

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370014

研究課題名(和文) 光受容体シアノバクテリオクロムと光応答現象の多様性と分子機構の統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of cyanobacteriochromes in diversity and molecular regulation of cyanobacterial photoresponses

研究代表者

池内 昌彦 (Ikeuchi, Masahiko)

東京大学・総合文化研究科・教授

研究者番号：20159601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：光は地球に生息する生物に普遍的な環境シグナルであり、光合成作用のエネルギー源である。私たちは光合成をするシアノバクテリアに存在する新しいカテゴリの光受容体シアノバクテリオクロムを発見した。本研究では、複数の異なる性質をもつシアノバクテリオクロムの結晶構造を決定し、発色機構やシグナル伝達機構を解明した。細胞内二次メッセンジャー分子であるサイクリックジグアニル酸の合成を青色光で活性化する機構、分解をシアン光で活性化する機構を発見した。さらにこれらのシアノバクテリオクロム遺伝子の破壊の組み合わせ解析により、好熱性シアノバクテリアの細胞凝集とセルロース生産を光で調節する現象を分子レベルで解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that cyanobacteria possess diverse photoreceptors and cyanobacteriochromes are unique in perception of wide range of light color. We focused on biochemical, structural and physiological aspects of cyanobacteriochromes in order to integrate the light signaling system at molecular level. We determined the crystal structures of two cyanobacteriochromes and revealed the atomic basis for the color tuning and intramolecular signaling. We determined enzymatic regulation of the cyanobacteriochromes to produce or degrade a second messenger molecule, cyclic diguanylic acid, which induces cellulose production and cellular aggregation in thermophilic cyanobacteria. We also elucidated the molecular contribution of the cyanobacteriochromes to the cellular aggregation by combinatorial mutagenesis studies. Thus, a set of cyanobacteriochromes integrates various light signals into the cellulose production and cellular aggregation by direct regulation of cyclic diguanylic acid.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子・生理学

キーワード：受容体 結晶構造 シグナル伝達 c-di-GMP フィトクロム シアノバクテリオクロム

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリオクロムとは、2004年にわれわれが発見し命名した、まったく新しい光受容体ファミリーであり、フィトクロムと遠い類縁関係にある独自の色素結合ドメインをもち、近紫外から赤色域までの多様な光吸収型があり、その多くはきれいな可逆的な光変換を示す。共有結合する色素はフィコシアノピリン(PCB)もしくはフィコピオロピリン(PVB)であり、Cys 残基の脱着やプロトン脱着など、サブファミリー毎に異なる発色のしくみをもつ多様な光受容体である。光応答現象としては、SyPixJ1は正方向の走光性運動を調節しており、タンパク質のリン酸化を利用したシグナル伝達を介すること、SyCcaSとNpCcaSは補色順化応答現象において、CcaRタンパク質のリン酸化を介して光合成色素遺伝子の発現を調節していることを明らかにしていた。また、SyPixJ1やTePixJは青色光吸収型と緑色光吸収型の可逆変換を示し、青色光受容体である。NpCcaSはSyCcaSと同様に、赤色光吸収型と緑色光吸収型の可逆変換を示し、両方の光で逆のシグナルを出力するデュアル光受容体であることを示していた。これらの研究のほとんどは、我々の独自のものであり、非常にオリジナリティの高い研究成果であった。

したがって、当時の課題としては、シアノバクテリオクロムとフィトクロムの進化的関係やシアノバクテリアになぜ非常に多数のシアノバクテリオクロム型光受容体があるのか、それらがどのような関係で個別の光応答現象を調節、統合しているのかを明らかにすることにあった。

2. 研究の目的

それまでのわれわれの知見をさらに発展させるため、細胞内二次メッセンジャーc-di-GMP(サイクリックジグアニル酸)の合成分解にかかわる酵素ドメインをもつ光受容体を研究対象とする。c-di-GMPは細菌に広く分布し、バイオフィーム形成や病原性などの調節にかかわっていることが明らかになり、最近急速に研究が展開している。シアノバクテリアの特徴は、他の細菌にはないシアノバクテリオクロムドメインをもつc-di-GMP合成酵素と分解酵素をもつことにある。また、フィトクロムと比べて多様な分光特性をもつシアノバクテリオクロムの機能をその酵素活性と細胞凝集との関係によって明らかにできることが、本研究の特徴である。

