

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570063

研究課題名(和文)光化学系2複合体の初期構築過程の解明

研究課題名(英文)Elucidation on the photosystem II assemblage

研究代表者

菓子野 康浩(Kashino, Yasuhiro)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：20221872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：光合成光化学系II(系II)複合体は、20種類ものタンパク質から構成される膜タンパク質複合体であり、しかも、常に修復あるいは新規構築されている。本研究により、系IIの構築初期の未成熟複合体を精製することができた。その複合体のプロテオミクス解析を行うことにより、反応中心複合体のサブユニットであるシトクロムよりも先にその複合体に結合するコアサブユニットが特定され、系II構成サブユニットタンパク質の結合していく初期の順序が判明した。さらに、反応中心複合体の構築初期にだけ複合体に結合する10種類の機能未知タンパク質も見出され、系II構築の初期過程が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Photosystem II (PSII) is a huge membrane-protein complex comprised of 20 different subunit polypeptides. The complexes are continuously assembled from de novo subunits and re-assembled after degradation of reaction center protein D1. Through this project, an immature complex of PSII that is only exist at the very early stage of PSII de novo assemblage was purified. By conducting proteome analysis of this immature complex, it was found that one PSII subunit that is not included in the member of reaction center complex (D1/D2/cyt b559/PsbI) bound to the complex in the early stage of assemblage before a reaction center complex component (cytochrome). Furthermore, 10 novel proteins that included only in the early stage of PSII assemblage.

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：光化学系2複合体 クロロフィル合成 膜タンパク質複合体 シアノバクテリア

1. 研究開始当初の背景

光化学系IIは光のエネルギーを利用して水を分解し、酸素を発生するとともに還元力を持った電子を生み出す反応系である。その反応の場となる系II複合体は、15種類以上の膜タンパク質と3-5種類の膜表在性タンパク質、さらに36分子のクロロフィルや4原子のマンガン等のコファクターから構成される膜タンパク質複合体であり、これらが構築された単量体の分子量は約250,000にもなる。その複合体のほぼ中央に、光のエネルギーを還元力に変換する反応中心が位置し、その反応中心はD1/D2と呼ばれるふたつのサブユニットタンパク質の間に配位している。そのような系II複合体は、多くの場合、単量体が二つ連なった二量体として精製される。すでに報告されている結晶構造モデルは、いずれも二量体構造である (Guskov et al. *Nat Struct Mol Biol* [2009]等)。このようなことから、機能的な系II複合体は二量体構造であるとされている。つまり、生合成により新規に構築された系II複合体は、機能するために最終段階で二量体になると考えられている。また、系IIの反応の駆動力として光エネルギーが必要であるが、その光エネルギーのためにしばしば反応中心タンパク質D1が損傷する。D1の代謝速度は約3時間と、非常に速い。損傷により修復が必要になった系II複合体は、いったん単量体に解体され、D1を入れ替えた後に再び二量体化し、機能を回復すると考えられている (Aro et al. *J Exp Bot* [2004]、Komenda et al. *J Biol Chem* [2006]等)。

しかし申請者は、系IIが二量体であることの必然性に常々疑問を抱いてきた。それは、申請者が精製した系II複合体では、単量体と二量体がほぼ同じ高い活性であったこと等のためである。そして、3.0Åの分解能の結晶構造モデルにおいて (Loll et al. *Science* [2005])、ふたつの単量体の間に界面活性剤の存在が確認された。この報告を目にして、元々は単量体であるふたつの系II複合体の間隙に、精製時の界面活性剤が取り残されたのではないかと推測し、系II複合体の生体内での存在形態の解明に取り組んだ。その結果、精製過程の界面活性剤が系IIの二量体化を促進していることを生化学的に示すとともに、界面活性剤を使わずに、細胞で光エネルギーの伝達過程を精査することで、系II複合体が単量体で機能していることを示した (Takahashi et al. *J Biol Chem* [2009])。系IIの構築・修復過程に関する研究の中で、明らかに多量の単量体が存在している実験結果が示されて

