

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05860

研究課題名（和文）新規生合成酵素から迫る活性イオウ種の植物における生理機能解明

研究課題名（英文）Characterization of cysteine persulfide synthases to reveal the physiological function in photosynthetic organism

研究代表者

解良 康太（Kera, Kota）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：30644546

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）：本研究では、光合成生物における活性イオウ分子種（RSS）の生理機能を解明に向けて、光合成細菌（ラン藻）や高等植物（シロイヌナズナ）において、代表的なRSSであるシステインパースルフィド（CysSSH）の生合成酵素の生理機能解析を行った。その結果、ラン藻およびシロイヌナズナ由来のCysSSH合成酵素を同定することに成功した。また、作製した変異体の生育試験や光合成機能解析を通して、CysSSHが光合成電子伝達経路で機能を果たしている可能性を提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CysSSHの生合成研究は、哺乳類細胞において先行しており、近年、「イオウ呼吸」と命名された電子伝達経路における機能が報告されている。葉緑体の祖先にあたる光合成生物では、緑色硫黄細菌などがH₂Oの代わりに硫化物イオンを用いた光合成をすることが知られている。一方、進化した酸素発生型光合成を行う植物では、生合成酵素の観点からCysSSHの光合成における機能解析は行われていない。本研究では、酸素発生型光合成生物における「イオウ呼吸」の存在と生理的意義の解明の最初の一歩として位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, cysteine persulfide (CysSSH) synthases in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (SynCARS) and the model plant *Arabidopsis thaliana* (AtCARS) were characterized to reveal the physiological significance of in photosynthesis. SynCARS and AtCARS were identified as new CysSSH synthase in photosynthetic organism. Since Syncars mutant strains showed a delay in growth under a particular light condition, CysSSH might play an important role in photosynthesis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：活性イオウ分子種 ラン藻 シロイヌナズナ 光合成

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H_2S) や活性イオウ分子種 (RSS) と呼ばれる硫化物イオンは、生体内に存在することが報告されていたが、その生理的意義については長年不明であった。RSS は、パールスルフィド (RSSH) やポリルスルフィド (H_2S_n) といった構造を分子内に有する化合物の総称であり、高い還元性を持つことが知られている。1996 年に H_2S が内因性のガスシグナル伝達物質として報告された (Abe, K and Kimura, H., *J. Neurosci.*, 1996)。その後、システインやグルタチオンのチオール基に可逆的に共有結合した RSS が、その高い還元性から、細胞内における環化還元恒常性、タンパク質のイオウ修飾やレドックス制御に寄与していることが報告され、 H_2S と同様に生体内における重要性が示唆された (Ida *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014)。哺乳類において、RSS は神経伝達調節、心筋保護、平滑筋弛緩、血管新生、抗炎症などで機能していることが報告されており、特に、ヒトにおいて代表的な RSS であるシステインパールスルフィド (CysSSH) が硫化物イオンの主要な供給源であり、ミトコンドリア電子伝達経路における重要な機能 (イオウ呼吸) を担っていることが報告された (Akaike *et al.*, *Nat Commun*, 2017)。この CysSSH の新たな機能性は、従来知られていた抗酸化作用やタンパク質をポリルスルフィド化によるレドックスシグナル制御だけでなく、エネルギー産生に関与している点で非常に興味深い報告である。

