

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06220

研究課題名（和文）絶対嫌気環境におけるカロテノイドの光保護機能の解明

研究課題名（英文）Exploring photoprotective function of carotenoid under strictly anaerobic conditions

研究代表者

浅井 智広 (Azai, Chihiro)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：70706564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：厳密に嫌気的な環境でしか生育しない緑色硫黄細菌*Chlorobaculum tepidum*の細胞内で、活性酸素種の生成が関与しない、新規な光合成の光阻害現象を発見した。野生株よりもカロテノイド配糖体を欠損した *cruC*変異株において、この嫌気的光阻害の影響が顕著であり、光合成反応中心複合体内でカロテノイド配糖体が駆動する非光化学的消光が光阻害の発生を抑制していることがわかった。超高速の過渡吸収分光法により、カロテノイド配糖体の有無で変化する励起エネルギー移動過程が存在することも突きとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で発見に至った「嫌気的な光阻害」は、光合成に関する既存の知識では想定すらされていなかった、全く新しい光合成現象である。活性酸素種の生成が関与しないため、無酸素状態であっても、強光下では光合成によって細胞毒性を示す物質が生成されることがわかった。緑色硫黄細菌ではカロテノイド配糖体がこの嫌気的な光阻害の発生を抑制していたことから、本研究の成果を契機に、補助色素でありながら光合成生物に普遍的に存在するカロテノイドの存在意義の解明が進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：We have discovered a novel photosynthetic phenomenon, “anaerobic photoinhibition”, which is the photoinhibition but does not involve the production of reactive oxygen species. This phenomenon occurs in the strictly anaerobic culture of the photosynthetic green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. The harmful effect of the anaerobic photoinhibition was more pronounced in the *cruC* mutant strain lacking carotenoid glycosides than in the wild-type strain, indicating that the carotenoid glycoside mediates non-photochemical quenching driven in the photosynthetic reaction center complex and suppresses the occurrence of photoinhibition. Ultrafast transient absorption spectroscopy also revealed the existence of an excitation energy transfer process that depends on the presence of the carotenoid glycoside.

研究分野：光合成

キーワード：緑色硫黄細菌 カロテノイド 配糖体 *cruC* 嫌気 光阻害 非光化学的消光 三重項励起状態

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カロテノイドはクロロフィルと共に光合成生物に普遍的に見出される色素分子である。光合成の補助色素であり、クロロフィルに励起エネルギーを集める光捕集機能、あるいは過剰なクロロフィルの励起エネルギーの散逸や一重項酸素を消去する光保護機能を担う。カロテノイドは光合成の光化学反応に必須ではないが、カロテノイドを持たない光合成生物は天然に見つかっていない。カロテノイドはポリエン構造をもつ分子であり、その光学特性は共役二重結合の長さに依存し、光捕集機能も光保護機能もポリエン構造に支配されている。一部のカロテノイドはポリエンの末端に糖を結合(グリコシル化)している。グリコシル化はポリエンの光学特性に影響しないが、特異的な糖転移酵素 CruC が触媒しており (Maresca et al. *J. Bacteriol.* 2006), 光合成系において、カロテノイド配糖体は特異的な生理機能をもつことが示唆される。

緑色硫黄細菌は絶対嫌気性の光合成細菌で、還元型硫黄化合物を電子源とした酸素非発生型の光合成で生育する。主要なカロテノイドは、 γ -carotene または chlorobactene であり、膜外集光装置として働く巨大な膜小胞「クロロソーム」(Chlorosome) の内部にある Baseplate で、光捕集色素として機能している。細胞内の全カロテノイドのうち、約 3% 程度がグリコシド化された配糖体であるが (Takaichi et al. *PCP* 1999), この γ -carotene (または chlorobactene) の配糖体「 γ -carotene glucoside ester」は、緑色硫黄細菌の細胞内で、光合成反応中心 (RC) 複合体に特異的に結合しており、クロロソームを含む他の集光装置には存在しない。