いることもある (Komenda et al. *J Biol Chem* [2006]等)。しかし、従来、「系IIの機能体は二量体である」ことを前提にしているため、単量体の存在を無視するか、あるいは単量体は構築・修復過程にあるものと扱っていた。反論する研究者も依然多いが、系II複合体の本来の姿が単量体である強い可能性を申請者のグループが示したことで、ようやく自然な形で系II複合体の構築・修復過程を解明する入り口に立つことができたと考えた。

また、申請者は、健全な系II複合体の構成成分を網羅的に解析し、複数の新規サブユニットおよび機能未知タンパク質を報告した (Kashino et al. *Biochemistry* 41 [2002])。それらの中で、Psb27は酸素発生反応を司る4原子のMnの組み込みに関わり、組み込み後は膜表在性のサブユニットタンパク質と入れ替わることで系II複合体の成熟化過程に重要な役割を果たしていた (Roose et al. *PNAS* [2007])。見出した新規タンパク質の内のFtsHは、損傷を受けたD1タンパク質を分解するタンパク質である。このタンパク質は結晶構造モデルには含まれていないが、上記網羅的解析の結果は、この分解酵素が健全な状態のうちから系II複合体にスタンバイしていることを示したものである。

このように、申請者は一連の研究により、系IIのライフサイクルの素過程のいくつかを明らかにしてきた。しかしながら、系IIのライフサイクルの全体像はもとより、どのようにして系II複合体が構築され始めるのか、その初期段階でどのようなタンパク質が関わっているのか、系II複合体の誕生過程にはたくさんの謎が残っている。チラコイド膜の上は、光化学系I (系I) 複合体やシトクロム**b6/f**複合体などの複合体も存在する。いわば、交差点の雑踏の中でメンバーが集まるようなものである。そこで、これまでの研究を踏まえ、雑踏の中での系II複合体の秩序だったライフサイクルの全貌を明らかにしたい。

2. 研究の目的

系II複合体は20種類ものサブユニットタンパク質が秩序だって集合した膜タンパク質複合体である。もう一つの光化学反応中心である光化学系I複合体では、構築のごく初期にYcf3、Ycf4と呼ばれるタンパク質がゆりかごのような役割を果たしていると考えられる (Ozawa et al. *Plant Cell* [2009])。しかし、(1)系II複合体では、何らかの未知のタンパク質が関わっているのかさえ不明である。本研究では、構築のごく初期に関わる建築士が存在するのか、

存在するとすればそれは誰なのか、解明する。(2) 存在しない場合、系II複合体の構築がどのように開始されるのかを明らかにする。そして、いずれの場合であっても、成熟化の過程で個々のサブユニットタンパク質やMnクラスターなどが集合する順序・タイミングがあるはずである。チラコイド膜という雑踏の中で、サブユニットタンパク質がどのようにして結合先を見つけるのかも問題である。(3) そのような順序・タイミング、結合相手の認知機構を明らかにすることを狙った。

3. 研究の方法

定法にしたがい、シアノバクテリア *Synechocystis* 6803の光に依存しない酵素の遺伝子を破壊した株（以下、変異株と記載）を作出した。この株を親株とし、他の系IIおよび系Iのサブユニット（Ycf48、PsbI、PsaF、PsaJ、PsaL等）へのHistidine-tagの導入のための遺伝子改変を行った。研究成果欄では、有益な結果に繋がったPsbI-His株について記載する。なお、この研究で作出したPsaL-His株は、後に金ナノ粒子への結合にも役立てることができた。

形質転換体細胞からチラコイド膜を調製し、Ni結合型アフィニティカラムにより、Histidine-tagを持ったタンパク質を精製した。低分子の膜タンパク質まで十分に分離可能な電気泳動法（Kashino et al. *Electrophoresis* [2001]）を用いてタンパク質を分離し、LC-MS/MSおよび特異的抗体によりタンパク質を同定した。

4. 研究成果

野生型と変異体の比較

Synechocystis 6803 野生型PsbI-His（以下、WT）と変異株PsbI-His（以下、M）の細胞を、グルコースを含む培地中で、従属栄養的に6日間培養し、7日目に細胞を回収した。