一方で、光合成生物における生理的意義に関しては、哺乳類ほど解明されておらず、未解明な点が多い。光合成生物の内、原核生物である光合成細菌は主に二種類に大別することができる。一つ目が、二酸化炭素と電子供与体として水を利用した光合成によって酸素を作り出すラン藻であり、二つ目が、電子供与体として硫化水素などの硫黄を利用し、酸素非発生型の光合成を行う緑色硫黄細菌や紅色硫黄細菌である。ラン藻において硫化水素は、光がない環境と無酸素環境下に長時間に曝された場合に光合成能の回復を促進することが報告されている (Klatt, J. M. *et al.*,)。また、光合成における鉄・イオウクラスターの形成にも RSS が関与していることが報告されている (Zang, S. S. *et al.*, *Planta*, 2017; Bai, Y., *et al.*, *Metallomics*, 2018; Clausen, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000)。一方、紅色硫黄細菌において、2つのシステイン残基を持つ転写因子の DNA 結合能の制御において、RSS を介した還元状態の制御が関与することが報告されている (Shimizu, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017)。また、モデル高等植物のシロイヌナズナにおいて、システインから硫化水素を生成する *des1* 欠損変異株において、アブシジン酸を介した気孔閉鎖が阻害されることが報告されている (Scuffi, D. *et al.*, *Plant Physiol.*, 2014)。加えて、植物において、少なくとも 5% のタンパク質が過酸化していることが報告されており、植物の成長に不可欠な代謝経路の制御機構に RSS が関与することが予想されていた (Aroca, A. *et al.*, *J. Exp. Bot.*, 2017; Filipovic, M. R. and Jovanovic, V. M., *J. Exp. Bot.*, 2017)。このような知見から、光合成生物において RSS が重要な役割を果たす可能性が高いと考えた。特に、光合成生物が有する光合成電子伝達鎖は、ミトコンドリアにおける電子伝達鎖と類似点も多い (図 1)。エネルギー生産の場であるミトコンドリア内膜では、呼吸鎖複合体における電子伝達系によって、ATP を作り出している。電子の流れとしては、複合体 I で NADH が、複合体 II で $FADH_2$ がそれぞれ酸化されて、電子がユビキノンプールに入る。その後、複合体 III でユビキノールが酸化され、シトクロム c が還元される。そして、複合体 IV でシトクロム c が酸化されて、酸素分子が還元されて水になる。この過程でミトコンドリア内膜を隔てて H^+ 濃度勾配が形成され、ATP 生産に利用される。一方で光合成では、葉緑体のチラコイド膜において、光化学系 II (PSII) が水を参加し、酸素分子を発生

させるとともに、電子をユビキノールに入れる。その後、シトクロム b/f 複合体によってプラストシアニンを経て、光化学系 I (PSI) に電子が伝達され、 $NADP^+$ が還元されて NADPH が生産される。この過程でチラコイド膜を隔てて H^+ 濃度勾配が形成され、ATP 生産に利用される。硫

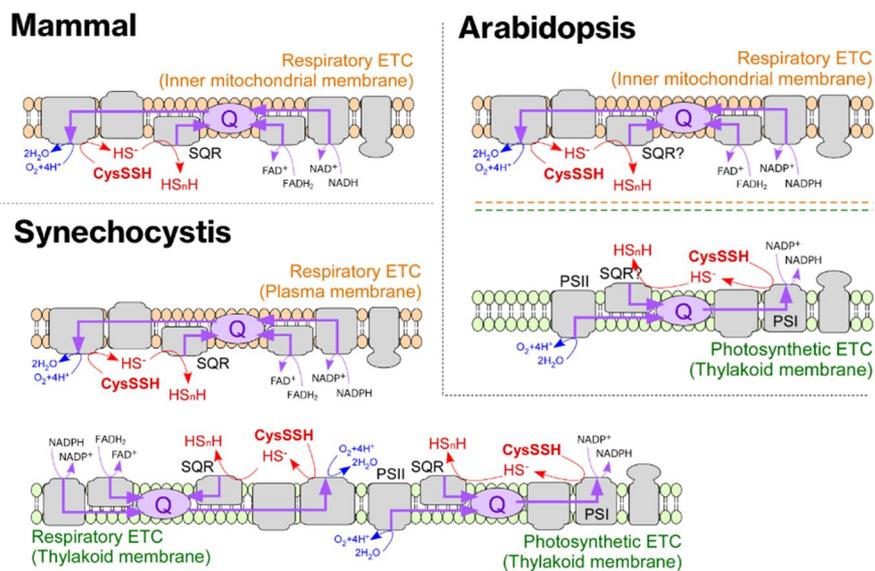


図1 電子伝達鎖における活性イオウ分子種 (RSS) の機能推定モデル

黄光合成細菌では、酸素分子がないため、 H_2S を電子受容体として利用するわけだが、進化した高等植物においても「CysSSH は光合成をはじめとする植物特有の生理応答において機能しているのか」、「その分子機構や制御機構はどうなっているのか」という「問い」に至った。

