殖期後期まで培養した細胞を遠心で回収・沈殿化し、Fe<sup>2+</sup> を欠いた BG-11 培地で懸濁・希釈し、10 分間インキュベートした。再度、Fe<sup>2+</sup> 培地で洗浄した細胞を OD<sub>730</sub> が 0.1 になるように濃度を調整し、増殖をスタートさせた。コントロールとして、通常の BG-11 培地で洗浄、懸濁したものをを用いた。経時的に、細胞の形態と濁度 O.D.<sub>730</sub> の変化をモニターした。

### (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、PS<sub>I</sub> 活性を (H<sub>2</sub>O → DMBQ) 測定した。また、メチルピオローゲンを電子受容体として加えて酸素吸収速度を測定し、これを PS<sub>I</sub> 活性とした。

#### (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。ウエスタンブロット解析では、6 M 尿素を含む 15% 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。ゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、1 次抗体 (PSII; D1 タンパク質に特異的な抗体、PSI; PsaA/PsaB に特異的な抗体)、2 次抗体と反応させたのち、NBT と BCIP を加え、発色した。

### 4. 研究成果

#### (1) 鉄欠乏ストレスが光合成特性に与える影響

本研究では、鉄欠乏がシアノバクテリアの光合成系に与える影響を解析するために、光化学系の光捕集に関わるフィコビリソームやクロロフィル (Chl) などの光合成色素の吸収スペクトルを解析する必要がある。細胞の吸収スペクトルを精度よく測定するためには、通常の分光光度計では、細胞懸濁液の濁りに起因する光の散乱の影響で、信頼性の高い吸収スペクトルを得ることができない。そこで、2020 年度積分球を付属した分光光度計を導入し、細胞懸濁液でも再現性よく精度の高い吸収スペクトルを測定できるシステムを構築した。

*Anabaena* の細胞を鉄欠乏条件で培養すると、一過的に増殖が遅延したが、その後回復した。鉄欠乏条件で培養した細胞は Chl 量が低下していた。細胞の形状を観察すると、鉄欠乏下では一部の細胞がヘテロシストに分化している可能性が示唆された。細胞の吸収スペクトルを測定したところ、鉄欠乏条件下においた直後は通常の培地で培養した細胞とほぼ同じであった。数日後には、鉄欠乏下で培養した細胞で、通常の培地で培養した場合と比較して、Chl の Qy 帯ピークの位置がシフトした。このことから、鉄欠乏下に適応すると Chl を結合したタンパク質複合体が生成していることが示唆された。

#### (2) 光化学系 PSII と PSI の同時精製

鉄欠乏ストレス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 PSII と PSI 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* 変異株と *Anabaena* 変異株から PSII と PSI を簡便に同時精製する方法を確立することを試みた。細胞を破碎したのち、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-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、まず粗精製 PSII 標品を単離した。粗精製 PSII 標品とカラムを素通りした PSII に富む画分を用いて、グリセロール密度勾配超遠心により、さらに PSII と PSI を純化した。本法で、単離した PSII と PSI 標品のサブユニット組成を SDS-PAGE で解析したところ、PSII と PSI 標品ともに過去の単離法で得られたサブユニット組成とほぼ同じであった。ただ、グリセロール密度勾配遠心にかかる前の粗精製 PSII 標品、PSI に富む画分については、わずかながら、それぞれ PSI サブユニット、PSII サブユニットの混入がウエスタンブロット解析で観察された。そのため、カラム条件の最適化をおこなった。興味深いことに *Synechocystis* に比べ *Anabaena* では、PSII 標品の量が PSI 標品の量に比べて顕著に少ないことがわかった。