図1は培養期間中の濁度とクロロフィル濃度の変化を示したものである。黒線がWT、赤線がMを示している。実線は濁度を示しているが、MがWTと同様に増殖していることが分かる。また、破線はクロロフィル濃度変化を示しているが、WTにおけるクロロフィル濃度の増加に対して、Mは低い値を維持したままであった。

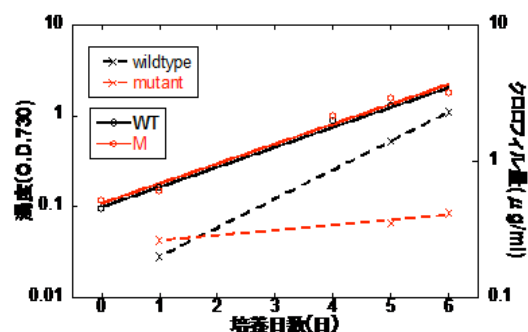


図1. 培養開始0～7日目の濁度とクロロフィル濃度の変化

図2はWTとMを従属栄養的に培養した後の室温における細胞の吸収スペクトルである。Mの吸収スペクトルは、WTのものとは大きく異なる特徴を示し、クロロフィルのQ_yバンドおよびソーレーバンドがほとんど見られなかった。したがって、変異体は、暗室においてクロロフィルをほとんど蓄積していない。630 nm近傍の大きなピークはフィコビリゾームによるものである。

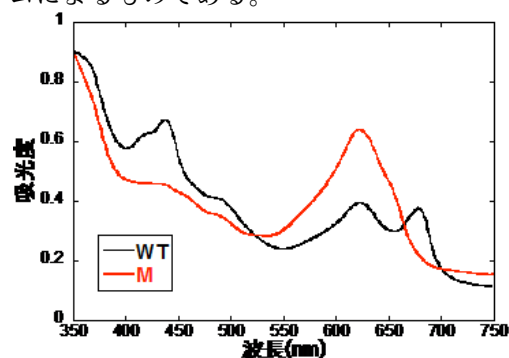


図2. 従属栄養的に培養した野生株と変異株の吸収スペクトルの比較。

図3は明条件で育てたWTと従属栄養的に育てたWTとMの77Kにおける蛍光スペクトルを比較したものである。683 nm付近がフィコビリリンから、685 nmと695 nmがPSIIから、725 nm付近がPSIからの蛍光である。WTではPSIIの685 nmからの蛍光とPSIからの発光がはっきりとわかるのに対し、MではPSI、PSIIのからの蛍光がほとんどなくなった。

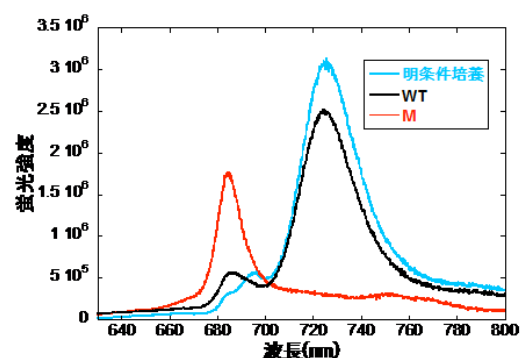


図3. 430 nm励起による77K蛍光スペクトルの比較

次いで、光化学系複合体のタンパク質の蓄積状態を検討した。図4は、WTとMのPSIおよびPSIIのタンパク質量をウエスタンブロットで比較したものである。従属栄養的に培養した変異体には、PS I (a)も PSII(b)も蓄積されていない。

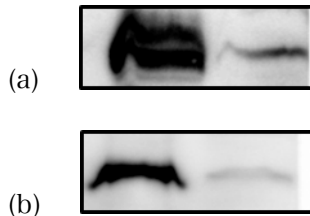


図4. 暗中で培養した野生型と変異体の光化学系タンパク質の蓄積状況。(a)抗 CP1-e 抗体、(b)抗 CP43 抗体。左、WT; 右、M。

光化学系複合体構築の誘導

M細胞を従属栄養的に培養し、光照射0、3、6、24時間後の細胞中クロロフィル濃度を測定したところ、光照射によりクロロフィル合成を誘導できることが確認された(図5)。