これら「問い」を解決する上で、 H_2S や RSS の生合成機構を解明することは極めて重要である。哺乳類では、CysSSH は次の三つの経路で生合成されることが報告されている。一つ目が 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) であり、数分子の 3-メルカプトピルビン酸から CysSSH を生合成する (Kimura, Y. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017)。二つ目が cystathionine γ -lyase (CSE) であり、システインやシスチンから CysSSH を生合成する (Stipanuk, M. H. and Beck, P. W., *Biochem. J.*, 1982)。三つ目が cystathionine β -synthase (CBS) であり、システインやシスチンから CysSSH を生合成する (Stipanuk, M. H. and Beck, P. W., *Biochem. J.*, 1982)。一方、シロイヌナズナにおいては、これまでに、二つの経路から H_2S が生合成されることが報告されている。一つ目が、Cysteine Desulfurase (CD) であり、システインからアラニンへの反応に伴って H_2S を生合成する (Huo, J. *et al. Front. Plant Sci.*, 2018)。二つ目が O-acetylserine (thiol)-lyase (OASTL) であり、システインから H_2S を生合成する (Huo, J. *et al. Front. Plant Sci.*, 2018)。しかし、これらは H_2S 生合成酵素であり、シロイヌナズナにおいて、これまでに CysSSH 生合成酵素 (AtCARS) は同定されていなかった。また、同様に、光合成生物であるラン藻においても CysSSH 生合成酵素 (SynCARS) は同定されていなかった。

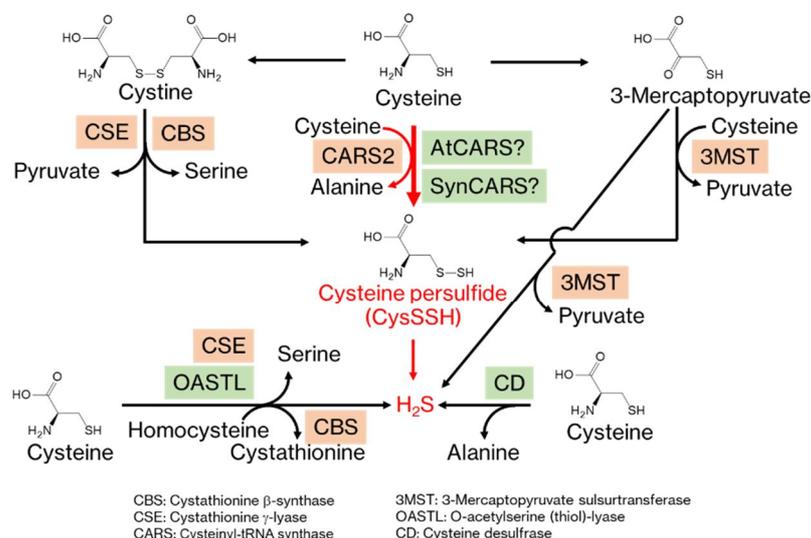


図2 活性イオウ分子種 (RSS) の推定生合成経路

2. 研究の目的

本研究では、モデル光合成生物として、ラン藻とシロイヌナズナにおける CARS に着目した。前述したとおり、葉緑体の祖先にあたる光合成生物では、緑色硫黄細菌などが H_2O の代わりに硫化物イオンを用いた光合成をすることが知られている。一方、進化した酸素発生型光合成を行う植物では、 Na_2S 処理により、植物の光合成が影響を受ける報告 (Chen *et al.*, *J Exp Bot.*, 2015) があるが、生合成酵素の観点から硫化物イオンの光合成における機能解析は行われていない。近年、人のミトコンドリアで、進化の過程で失われたと考えられていたイオウ呼吸が重要な生理機能を有することが報告された (Akaike *et al.*, *Nat Commun*, 2017)。本研究では、この報告を受けて、光合成生物において、硫化物イオンの主要な供給源の可能性の高い CysSSH、CARS の機能解析を行うことで、RSS の生理的意義を解明することを目指した。