3. 研究の方法

(1)好熱性シアノバクテリアがもつ複数のc-di-GMP合成酵素や分解酵素ドメインをもっているシアノバクテリオクロムを発現精製し、分光特性、酵素活性、細胞凝集の誘導の相関関係を解明する。これによって多様なシアノバクテリオクロムの異なる光情報がどのように一つの生理応答に統合されているのかを解明する。

(2)珪藻ゲノムに存在するバクテリオフィトクロム様タンパク質をさまざまな色素合成大腸菌やシアノバクテリアで発現精製し、結合する色素と分光特性、機能解析を行う。

(3)ゲノム解析で続々と見つかる光受容体の遺伝子を基に、光受容ドメインを発現精製し、分光特性の多様性を総合的に解明する。

4. 研究成果

(1)シアノバクテリオクロムのうち、走光性を調節するTePixJのGAFドメインのPg型の結晶構造とAnPixJのGAFドメインのPr型の結晶構造を決定した。この構造から、D環が予想通りE配向であり、Pb型で重要な役割を果たしているAsp残基がD環に結合していることを明らかにした。

(2)珪藻 *Phaeodactylum* のフィトクロム様光受容体を精製し、ヒスチジンキナーゼの自己リン酸化活性を測定し、赤光でその活性が大きく促進されることを見いだした。

(3)好熱性シアノに存在するシアノバクテリオクロム型光受容体ドメインをもつc-di-GMP合成酵素であるtIrr0911と分解酵素であるtIrr1999とtIrr0911の破壊株を作製し、その表現型を解析した。様々な光条件で各遺伝子破壊の組合せを比較検討することで、細胞凝集を引き起こす主要な青色光受容体はTlrr0924であること、また、これをシアン光で抑制する光受容体Tlrr1999とのバランスによって調節されていることが明らかになった。また、デュアルセンサーのTlrr0911はこれらの光調節のファインチューニングをしていることが示された。

(4)シアノバクテリオクロムTlrr0911の結晶化の準備として、発現・精製法を検討し、夾雑物を効率よく除去するシステムの開発に成功した。

(5)シアノバクテリオクロムのなかに応用的価値が高いビリベルジンを結合するものを発見した。

(6)クロロフィルdをもつシアノバクテリア *Acaryochloris marina* のゲノム解析から、さまざまな分光特性、酵素特性をもつシアノバクテリオクロムを見だし、その分光解析から光合成の多様性に対応する可能性が明らかになった。

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28件)

1. Watanabe, M., Semchonok, D.A., Webber-Birungi, M., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., Ohmori, M., Boekema, E.J. and Ikeuchi, M. (2014) Attachment of phycobilisomes in an antenna-photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111: 2512-2517. 査読有