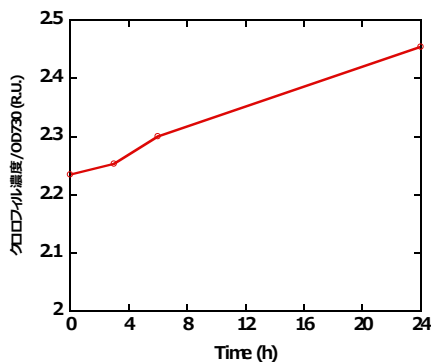


図5. 光照射による変異体細胞当たりのクロロフィル含量の変化

従属栄養的に培養した変異体に光を照射し、PSI、PSIIの蓄積状況を調べたのが図6である。クロロフィル量を揃えてSDS-PAGEを行い、抗PsaA抗体(PSI反応中心タンパク質PsaAに対する抗体;図6-a)、抗CP43抗体(図6-b)、抗D1抗体(図6-c)、抗Hisタグ抗体(Hisタグを融合したPsbIを検出;図6-d)を用いてウエスタンブロッティングにより各タンパク質を染色した。光照射時間が長くなるほどPSIの蓄積量が増加した(図6-a)。CP43よりも反応中心タンパク質D1の方がタンパク質の蓄積が早いようである(図6-b, c)。この結果から、予想通り、系IIコア複合体の中

でも反応中心複合体が最初に構築されてきたと考えられる。興味深いことに、光照射前の細胞では反応中心D1タンパク質の蓄積が非常に少ないにもかかわらず(図6-c)、光照射前の細胞でPsbIがかなり蓄積されていた(図6-d)。

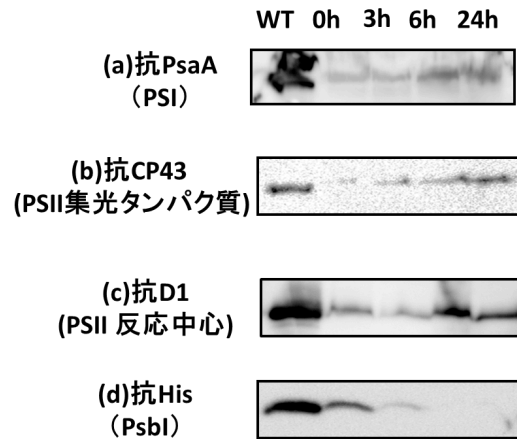


図6. 光照射による光化学系タンパク質含量の変化

構築中間体の精製

可溶性処理を行った後、Ni-NTA にサンプルを通し、洗いの後、Ni-NTA に結合したタンパク質を溶出させた。この精製標品に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離することにより、従属栄養的に培養細胞から PsbI を含む複合体が精製されていることを確認することができた。

精製標品の SDS-PAGE を行った後、銀染色を行った結果を図7に示す。D1、D2 については質量分析から、PsbI については抗体反応から複合体に結合していることが分かった。また、WT に比べて M の方は明らかにバンドがなくなっているのが見受けられる。特に注目したいのは 6 kDa 付近に見られる PsbE と PsbF のバンドがない事である。また、質量分析から PsbH が同定された。今回特定した構築中間体から、PsbH が PsbE/PsbF より先に構築複合体に結合することが分かった。また、成熟 PSII に含まれないタンパク質(Psb28等、計10種)が質量分析により同定された。これらのタンパク質の機能は未知であるが、PSII 構築過程で重要な機能を果たしていると考えられる。