3. 研究の方法

< CARS のクローニング >

大腸菌の CARS (EcCARS) のアミノ酸配列をもとに、ラン藻とシロイヌナズナのゲノムデータベースから BLASTP を用いて検索を行った。また、取得した候補のアミノ酸配列について、ClustalW を用いて EcCARS と比較した。また、AtCARS については Uniport を用いて細胞内局在を予測した。SynCARS は、*Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノムをテンプレートとし、PCR によって配列を取得し、pColdI にクローニングした (pColdI-SynCARS)。AtCARS は Col.0 から調製した mRNA より逆転写したものをテンプレートとし、同様に PCR によって配列を取得し、pColdI にクローニングした (pColdI-AtCARS)。

< CARS の異種発現と精製 >

pColdI-SynCARS および pColdI-AtCARS を用いて大腸菌 AG1 株を形質転換した。OD₆₀₀ = 0.5 付近にてコールドショックと IPTG 添加により発現誘導を行った。集菌した菌体は、プロテアーゼインヒビター存在下で、フレンチプレス (AVESTIN EmulsiFlex-B15) にて破碎し、Ni-NTA レジンによって精製した。取得した精製酵素標品は、使用するまで -80°C で保存した。

< CARS の酵素活性測定 >

EcCARS の Assay 方法 (Ida et al., 2017) に従って実施した。

< ラン藻の生育試験 >

ラン藻は人口気象器 (LPH-410S , 日本医科器械製作所) で、28°C , 湿度 60 % , 光強度 30 -50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件で振盪培養した。前培養として BG11 培地 3 mL に植菌し、 $\text{OD}_{730} = 3.0 - 4.0$ になるように 3 日間培養したものを使用した。生育試験では、BG11 培地に植菌し、通常光、弱光、強光条件で 5 日間培養後、 OD_{730} を測定した。また、硫酸イオンを制限する際は、前培養したものを硫酸イオンを抜いた BG11 培地に植菌し、同様に 5 日間培養後、 OD_{730} を測定した。

< WaterPAM による光合成活性測定 >

上記と同様に前培養後、本培養を行い、 $\text{OD}_{730} = 0.6 - 0.8$ に達したものを使用した。本培養液を BG11 培地で $\text{OD}_{730} = 0.2$ になるようにして下記条件で測定した。Measuring Light 下で 5 分間暗順応させた後、Saturating Pulse (0.8 sec , Intensity 12) を照射し、最大クロロフィル蛍光を測定した。続いて、Actinic Light を $58 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ に設定後、定常状態になるまで照射した。その後再び Saturating Pulse (0.8 sec , Intensity 12) を照射し、Actinic Light が $58 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ における最大クロロフィル蛍光を測定した。Actinic Light を $129 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ に設定後、定常状態になるまで照射した。その後再び Saturating Pulse (0.8 sec , Intensity 12) を照射し、Actinic Light が $129 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ における最大クロロフィル蛍光を測定した。この操作を Actinic Light が $287, 647 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ において繰り返し、 $647 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ における最大クロロフィル蛍光を測定した。最後に、DCMU を終濃度 $20 \mu\text{M}$ になるように添加し、 $647 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ の Actinic Light を照射し、定常状態になったところで Saturating Pulse (0.8 sec , Intensity 12) を照射し、クロロフィル蛍光を測定した。なお、PAM の各種パラメーターを以下に示す。

F_0 = 測定光による蛍光の最小値

F_m = 測定光による蛍光の最大値

$F_0' = F_0 / (F_v / F_m + F_0 / F_m)$ = 励起光環境下の測定光による蛍光の最小値

F_m' = 励起光環境下の測定光による蛍光の最大値

F_s = 励起光環境下で定常状態となった際の蛍光値

< 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在解析 >

細胞内局在解析のために、AtCARS を sGFP 融合タンパク質を発現させるベクターにサブクローニングした。エレクトロポレーションにより、アグロバクテリウム GV3101 に導入し、アグロインフィルトレーション法によってベンサミアナタバコ葉を形質転換した。共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP8 (Leica) を用いて GFP の蛍光を観察した。