2. K. Hori, F. Maruyama, T. Fujisawa, T. Togashi, N. Yamamoto, M. Seo, S. Sato, T.

- Yamada, H. Mori, N. Tajima, T. Moriyama, M. Ikeuchi, M. Watanabe, H. Wada, K. Kobayashi, M. Saito, T. Masuda, Y. Sasaki-Sekimoto, K. Mashiguchi, K. Awai, M. Shimojima, S. Masuda, M. Iwai, T. Nobusawa, T. N., S. Kondo, H. Saito, R. Sato, M. Murakawa, Y. Ihara, Y. Oshima-Yamada, K. Ohtaka, M. Satoh, K. Sonobe, M. Ishii, R. Ohtani, M. Kanamori-Sato, R. Honoki, D. Miyazaki, H. Mochizuki, J. Umetsu, K. Higashi, D. Shibata, Y. Kamiya, N. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, S. Ida, K. Kurokawa, and H. Ohta (2014) Klebsormidium flaccidum genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. Nature Comm. In press. 査読有
3. Maeda, K., Narikawa, R., Ikeuchi, M. (2014) CugP is a novel ubiquitous non-GalU-type bacterial UDP-glucose pyrophosphorylase found in cyanobacteria. J. Bacteriol., in press. 査読有
4. Watanabe M., and Ikeuchi, M. (2013) Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex. Photosynth. Res. 116: 265-276. 査読有
5. Narikawa, R., Ishizuka, T., Muraki, N., Shiba, T., Kurisu, G. and Ikeuchi, M. (2013) Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110: 918-23. 査読有
6. Hirose, Y., Rockwell, N.C., Nishiyama, K., Narikawa, R., Ukaji, Y., Inomata, K., Lagarias, J.C., Ikeuchi, M. (2013) Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110: 4974-4979. 査読有
7. Yoshimura, H., Kotake, T., Aohara, T., Tsumuraya, Y., Ikeuchi, M. and Ohmori, M. (2012) The role of extracellular polysaccharides produced by the terrestrial cyanobacterium Nostoc sp. strain HK-01 in NaCl tolerance. J. Appl. Phycol. 24: 237-243. 査読有
8. Midorikawa, T., Narikawa, R., and Ikeuchi, M. (2012) A deletion mutation in the spacing within the psaA core promoter enhances transcription in a cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Plant Cell Physiol. 53: 164-172. 査読有
9. Watanabe, M., Sato, M., Kondo, K., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2012) Phycobilisome model with novel skeleton-like structures in a glaucocystophyte Cyanophora paradoxa. Biochim. Biophys. Acta, 1817: 1428-1435. 査読有
10. Kanesaki, Y., Shiwa, Y., Tajima, N., Suzuki, M., Watanabe, S., Sato, N., Ikeuchi, M., and Yoshikawa, H. (2012) Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of Synechocystis sp. PCC 6803. DNA Res. 19: 67-79. 査読有
11. Enomoto, G., Hirose, Y., Narikawa, R., and Ikeuchi, M. (2012) Thiol-based photocycle of the blue and teal light-sensing cyanobacteriochrome Tlr1999. Biochemistry 51: 3050-3058. 査読有
12. R. Nagao, T. Tomo, E. Noguchi, T. Suzuki, A. Okumura, R. Narikawa, I. Enami and M. Ikeuchi (2012) Proteases are associated with a minor fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein from the diatom, Chaetoceros gracilis. Biochim. Biophys. Acta 1817: 2110-2117. 査読有
13. Tanaka K, Nakasone Y, Okajima K, Ikeuchi M, Tokutomi S, Terazima M. (2012) Time-resolved tracking of interprotein signal transduction: Synechocystis PixD-PixE complex as a sensor of light intensity. J Am Chem Soc. 134: 8336-9. 査読有
14. Yoshimura H, Ikeuchi M, Ohmori M. (2012) Cell surface-associated proteins in the filamentous cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. Microbes Environ. 27: 538-43. 査読有
15. Nowaczyk MM, Krause K, Mieseler M, Sczibilanski A, Ikeuchi M, Rögner M. (2012) Deletion of psbJ leads to accumulation of Psb27-Psb28 photosystem II complexes in Thermosynechococcus elongatus. Biochim Biophys Acta. 1817: 1339-45. 査読有
16. Liauw P, Mashiba T, Kopczak M, Wiegand K, Muraki N, Kubota H, Kawano Y, Ikeuchi M, Hase T, Rögner M, Kurisu G. (2012) Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray studies of the ferredoxin-NAD(P)⁺ reductase from the thermophilic cyanobacterium Thermosynechococcus elongatus BP-1. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 68: 1048-51. 査読有
17. Watanabe, M., Kubota, H., Wada, H., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2011) Novel supercomplex organization of Photosystem I in Anabaena and Cyanophora paradoxa. Plant Cell Physiol. 52: 162-168. 査読有
18. Ishizuka, T., Kamiya, A., Suzuki, H., Narikawa, R., Noguchi, T., Kohchi, T., Inomata, K., and Ikeuchi, M. (2011) The cyanobacteriochrome, TePixJ, isomerizes its own chromophore by converting

phycocyanobilin to phycoviolobilin. *Biochemistry*, 50: 953-961. 査読有

19. Kawakami, K., Umena, Y., Iwai, M., Kawabata, Y., Ikeuchi, M., Kamiya, N. and Shen, J.-R. (2011) Roles of PsbI and PsbM in photosystem II dimer formation and stability studied by deletion mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807: 319-325. 査読有

20. Toyooka T, Tanaka K, Okajima K, Ikeuchi M, Tokutomi S, and Terazima M. (2011) Macromolecular crowding effects on reactions of TePixD (Tl10078). *Photochem Photobiol.* 87: 584-9. 査読有