遺伝子操作が可能な緑色硫黄細菌 *Chlorobaculum tepidum* では、カロテノイドに特異的な糖転移酵素の遺伝子 *cruC* の破壊株 (Δ *cruC* 変異株) が作製されており、その表現型の解析から、カロテノイド配糖体は光保護機能を担うことが示唆されている (Azai et al. *JPPA* 2020)。時間分解蛍光スペクトルの解析によって、クロロソームから RC 複合体までの励起エネルギー移動反応が調べられており、 Δ *cruC* 変異株では、RC 複合体に結合したバクテリオクロロフィル (BChl *a*) の蛍光寿命のみが野生株の約 2 倍程度に遅延している。これは、*C. tepidum* の光合成では絶対嫌気的な環境でも光阻害が発生する可能性があり、細胞内の約半分の RC 複合体においてカロテノイド配糖体が恒常的に BChl *a* の励起エネルギーを散逸させていることを意味する。しかし、嫌気的な環境での光阻害の発生や、それを抑制するエネルギー散逸過程について、具体的な反応機構は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、絶対嫌気環境での緑色硫黄細菌の光合成において、カロテノイド配糖体の光保護機能が果たす生理的な役割を明らかにすることを目的とした。光阻害が発生しやすい変異株である *C. tepidum* の Δ *cruC* 変異株を利用し、*C. tepidum* に光阻害を引き起こす環境要因の特定を目指した。また、光合成装置の構成や構造の変化を探り、カロテノイド配糖体が RC 複体内で起こる BChl *a* 間の励起エネルギー移動を変調するメカニズムの解明を目指した。野生株と Δ *cruC* 変異株の表現型を励起エネルギー移動反応の観点から比較し、カロテノイドのグリコシル化が影響を与えるプロセス、部位、分子構造の具体的な特定を目指した。

3. 研究の方法

(1) *C. tepidum* の光合成曲線の作成

緑色硫黄細菌 *C. tepidum* は光独立栄養細菌であり、その増殖は光合成に依存している。これを利用し、*C. tepidum* の野生株と Δ *cruC* 変異株の増殖速度を様々な光環境で測定することで、その光-光合成曲線を作成した。光合成の電子源として硫化物とチオ硫酸を培地に添加し、硫化物の自酸化性によって高度に嫌気的な環境で培養した。照射光源には可視光領域にブロードな放射スペクトルをもつ高輝度の白色 LED を使用した。強光の照射や LED 光源の発熱によって培養温度が上昇しないよう、熱線吸収用の水を通して培養に光照射した。培養温度は *C. tepidum* の生育至適温度に近い 45 とし、恒温器内に冷却用のファンを持ち込むことで、培養を通じて一切温度が上昇しないようにコントロールした。10 分ごとに波長 900 nm で濁度を測定することで培養の増殖を経時的にモニターした。

(2) *C. tepidum* の RC 複合体で起こるエネルギー移動反応の実時間追跡

緑色硫黄細菌 *C. tepidum* では、His タグ付きの RC コアタンパク質をコードする遺伝子をプラスミドによって細胞内で強制発現させることで、機能を保持した RC 複合体を高純度かつ高収率でアフィニティ精製できる (Azai et al. *PLoS One* 2013)。これを利用し、*C. tepidum* の野生株と Δ *cruC* 変異株から RC 複合体を精製し、その内部で起こるエネルギー移動反応を、フェムト秒分解能の過渡吸収分光法で観測した。励起パルスには約 100 fs の超短パルスレーザーを使用した。ピーク波長が 505 nm の励起パルスで RC に結合したカロテノイドを、820 nm での励起パルスで RC 内部のコアアンテナとして機能する BChl *a* を選択励起し、それぞれの励起後に起こる吸収スペクトルの変化を Pump-Probe 法によって実時間で追跡した。