< Junior PAM を用いたシロイヌナズナにおける光合成活性測定 >

シロイヌナズナは人口気象器で、23°C , 明所 16 時間、暗所 8 時間の長日条件で生育させた。Col.0 及び *atcars* 変異体を暗順応させた後 Junior PAM を用いて光合成活性の測定を行った。Actinic Light を $45 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ で 10 分間、 $820 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ で 10 分間、 $0 \mu\text{mol photon/m}^2\text{s}$ で 10 分間に設定し、1 分間隔で Saturating Pulse を照射した。

4 . 研究成果

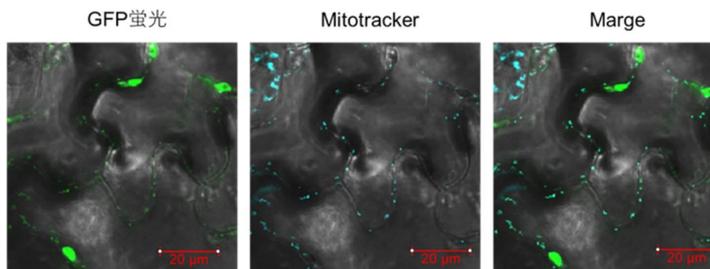
< クローニング >

EcCARS とのアミノ酸配列相同性を指標に SynCARS と AtCARS をクローニングした。これら候補遺伝子について、Jbrowse を用いて RNA の発現量を解析した。その結果、AtCARS が偽遺伝子ではないことが示唆された。また、アミノ酸配列のアライメント後に、EcCARS に保存されたモチーフ構造を検索した。補酵素である PLP の結合モチーフを探したところ、SynCARS と AtCARS には PLP 結合モチーフが保存されていた。このことから、これら CARS の候補が CysSSH 生合成活性を有することが示唆された。更に、AtCARS については、EcCARS や SynCARS と比較して、N 末端に付加的な配列が存在していた。これを推定移行シグナル配列と予想したため、Uniport を用いた細胞内局在予想を行った。その結果、AtCARS はミトコンドリアと葉緑体に局在することが示唆された。また、N 末端の付加的な配列を除いて、同様に Uniport を用いた細胞内局在予想を行ったところ、細胞質に局在するという結果が予想された。このことから、AtCARS は移行シグナルによって機能を担っている細胞内小器官に輸送されていることが示唆された。

< 細胞内局在解析 >

sGFP 融合タンパク質を一過的にベンサミアナタバコ葉に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて局在解析を行った。その結果、GFP 蛍光がミトコンドリアとクロロプラストに特徴的なパターン

で検出された。そこで、ミトコンドリアのマーカーとして Mitotracker、葉緑体マーカーとしてクロロプラストの自家蛍光を検出したところ、GFP 蛍光と重なった。このことから、AtCARS がミトコンドリア及び葉緑体で機能を担っていることが示唆された。



< 酵素機能解析 >

次に、酵素機能について、大腸菌の異種発現系を用いた解析を行った。SynCARS 及び AtCARS の精製酵素標品の活性を調製し、PLP 添加/無添加条件で Assay を行ったところ、PLP の添加によって活性の上昇が確認された。また、SynCARS について PLP 結合モチーフに変異導入を行ったところ、活性が大幅に低下した。こ

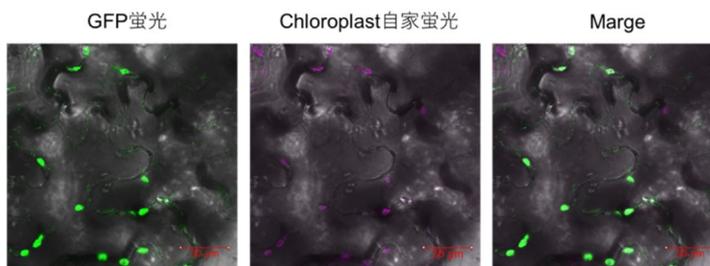


図3 AtCARSの細胞内局在解析

これらの結果から、SynCARS と AtCARS は CysSSH 生合成活性を有することが示唆された。なお、AtCARS については上記の細胞内局在性と合わせて考えると、CysSSH がミトコンドリアとクロロプラストで生理機能を有する可能性が高いと考えられた。