#### (3) 高活性なチラコイド膜と PSII と PSI 標品を単離するための細胞破碎法の検討

*Synechocystis* と *Anabaena* からチラコイド膜、PSII および PSI 標品を単離する過程で、細胞破碎処理するだけで光合成活性が低下する問題があった。高活性の PSII 標品を単離するためには、細胞をできるだけ穏和にかつ効率的に破碎する必要がある。従来は細胞をビードビータ (Biospec products 社製) というビーズ式細胞破碎装置で破碎してきたが、ビードビータ破碎では破碎に 30 分間以上かかりその間に PSII が失活しやすい。本研究では、新規ビーズ式破碎装置の FastPrep-24 5G (MP-Biomedicals 社製) を用いたビーズ破碎法 (以降 FastPrep 法) を導入し、ビードビータと比較検討した。本装置は破碎用ビーズとサンプルを含むチューブを 8 の字に高速運動させることで、ビーズとサンプルとを物理的に衝突させて破碎する。破碎条件の検討により、わずか 10 秒で細胞の破碎完了できるようになった。10 秒間の破碎時に発生する熱は、ドライアイスを用いた冷却用アタッチメントの使用により、抑えることができた。

それぞれの破碎法で得られた細胞ホモジェネート (チラコイド膜) について、細胞破碎率と酸素発生活性 (PSII 活性) および酸素吸収活性 (PSI 活性) を比較したところ、FastPrep 法で破碎した時に、より高い細胞破碎率とより高い PSII 活性と PSI 活性が得られた。次に (2) に述べた同時単離・精製法で PSII 標品と PSI 標品の単離を試みたところ、いずれの破碎法でもほぼ同様なタンパク質組成をもつ PSII 標品と PSI 標品を得ることができた。FastPrep 法で単離した PSII 標品と PSI 標品はより高い活性を示したことから、FastPrep 法はタンパク質の損傷を抑え、より高活性な PSII 標品と PSI 標品を単離できる効果的な破碎法であることが示唆された。

#### (4) まとめと今後の展望

本研究では、*Anabaena* の細胞を鉄欠乏条件で培養したときに、細胞の増殖の遅延 (とその後

の回復)、Chl 量の減少、Chl の Qy 帯ピークのシフトなどの現象がおこることを観察した。これらは先行研究で鉄欠乏下において起こると報告している現象と似ており、鉄欠乏条件を適切に設定できたと考えている。

本研究の成功には、同じ細胞培養液から PSII 標品と PSI 標品を同時精製することが必要で、*Synechocystis* に加えて *Anabaena* でも、その精製系が確立できた。また、よりインタクトな標品を単離するために新規細胞破碎装置の FastPrep-24G を導入したところ、収率・活性ともにより優れた PSII 標品と PSI 標品を同時精製することが可能になった。

新型コロナ禍が本研究時期と重なり、2020-2021 年度は研究室の入室制限があり、研究の進捗が遅れ、鉄欠乏条件下で培養した細胞からの PSII と PSI 標品の単離をおこなうことができなかった。細胞の吸収スペクトルからは鉄欠乏下で Chl の Qy 帯ピークのシフトを観察できているため、PSII と PSI の内部で Chl を含む再編成がおこっていることが推測される。今後は、本研究で確立した鉄欠乏条件下で培養した細胞から単離した PSII と PSI 標品の特性を解析することにより、鉄欠乏下でおこる PSII と PSI の再編成を明らかにできることが期待される。その再編成の仕組みを明らかにするとともに、鉄欠乏ストレス耐性をもつ光合成生物の開発に貢献したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 棚瀬元貴, 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 の部位特異的置換が PSII の構造, 機能およびアセンブリーに与える影響
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 篠田稔行, 棚瀬元貴, 菅原佑斗, 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 D2-T231 の部位特異的置換が光化学系 II 複合体のアクセプターとドナーの両サイドに与える影響
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会(つくば)
4. 発表年 2022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 D2-T231 の部位特異的置換が光合成の光強度依存性に与える影響
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会(松江)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠田稔行, 菅原佑斗, 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D2-T231 の部位特異的置換が光化学系II複合体の電子伝達反応に与える影響
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会(松江)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

法政大学学術データベース  
<https://kenkyu-web.hosei.ac.jp/Profiles/28/0002762/profile.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------