4. 研究成果

(1) *C. tepidum* の嫌気培養で発生する光阻害

緑色硫黄細菌 *C. tepidum* の光合成による増殖を指標とした光-光合成曲線は、植物やシアノバクテリアの酸素発生型光合成で見られるような、光飽和点の存在を示した(図1)。これは、ある光量子束密度以上の光強度では、電子伝達系のアウトプットとして得られる還元力の生成速度が炭素固定反応の速度を上回り、*C. tepidum* の光合成が暗反応で律速されてしまうことを意味している。さらに、光飽和点をはるかに上回る強光環境では、光合成による増殖速度が光強度依存的に減少することがわかった。これは、強光照射によって生じる過剰な光エネルギーあるいは過剰な還元力が何らかの増殖抑制を引き起こすことを示している。 $\Delta cruC$ 変異株では、照射光量が高くなるに連れて野生株よりも増殖速度が低下し、光飽和点をはるかに上回る強光環境では、野生株よりも顕著に増殖速度が減少し、野生株よりも高い強光感受性を示すことがわかった。*C. tepidum* の増殖が光合成に依存していることを考慮すると、この強光環境での増殖抑制は、光合成の光阻害が発生していることを示唆している。一般に光合成の光阻害は、三重項励起状態のクロロフィルによる活性酸素種の光増感生成が主な原因と考えられており、その発生には好気的な環境が必要条件となる。しかし、*C. tepidum* の光合成培養では、電子源として添加する硫化物の自酸化性により、培養を通じて高度に嫌気的な環境が維持されているため、活性酸素種の生成は全く想定されない。従って、本研究で発見した、*C. tepidum* の嫌気培養で発生する光阻害は、光合成に対する既存の知識では理解が困難な全く新しい生理現象である。好気環境での活性酸素種のように、嫌気環境での強光照射によってどのようなメカニズムで光阻害が発生するのか、またどのような物質が細胞毒性をもつ物質として生成しているのかは、今後の研究で特定していく必要がある。

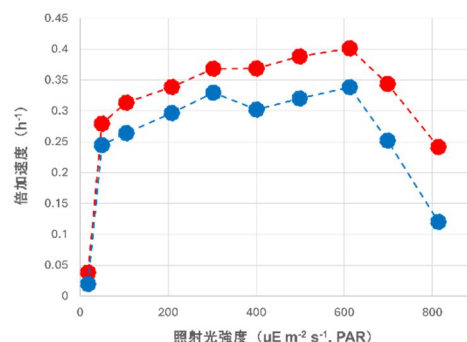


図1. *C. tepidum* の増殖速度の照射光強度依存性
赤色のプロットは野生株、青色のプロットは $\Delta cruC$ 変異株で測定した結果を示している。