< 生育試験 >

SynCARS の生理機能を明らかにするために、欠損株および過剰発現株の作製を行った。CARS は Cysteine-tRNA synthetase 機能を有していることから、単純に欠損した場合致死に至る可能性が高かった。そこで、PLP 結合モチーフに変異導入を行い、CysSSH 合成活性を低下させた SynCARS をニュートラル領域に発現させた上で、ネイティブの SynCARS の欠損を行った。初めに、ラン藻の生育に対する硫黄の重要性を解析するために、硫酸イオンを排除した BG11 培地で生育試験を行った結果、生育速度が大幅に低下した。そこで硫酸イオン濃度を上昇させたところ、生育が回復した。

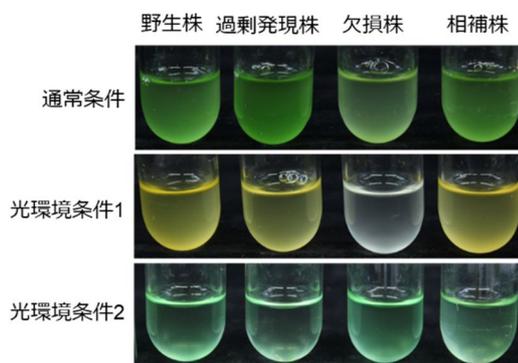


図3 様々な光環境下における生育試験

次に、野生株、欠損株、過剰発現株について通常環境で生育試験を行ったところ、生育に差は観察されなかった。そこで、様々な光環境下で生育試験をしたところ、特定の光環境下において欠損株の生育遅延が観察された。また、相補株を作製したところ生育遅延が回復したことから、SynCARS 及び CysSSH は特定の光環境に適応するために重要な働きを果たしていることが示唆された。また、硫酸イオン欠乏下で様々な光環境下で生育試験をしたところ、欠損株の生育遅延が観察された(図3)。

< 光合成活性評価 >

光環境下で生育に影響がでたことから、光合成に影響が出ている可能性が考えられた。そこで、WaterPAM を用いて光合成電子伝達系の評価を行った(図4)。その結果、SynCARS 及び CysSSH は光合成に関与することを示す結果が得られた。光合成において、活性酸素種が発生することから、変異株における活性酸素種の影響を観察したところ、変異株は活性酸素種に脆弱になることが示唆された。

ラン藻で CysSSH が光合成に関与することが示唆されたため、野生株と AtCARS 変異株について、Junior PAM を用いて光合成への影響を解析した。その結果、少なくとも量子収率には影響が出ないことが示唆された。

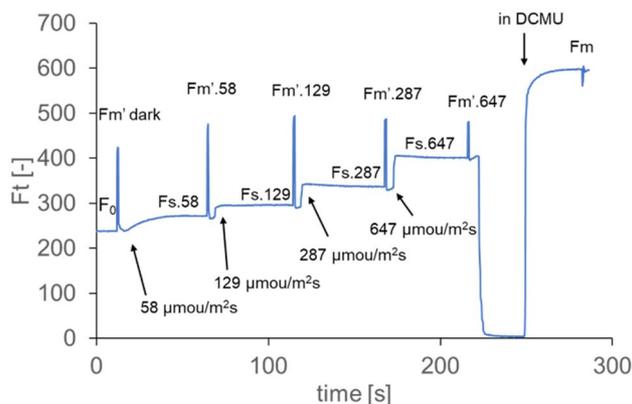


図4 WaterPAMの測定チャート

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 解良康太, 平賀靖英, 荒武, 浅田遥香, 菊地駿介, 齊藤翔真, 佐藤菜央, 秋元奈弓, 杉山健二郎, 飯嶋益巳, 中山勉, 鈴木秀幸
2. 発表標題 青パイアの未利用部位の 有効利用に向けた機能性解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 解良康太, 平賀靖英, 荒武, 佐藤菜央, 秋元奈弓, 杉山健二郎, 鈴木秀幸
2. 発表標題 機能性成分原材料としての利用に 向けた青パイア未利用部位の解析
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会 大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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