21. Kawano, Y., Saotome, T., Ochiai, Y., Katayama, M., Narikawa, R. and Ikeuchi, M. (2011) Cellulose accumulation and a cellulose synthase gene are responsible for cell aggregation in the cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus* RKN. *Plant Cell Physiol.* 52: 957-66. 査読有

22. Osanai, T., Oikawa, A., Azuma, M., Tanaka, K., Saito, K., Hirai, M.Y., and Ikeuchi, M. (2011) Genetic engineering of the group 2 sigma factor SigE widely activates the expressions of sugar catabolic genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem.* 286: 30962-71. 査読有

23. Tanaka, K., Nakasone, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M., Tokutomi, S., and Terazima, M. (2011) Light-induced conformational change and transient dissociation reaction of the BLUF photoreceptor *Synechocystis* PixD (Slr1694). *J. Mol. Biol.* 409: 773-85. 査読有

24. Tanaka, K., Nakasone, Y., Okajima, K., Ikeuchi, M., Tokutomi, S., and Terazima, M. (2011) A way to sense light intensity: Multiple-excitation of the BLUF photoreceptor TePixD suppresses conformational change. *FEBS Lett.* 585: 786-90. 査読有

25. Tajima, N., Sato, S., Maruyama, F., Kaneko, T., Sasaki, N.V., Kurokawa, K., Ohta, H., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Tabata, S., Ikeuchi, M., and Sato, N. (2011) Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S. *DNA Res.* 18: 393-9. 査読有

26. Fukushima Y, Iwaki M, Narikawa R, Ikeuchi M, Tomita Y, Itoh S. (2011) Photoconversion mechanism of a green/red photosensory cyanobacteriochrome AnPixJ: time-resolved optical spectroscopy and FTIR analysis of the AnPixJ-GAF2 domain. *Biochemistry* 50: 6328-39. 査読有

27. Noji, T. Suzuki, H., Gotoh, T., Iwai, M., Ikeuchi, M., Tomo, T. and Noguchi, T. (2011) Photosystem II gold nanoparticle conjugate as a nanodevice for the

development of artificial light-driven water-splitting systems. *J. Phys. Chem. Lett.* 2: 2448-2452. 査読有

28. Narikawa, R., Suzuki, F., Yoshihara, S., Higashi, S., Watanabe, M. and Ikeuchi, M. (2011) Novel photosensory two-component system (PixA-NixB-NixC) involved in the regulation of positive and negative phototaxis of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 52: 2214-2224. 査読有

〔学会発表〕(計 67 件)

1 M. Ikeuchi, Chromatic sensors in cyanobacteria. AOCOP 2013.10.11~13 Sydney, Australia 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology. 招待講演

2 M. Ikeuchi: A novel bifunctional cyanobacteriochrome. German conference on photoreceptors (Ringberg, Germany, 2013.9.22-25). 招待講演

3 M. Ikeuchi: Structure and Color Development mechanism of Cyanobacteriochromes. ベルリン自由大学、2013.9.20 招待講演

4 M. Ikeuchi, Color tuning in cyanobacterial life, Cyanobacterial Workshop (St. Louis, USA, Aug 8-11 2013). 招待講演

5 J Tamura, R Nomura, T Saotome, Y Kawano, G Enomoto, T Shimada, R Narikawa, M Ikeuchi, Light-induced biofilm formation and EPS production in cyanobacteria. 日フィン、Naantali, Finland, 2012.9.8-13. 招待講演

6 M. Ikeuchi: Diversity of Cyanobacteriochromes and photoresponses in cyanobacteria --photocycle of double Cys-type. GRC, Galveston, USA 2012.1.22-27 (Gordon Research Conferences: Photosensory Receptors & Signal Transduction 2012.1.22 ~ 27, Galveston, TX, USA). 招待講演

など

〔図書〕(計 3 件)

1. 広瀬侑、池内昌彦 「藻類オイル生産技術研究の最前線」エヌ・ティー・エス 2013 (分担執筆) pp. 163-173.

2. 池内昌彦 「理系総合のための生命科学第3版」羊土社 2013 (分担執筆)

3. 池内昌彦 「藻類ハンドブック」エヌ・ティー・エス 2012 (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://sites.google.com/site/whatsnewikeuchilab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池内 昌彦 (IKEUCHI MASAHIKO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：20159601

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

福山 恵一 (FUKUYAMA KEIICHI)

大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号： 1440188420