(2) RC 複合体での三重項カロテノイドの生成

C. tepidum の野生株から精製した RC 複合体で起こるエネルギー移動反応を、フェムト秒分解の過渡吸収分光法で実時間追跡した。505 nm の励起パルスで RC に結合したカロテノイドを励起すると、 S_2 励起状態および S_1 励起状態からコアアンテナとして機能する BChl *a* への高効率なエネルギー移動が観測され、RC 内部のカロテノイドがアンテナとして機能し得ることがわかった。しかし実際の細胞では、膜外集光オルガネラであるクロロソームの集光能力が極めて高く、505 nm での励起のように RC 内部の色素が直接励起されることは全くないと言える。実際、野生株と $\Delta cruC$ 変異株から精製した RC 複合体の測定結果を比較すると、 $\Delta cruC$ 変異株の RC 複合体においても同様のエネルギー移動反応が観測され、カロテノイド配糖体の有無は RC 内部のカロテノイドのアンテナ機能にほとんど影響を及ぼさないことがわかった。そこで、クロロソーム内のクロロフィル色素から RC 内部の BChl *a* に励起エネルギーが流れてきた状況を想定し、820 nm の励起パルスでコアアンテナとして機能する BChl *a* を励起し、その後起こるエネルギー移動反応を調べた。その結果、三重項励起状態のカロテノイド(三重項カロテノイド)の生成がナノ秒オーダーの時定数で観測された(図2)。これは、*C. tepidum* の光合成系において報告例がない全く新規なエネルギー移動反応であり、BChl *a* からカロテノイドへのエネルギー移動反応が起こることを示している。興味深いことに、この三重項カロテノイドの生成は、反応溶液中の界面活性剤の種類を変えると、その生成収率が大きく変化することがわかった。これは、三重項励起状態となるカロテノイド分子が、界面活性剤と相互作用し得るような、RC 複合体の辺縁に結合していることを示唆している。実際、2020 年以降に発表された *C. tepidum* の RC 複合体の原子分解能立体構造では、カロテノイド配糖体は RC コアタンパク質の膜貫通領域の辺縁に露出するように結合しており、三重項カロテノイドの生成が BChl *a* の消光過程のひとつであると考えられる。 $\Delta cruC$ 変異株から精製した RC 複合体では、この三重項カロテノイドの生成反応自体は起こるものの、生成収率やエネルギー移動経路に違いが見られた。この違いが、 $\Delta cruC$ 変異株での消光能力の低下、高い強光感受性を引き起こしているものと期待されるが、詳しいメカニズムの解明には更なる詳細な研究が必要である。

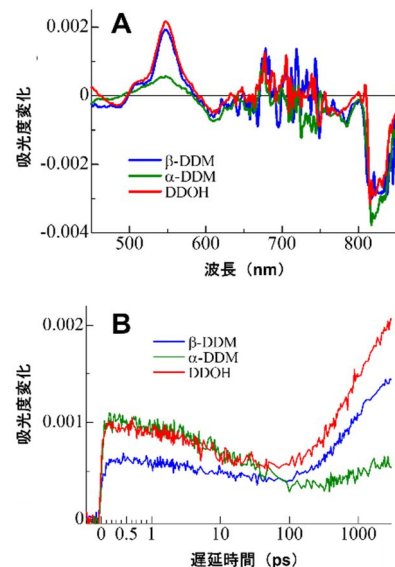


図2. *C. tepidum* の RC 複合体で観測された
三重項カロテノイドの生成

A は励起パルス照射後 3 ns 後の過渡吸収スペクトル、B は 550 nm での過渡吸収変化のキネティクス。各色線は溶液中の界面活性剤を変えた場合の測定結果を示している。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kishimoto Hiraku, Azai Chihiro, Yamamoto Tomoya, Mutoh Risa, Nakaniwa Tetsuko, Tanaka Hideaki, Miyanoiri Yohei, Kurisu Genji, Oh-oka Hirozo	4. 巻 5
2. 論文標題 Soluble domains of cytochrome c-556 and Rieske iron-sulfur protein from <i>Chlorobaculum tepidum</i> : Crystal structures and interaction analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Research in Structural Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crstbi.2023.100101	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 -