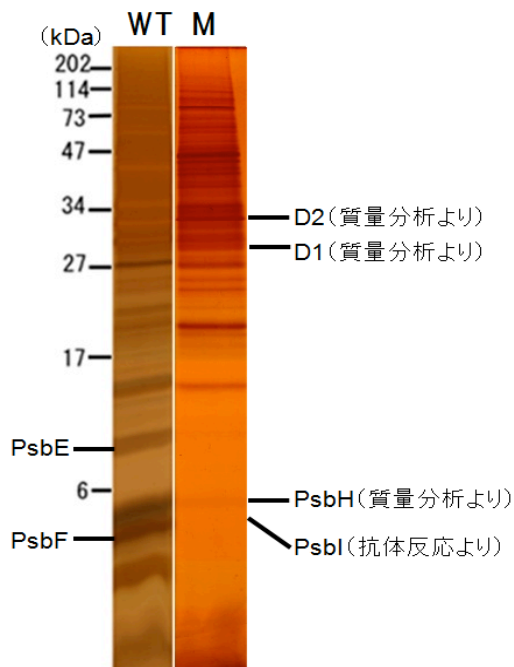


図7. SDS-PAGE 後、銀染色を行ったもの

まとめ

光依存しないクロロフィル合成酵素を欠失させたシアノバクテリア *Synechocystis* 6803 の変異体は、光がないと光化学系を構成しないことが明らかとなった。そして光により PSII の構築を誘導することができた。また、その PSII 構築の初期において、反応中心複合体が構築される前に PsbI が多量に存在することが明らかになった。したがって、PsbI が反応中心構築の初期段階で、構築の中心となっているのではないかと推察される。

そして本研究により、PsbH が PsbE/PsbF より先に PSII 構築中間体に結合することが初めて明らかになった。また、検出された他の複数のタンパク質も PSII 構築に関与している可能性が高い。さらに、今回特定した構築中間体とは異なる中間体をあらたに特定することで、構築過程の全貌が明らかになると期待される。

光合成は、地球環境の維持・改善に深く関わる生命現象であり、しかも、系 II 複合体はほとんどの生命に必須の酸素を生産する生物界唯一の反応系である。植物は、強光、熱、乾燥などあらゆるストレス下で光合成活動を行うが、本研究により、系 II のライフサイクルの初期過程が明らかとなり、地球温暖化が急激に進行しつつある現在、作物の品種改良に向けた基礎的方向性を与えてくれるものと期待される。

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 1 件)

① Masaki Aoi, Yasuhiro Kashino & Ifuku

K (2014) Function and association of CyanoP in photosystem II of *Synechocystis* sp. PCC 6803 "Photosynthesis and Artificial Photosynthesis Research" in *Res Chem Intermed*: in press (査読あり)。

[学会発表] (計 3 件)

- ① 青井政樹、菓子野康浩、佐藤文彦、伊福健太郎 「シアノバクテリア型 PsbP (CyanoP) の分子機能に関する研究」 第 54 回植物生理学会年会、岡山県岡山市、岡山大学津山キャンパス、2013 年 3 月 21 日～23 日
- ② 河原弘典、井上名津子、加藤祐樹、中西華代、鞆達也、菓子野康浩、野口巧 「光化学系 I および光化学系 II の金ナノ粒子への結合による人工光合成ナノデバイスの開発」 第 54 回植物生理学会年会、岡山県岡山市、岡山大学津山キャンパス、2013 年 3 月 21 日～23 日
- ③ 田原一輝、河原弘典、長尾遼、加藤祐樹、井上名津子、菓子野康浩、森本樹、石谷治、野口巧 「光化学系 II 蛋白質と無機触媒の共役による人工光合成系の開発」 第 4 回「フォーラム：人工光合成」、愛知県名古屋市、名古屋大学東山キャンパス坂田・平田ホール、2014 年 3 月 26 日
- ④ 田原一輝、河原弘典、浪江慶祐、井上名津子、長尾遼、加藤祐樹、鞆達也、柴田穰、福村裕史、菓子野康浩、野口巧 「光合成タンパク質と金属ナノ粒子による水素発生人工光合成ナノデバイスの開発」 第 5 回光合成学会年会、奈良県奈良市、近畿大学農学部奈良キャンパス講義棟、2014 年 5 月 30 日、31 日
- ⑤ Kazuki Tahara, Kousuke Kawahara, Keisuke Namie, Natsuko Inoue, Ryo Nagao, Yuki Kato, Tatsuya Tomo, Yutaka Shibata, Hiroshi Fukumura, Yasuhiro Kashino, Takumi Noguchi 「Development of an artificial light-driven water splitting nano-device using photosynthetic proteins and metal nanoparticles」 第 52 回日本生物物理学会年会、北海道札幌市札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 25 日～27 日

[図書] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菓子野 康浩 (KASH)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准
教授
研究者番号：20221872

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：