1. 著者名 Oh-oka Hirozo, Harada Jiro, Azai Chihiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Green Bacteria - Energy Transfer and Electron Transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Biological Chemistry III	6. 最初と最後の頁 333 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-819460-7.00031-1	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 Gisriel Christopher J., Azai Chihiro, Cardona Tanai	4. 巻 149
2. 論文標題 Recent advances in the structural diversity of reaction centers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photosynthesis Research	6. 最初と最後の頁 329 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11120-021-00857-9	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 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 浅井 智広
2. 発表標題 緑色硫黄細菌で見つかった嫌氣的な光エネルギー散逸過程
3. 学会等名 藍藻の分子生物学2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 C. Azai
2. 発表標題 Revisiting the function of special pair chlorophylls in type-1 reaction centers
3. 学会等名 The International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 智広
2. 発表標題 昨日の帰納はキノンの機能：タイプ1 光合成反応中心にキノンは要るのか？
3. 学会等名 第二回光合成タンパク質勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣 知実, 寺内 一姫, 浅井 智広
2. 発表標題 緑色硫黄細菌の光合成反応中心における静電相互作用による表在性サブユニットの結合
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 浅井 智広, 大岡 宏造, 伊藤 繁, 鬼頭 宏任, 木村 明洋
2. 発表標題 緑色硫黄細菌の最小 型反応中心の光捕集機構：遺伝子操作的改変と理論的検討
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 浅井 智広, 木田 雅俊, 稲垣 知実, 小澄 大輔
2. 発表標題 緑色硫黄細菌の光合成反応中心複合体での三重項カロテノイドの生成
3. 学会等名 第34回カロテノイド研究談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 C. Azai, R. Kojima, K. Hinago, M. Kida, T. Yamamoto, H. Oh-oka, D. Kosumi, Y. Nagasawa
2. 発表標題 Charge separation induced by a lower-energy bacteriochlorophyll in the reaction center complex of <i>Heliobacterium modesticaldum</i>
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (ISPP2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 繁, 木村 明洋, 鬼頭 宏任, 浅井 智広, 大岡 宏造
2. 発表標題 緑色硫黄細菌 型反応中心の励起状態の理論計算と主要BChl-a除去実験
3. 学会等名 第12回日本光合成学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸本 拓, 浅井 智広, 武藤 梨沙, 田中 秀明, 宮ノ入 洋平, 栗栖 源嗣, 大岡 宏造
2. 発表標題 嫌気性緑色硫黄細菌におけるRieske/cytb複合体とc型シクロムとの構造機能相関の解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 理沙、野原 大暉、浅井 智広、小澄 大輔、大岡 宏造
2. 発表標題 ヘリオバクテリア光合成反応中心におけるカロテノイド励起後のエネルギー移動反応解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣 知実、寺内 一姫、浅井 智広
2. 発表標題 緑色硫黄細菌の光合成反応中心におけるFM0タンパク質の可逆的な結合と解離
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 智広
2. 発表標題 緑色硫黄細菌からみた光合成反応中心の構造多様性
3. 学会等名 原核光合成生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 智広
2. 発表標題 キノン分子から見た光合成反応中心の構造と機能
3. 学会等名 第1回光合成タンパク質勉強会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 明洋、鬼頭 宏任、浜口 祐、米倉 功治、川上 恵典、菓子野 康浩、浅井 智広、大岡 宏造、伊藤 繁
2. 発表標題 細菌と植物のもつ多様な光合成 I 型反応中心の光捕集機能に関する比較
3. 学会等名 量子生命科学会 第3回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Hinago, T. Inagaki, T. Yamamoto, M. Hoashi, K. Sugihara, C. Azai, Y. Nagasawa
2. 発表標題 Effect of Phylloquinone on Green Sulfur Bacterial Reaction Center Studied by Femtosecond Transient Absorption Spectroscopy
3. 学会等名 16th International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島 理沙、山元 颯太、浅井 智広、野原 大暉、小澄 大輔、大岡 宏造
2. 発表標題 ヘリオバクテリア光合成反応中心におけるエネルギー移動および電子移動機構
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 実佳、中庭 哲津子、武藤 梨沙、寺内 一姫、田中 秀明、大岡 宏造、栗栖 源嗣、浅井 智広
2. 発表標題 細菌型タイプ1反応中心のキノン電子受容体のin silico機能解析
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日名子 一起、山本 哲也、稲垣 知実、杉原 敬太、帆足 征峻、浅井 智広、長澤 裕
2. 発表標題 緑色硫黄細菌の反応中心に対するフィロキノンの効果：フェムト秒過渡吸収スペクトル解析
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 知実、吉野 晴貴、寺内 一姫、浅井 智広
2. 発表標題 緑色硫黄細菌反応中心の表在性サブユニット結合に対する塩濃度とpHの影響
3. 学会等名 第11回日本光合成学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------